UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

**ESTUDOS DE RECONHECIMENTO BIOMOLECULAR POR
ELETROFORESE CAPILAR**

SANDRO HILLEBRAND

Tese apresentada ao Instituto de Física de
São Carlos, da Universidade de São
Paulo, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

São Carlos
2005

Dedico esta tese às mulheres da minha
vida: minha esposa Caroline e minha filha Natália!
(Ainda que elas mereçam muito mais que isso....☺).

*“Electrophoresis may be one of the most widely used techniques of molecular biology, but its
practice is still a craft.”*

(John Maddox, *Nature* 1990, 345, 381)

“...you can't get blood from a stone, but you got to try.”

(The Hooters)

“Quando se corre muito, há que parar e esperar pela alma”

(Provérbio dos índios Guarany).

Agradecimentos

A vida é muito mais que um bloco compacto de papel impresso numa prateleira - o que provavelmente essa tese tornar-se-á em pouco tempo - ou um diploma que nos permite adicionar um pomposo “Dr” antes do nome. O doutoramento, bem mais que um período de aprimoramento técnico, é uma parte do processo de formação do indivíduo que coincide com uma fase da vida cheia de questionamentos, incertezas quanto ao futuro, necessidade de afirmação profissional e rica em decisões de efeito perene na vida pessoal. A parte mais difícil da Pós-graduação não é seu *strictu sensu*, a redação da tese e de artigos, as disciplinas, ou as questões científicas sobre a qual nos debruçamos. A parte mais difícil é aprender a gerenciar o tempo, tornar-se intelectualmente independente e, sobretudo, conviver com a instabilidade inerente à posição profissional. Tudo isso sem esquecer que existe família, amigos, casa, enfim, uma vida inteira do lado de fora do Laboratório. Essa é uma tarefa árdua sobre a qual a banca não vai falar e cuja “parte experimental” jamais poderia ser reproduzida. Tratam-se de lições que não se pode ensinar, apenas aprender, pela própria experiência, num experimento que jamais termina. Sou muito grato a todas as pessoas que participaram dessa etapa da minha vida, passiva ou voluntariamente, com seus bons e/ou maus exemplos, (aprendi algo com cada um deles!). Com cada “experimento”, a cada dia, aprendi alguma coisa importante e isso tornou o processo de doutoramento muito rico.

Que fique registrado o meu MUITO OBRIGADO:

- Ao Professor Doutor Emanuel Carrilho pela confiança e estímulo profissionais e ao “Mané” pela amizade e discussões filosóficas!
- Ao grande amigo e distinto profissional MsC. Marcelo Delmar Cantú pelo coleguismo, estímulo profissional, confiança e companheirismo.
- Aos colegas Wendell, Nilson, Esmeraldo, Guilherme, José Carlos e Wanius pela disponibilidade ao diálogo, aos trabalhos em colaboração, às discussões científicas e, sobretudo pela amizade.
- A todos os colegas do Laboratório de Cromatografia!
- À minha amada esposa Caroline por ter aceitado o desafio de vir pra São Carlos e ser minha “cúmplice” nas aventuras da vida!
- À FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto e pela bolsa de estudos.
- À Agilent Technologies (Waldbron) e à toda equipe do Departamento de marketing e R&D, representados pelo Dr. Knut Wintergerst, Dr. Rüdiger Salowsky e Dra. Tanja Wulf, pela oportunidade do trabalho em cooperação e apoio ao projeto na parte de ensaios tipo EMSA em microchips.

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema de um instrumento de eletroforese capilar	4
Figura 2. Esquema básico de um experimento tipo “mobility-shift” com separação eletroforética em gel	9
Figura 3. Esquema ilustrativo de um ensaio de competição em experimento tipo “mobility-shift” e simulação dos eletroferogramas esperados	10
Figura 4. Típico resultado obtido em experimento de EMSA, num ensaio de competição	11
Figura 5. Plataforma instrumental para análises de DNA, RNA e proteínas por eletroforese em microcanais	13
Figura 6. Diferenciação de oligonucleotídeos fita simples e fita dupla, marcados com Cy5, por eletroforese em microcanais	21
Figura 7. Gel virtual gerado no monitoramento da formação de dsDNA a partir das amostras de ssDNA	22
Figura 8. Eletroferograma de ssDNA e dsDNA formadas pela hibridização de fitas marcadas com o Cy5 e a fita complementar não-marcada	23
Figura 9. Variação da intensidade de sinal de fluorescência com a concentração de ssDNA marcado com Cy5	25
Figura 10. Variação da intensidade de sinal de fluorescência com a concentração da sonda dsDNA 1'-2 (AP1)	26
Figura 11. Efeito da concentração de sal na injeção de fragmentos de DNA	28
Figura 12. Eletroferogramas de misturas de reação contendo c-Jun e 0,1 µM de dsDNA 1-2	

(AP1), após 2 h de incubação a 25 °C	32
Figura 13. Eletroferogramas de misturas de reação contendo 5 µM de dsDNA 1-2 (AP1), após 2,5 h de incubação a 25 °C	32
Figura 14. Eletroferogramas de misturas de reação contendo 5 µM de dsDNA 3-4 (NFkB), após 2,5 h de incubação a 25 °C	33
Figura 15. Eletroferogramas de misturas de reação contendo 2 µL de p-50 e 3 µM de dsDNA, após 24 h de incubação	34
Figura 16. Eletroferogramas referentes a experimento EMSA de competição de c-Jun-dsDNA1-2(AP1) com diferentes competidores	35
Figura 17. Eletroferogramas de misturas referentes a experimento EMSA de competição de c-Jun-dsDNA3-4(NFkB) com diferentes competidores	36
Figura 18. Eletroferograma típico obtido para a análise de misturas de reação de c-Jun com dsDNA1-2(AP1)	37
Figura 19. Efeito da razão proteína:DNA no intensidade dos picos dos complexos	38
Figura 20. Efeito da razão Proteína:DNA na intensidade dos picos dos complexos e na seletividade para a formação do pico 5	39
Figura 21. Análise do fator de transcrição purificado, c-Jun, fornecido pela Promega	41
Figura 22. Análise do fator de transcrição purificado, p-50, fornecido pela Promega	41
Figura 23. Ensaio de competição para p-50 com a sonda alvo dsDNA3-4(NFkB)	42
Figura 24. Análise de misturas de reação de p-50 com a sonda alvo dsDNA3-4(NFkB) em diferentes concentrações de proteína e DNA	43
Figura 25. Ensaio de competição para p-50 com a sonda alvo dsDNA3-4(NFkB)	44

Figura 26. Análise de reações de ensaio de competição com concentração crescente de DNA competidor AP1 _____	46
Figura 27. Gráfico da área relativa do pico 5 em função da concentração de “sonda fria” usada no experimento de competição _____	47
Figura 28. Ensaio de atividade GTPase da GST-rDGTPase por eletroforese capilar usando o método para capilares sem recobrimento interno _____	57
Figura 29. Hidrólise de GTP catalisada por enzima, monitorada por meio de eletroforese capilar _____	58
Figura 30. Exemplo do método gráfico usado para os estudos de cinética enzimática ____	62
Figura 31. .Percentual de GDP após reação catalisada por GST-rDGTPase, para alíquotas coletadas em diferentes intervalos de tempo _____	64
Figura 32. Dependência da catálise enzimática pela GST-rDGTPase em função da concentração de magnésio _____	66
Figura 33. Eletroforese capilar de γ SGTP/GDP, ATP/ADP e GTP/GDP seguindo as condições descritas para o método desenvolvido para capilar com recobrimento interno de PVA _____	68

Índice de Tabelas

Tabela 1. Funções bioquímicas de proteínas que se ligam a DNA.10	8
Tabela 2. Relação das sondas de DNA usadas nos experimentos com suas respectivas seqüências de bases e nomes dados aos oligonucleotídeos fita simples e hibridizados em fita dupla.	15
Tabela 3. Relação das proteínas usadas como padrão para ligação com DNA e o resultado esperado para EMSA para cada DNA alvo.	16
Tabela 4. Composição dos tampões de estoque nos quais as proteínas foram obtidas dos fornecedores.	17
Tabela 5. Concentração dos componentes na mistura final de reação de acordo com sua origem, seguindo o protocolo recomendado para o kit da Promega.	29

Sumário

Introdução Geral	1
Capítulo I – Ligação de Proteínas a DNA - ensaios tipo <i>mobility shift</i> em plataforma de eletroforese on chip	7
Introdução	7
Metodologia	15
Resultados e discussão	20
Reconhecimento molecular DNA-DNA	20
Desenho experimental para EMSA em chip	23
Experimentos EMSA em chip	31
Conclusão e Perspectivas	48
Capítulo II – Atividade enzimática: Desenvolvimento de um método não radioativo para monitoramento de atividade GTPase	50
Introdução	50
Atividade GTPase	50
Estudo de caso: atividade GTPase de uma Septina	51
Princípios de Cinética Enzimática	52
Metodologia	54
Resultados e discussão	57
Conclusão e Perspectivas	69

Resumo

Esta tese trata do desenvolvimento de métodos bioanalíticos, baseados na técnica de eletroforese capilar, para duas aplicações distintas: a análise de complexos formados pela ligação entre proteínas e DNA e detecção e monitoramento de hidrólise de GTP catalisada por enzimas. No primeiro capítulo descreve-se uma investigação sobre a viabilidade de ensaios tipo EMSA ("electrophoretic mobility shift assay") em chips com microcanais para eletroforese. Os fatores de transcrição purificados c-Jun(AP1) e p-50(NFkB) foram usados nos estudos de ligação a sondas de DNA fita dupla contendo as seqüências consenso de ligação dos fatores AP1, NFkB e AP2. As sondas de DNA sintéticas continham como modificação a marcação com o corante fluorescente Cy5 ligado à extremidade 5', sendo que as mesmas seqüências não marcadas foram usadas para experimentos de competição. Ensaios tipo EMSA em chip puderam ser realizados em cerca de 2 h com baixo consumo de amostra e sem a necessidade de usar marcação com material radioativo. As sondas de DNA e os complexos formados nas reações de ligação foram analisados no *Bioanalyzer* usando tanto o procedimento padrão para a análise de DNA quanto um protocolo modificado. Nesta modificação não foi usado corante de intercalação mas 4,9 nM de Cy5-dCTP que foi adicionado ao gel, permitindo apenas a detecção de DNA previamente marcado. Apesar da necessidade de ajustes no método para cada proteína testada, foi mostrado o potencial de se substituir o método de EMSA em gel por métodos baseados em eletroforese em chip. Um experimento de competição foi realizado com sucesso mostrando a ligação do fator de transcrição p-50 à sonda contendo a seqüência consenso NFkB. Este experimento foi considerado como prova de princípio para a hipótese estudada. No segundo capítulo relata-se o desenvolvimento de um método para a detecção e monitoramento *in vitro* de atividade nucleotídeo-trifosfatase. O método que se mostrou robusto e reprodutível foi aplicado para investigar a atividade GTPase de uma proteína recombinante contendo o domínio catalítico de uma septina humana SEPT4 / Bradeiona (GST-rDGTPase). O exemplo de aplicação demonstra que a técnica de eletroforese capilar pode substituir o método tradicionalmente usado com marcação radioativa para detecção de atividade GTPase inclusive em estudos de cinética enzimática. Os parâmetros cinéticos determinados para a GST-rDGTPase foram: $v_{max} = 1.7 \mu M \text{ min}^{-1} \pm 0.1$ and $K_m = 1.0 \text{ mM} \pm 0.3$; $k_{cat} = 9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. O efeito de co-fatores como Mg^{2+} and Mn^{2+} também foi estudado. O método analítico descrito também se mostrou útil para a análise de di- e trifosfatos de outros nucleotídeos.

Abstract

This Thesis concerns on the development of capillary electrophoresis-based bioanalytical methods for two distinct applications: DNA-protein binding analysis and monitoring of enzyme-catalyzed GTP hydrolysis. In the first chapter, the feasibility of on-chip electrophoretic mobility-shift assays (EMSA) is investigated. Purified transcription factors c-Jun(AP1) and p-50(NFkB) were used for binding studies to dsDNA probes containing the consensus sequences from AP1, NFkB and AP2 regulatory sequences. DNA probes were modified at the 5'-end with the Cy5 and unlabeled oligos were used for competition experiments. On-chip-EMSA could be carried out within ca. 2 h with low sample consumption and no need to handle radioactive material. Both, the dsDNA probes and the shifted oligos from binding reactions were analyzed on the "2100 Bioanalyzer" using either, the standard procedure for DNA analysis or a modified protocol, in which no intercalating dye was used. Instead, 4.9 nM Cy5-dCTP was added to the gel matrix allowing the detection of only Cy5-labeled DNA. Despite the need of specific adjustments for each protein, we have shown the potential for replacing slab gel-based EMSA for on-chip methods. A competition experiment to show sequence specific binding of the transcription factor p-50 to the consensus sequence NFkB is presented as a proof of principle. In chapter II, a capillary electrophoresis-based method for *in vitro* detection and monitoring of nucleotide-triphosphatase activity is described. This robust and reproducible method was used to investigate GTPase activity of a recombinant protein construct containing the catalytic domain of Human SEPT4 /Bradeion β (GST-rDGTPase). The application example demonstrates that the capillary electrophoresis technique can replace classical radioactive methods for GTPase activity assays and may be used as a routine analytical tool. Enzyme kinetics of GST-rDGTPase was studied and yielded the following kinetic parameters: $v_{\max} = 1.7 \mu\text{M min}^{-1} \pm 0.1$ and $K_m = 1.0 \text{ mM} \pm 0.3$; $k_{\text{cat}} = 9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. In addition the effect of co-factors such as Mg^{2+} and Mn^{2+} in the catalytic activity was investigated. The described analytical method was also shown to be useful to analyze di- and triphosphated forms of other nucleotides.

Introdução Geral

Reconhecimento molecular é o termo empregado para definir a ligação específica, em geral com formação de ligações não covalentes, entre duas ou mais moléculas, que resulta em algum tipo de sinal ou efeito bioquímico. Tais eventos são a base do funcionamento químico perfeitamente orquestrado, bem como de seus distúrbios, e qualquer organismo vivo. Desde os mecanismos de ação de fármacos, passando pelo transporte seletivo de moléculas através de membranas e pelas cascatas de sinalização bioquímica celular até os complexos sistemas de regulação da expressão gênica e sensações geradas no sistema nervoso por moléculas de neurotransmissores, todos os processos bioquímicos têm como etapas chave o reconhecimento molecular. A surpreendente especificidade das reações bioquímicas, catalisadas pelas enzimas, também está baseada no reconhecimento molecular, ou seja, na afinidade entre substrato e sítio ativo da proteína. Por esse motivo, estudos de reconhecimento molecular são de grande interesse científico e tecnológico uma vez que são as bases para o entendimento de todos os mecanismos bioquímicos.

A compreensão dos processos bioquímicos está, portanto, diretamente relacionada ao alcance das técnicas empregadas em tais estudos e pode-se afirmar que grandes passos no avanço do conhecimento obtido nas ciências biológicas foi precedido da disponibilização de uma ferramenta de estudo, ou seja, uma técnica ou método bioanalítico que permitiu ao homem acessar informações antes desconhecidas. Por este motivo é fundamental que haja trabalhos científicos voltados à metodologia e ao desenvolvimento de técnicas.

Com este objetivo a presente tese trata do desenvolvimento de métodos empregando a técnica de eletroforese capilar e eletroforese em microcanais para estudos de reconhecimento molecular.

A eletroforese capilar (CE)¹ é uma técnica analítica de separação em que os componentes de uma mistura de íons ou moléculas são separados com base na sua habilidade de migrar, em resposta a um campo elétrico aplicado, através de um meio condutor que usualmente é um tampão aquoso. A separação dos analitos ocorre enquanto os componentes da amostra migram, sob efeito do campo elétrico, através de um tubo capilar preenchido com uma solução de um eletrólito (Figura 1). O capilar liga dois reservatórios entre os quais se aplica uma diferença de potencial. A detecção dos componentes geralmente é feita próxima à extremidade oposta à de injeção da amostra e a análise é registrada em um eletroferograma, um gráfico de intensidade de sinal em função do tempo.

Figura 1. Esquema de um instrumento de eletroforese capilar.

A eletroforese capilar (CE) apresenta vários dos quesitos desejáveis para uma técnica de alto processamento e compatível com as características práticas de estudos biomoleculares:

- Grande eficiência na separação;
- Pequeno volume de amostra consumido (da ordem de nL por injeção);

- Versatilidade de modos de separação² e de detecção abrangendo grande variedade de analitos, de simples íons a macromoléculas;
- Tempo reduzido de análise;
- Facilidade de automação;
- Possibilidade de miniaturização, entre outros.

Apesar de todas as vantagens da técnica, a eletroforese capilar não é tão difundida no meio em que mais poderia ser empregada que são laboratórios onde se pesquisam problemas biológicos. Uma das causas a que se poderia atribuir a baixa popularidade da técnica é o custo do equipamento quando comparado ao sistema tradicional de eletroforese em gel. Porém, a principal causa do emprego limitado da técnica é a relativa complexidade do desenvolvimento dos métodos analíticos específicos para cada aplicação, levando-se em conta que a maioria dos potenciais usuários não tem formação na área de química analítica, mas de biologia molecular, medicina, agronomia, física entre outras, além de que o foco de estudo destes profissionais é o problema biológico em si e não o método. Dessa forma, é bastante produtiva a interação entre grupos de pesquisa em química analítica, os quais poderão desenvolver os métodos, e os grupos interessados em empregar estas técnicas em seus estudos biomoleculares. Um bom exemplo disso foi o desenvolvimento da tecnologia de seqüenciamento de DNA, a qual foi desenvolvida por químicos analíticos e permitiu a arrancada rumo à exploração do genoma humano.³

Na última década algumas áreas da química analítica, especialmente as de análise em fase líquida e voltadas a biomoléculas, têm avançado na direção da miniaturização dos dispositivos e da integração de etapas de um processo analítico em um mesmo dispositivo. Essa área recebeu denominações como “micro-sistemas de análise total” (μ TAS, do inglês: *micro total analysis system*) e “laboratório em um chip” (LOC, do inglês: *Lab-on-a-chip*) em alusão à idéia generalizada de se colocar em um dispositivo único e de dimensões reduzidas uma seqüência completa das etapas realizadas num laboratório de análises

químicas.^{4, 5, 6, 7} Especialmente as análises biomoleculares com interesse no campo da saúde têm impulsionado fortemente o desenvolvimento desta tecnologia.^{8,9}

Uma das técnicas bem adaptadas à nova plataforma miniaturizada foi a própria eletroforese capilar. Na sua versão microfluídica, a separação eletroforética não ocorre no interior de uma coluna capilar mas em microcanais fabricados em pequenos blocos de silício, vidro ou materiais poliméricos. Atualmente já existem no mercado alguns instrumentos e produtos para a realização de análises químicas e bioquímicas em sistemas microfluídicos. Um destes sistemas foi desenvolvido e comercializado pela Agilent Technologies. Trata-se de uma plataforma já bastante popular na Europa e Estados Unidos, composta de um instrumento para realização de eletroforese em chips com detecção por fluorescência induzida a laser. O sistema substitui com consideráveis vantagens a eletroforese em gel para determinação de tamanho e quantificação de DNA, RNA e proteínas.

As hipóteses testadas neste trabalho de doutorado estão divididas em dois capítulos, contextualizados pela aplicação do estudo: *I)* estudos de ligação entre proteínas e DNA por ensaios tipo *mobility shift* em plataforma microfluídica tipo *lab-on-a-chip* e *II)* desenvolvimento de um método analítico para monitoramento de atividade enzimática hidrolítica de GTP por eletroforese capilar com detecção por absorbância no UV-Vis.

Capítulo I – Ligação de Proteínas a DNA - ensaios tipo *mobility shift* em plataforma de eletroforese *on chip*

Introdução

A regulação da transcrição dos genes requer a ação concertada de muitas proteínas que se ligam direta ou indiretamente à elementos regulatórios do DNA, ou seja, trechos com seqüências específicas. Os fatores de transcrição, como são chamadas estas proteínas, pertencentes a um grupo interessante e complexo de polipeptídeos capazes de se ligar a regiões promotoras de genes e assim ativar ou reprimir sua expressão. A região promotora de um gene contém seqüências específicas que são alvo e se ligam com alta afinidade e especificidade a fatores de transcrição individuais. Este complexo DNA-proteína formado será capaz de recrutar RNA polimerases ativas ou impedido de fazê-lo. É dessa forma que é determinado se o RNA mensageiro ou outro tipo de RNA será produzido ou não e, conseqüentemente, se o gene será expresso ou não. A regulação gênica é resultado direto destas interações e é a partir delas que surge o controle do ciclo celular, da diferenciação e finalmente à maioria dos aspectos da biologia celular.

Moxley e colaboradores, em artigo de revisão¹⁰ sobre os avanços nos métodos de purificação de fatores de transcrição descrevem de forma bastante completa as famílias conhecidas destas proteínas, os motivos estruturais e aspectos funcionais que as caracterizam. Na Tabela 1 são apresentadas as principais classes de proteínas que se ligam a DNA, isoladas por cromatografia de afinidade a DNA e suas características básicas como a ligação a DNA fita simples ou dupla e o grau de afinidade pelas seqüências de DNA testadas.

Tabela 1. Funções bioquímicas de proteínas que se ligam a DNA.¹⁰

Classe de proteínas	Afinidade		Especificidade por seqüências
	ssDNA	dsDNA	
Endonucleases de restrição	-	+	Alta
Estimuladores de transcrição e Proteínas promotoras	+	+	Alta
Transposição	-	+	Alta
Recombinação	+	-	Baixa
Reparo de DNA	+	-	Baixa
Replicação de DNA	+	+	Baixa

(+): observada; (-): não observada

Para que se possa identificar e caracterizar proteínas que se ligam a DNA é crucial que se disponha de método específico para detectar estas interações. Os métodos devem ser sensíveis a ponto de detectar baixas concentrações dos analitos e, sobretudo, devem permitir que se trabalhe com pequenos volumes de amostra, um dos principais obstáculos práticos em estudos com biomoléculas.

O método mais empregado em ensaios de ligação de proteínas a DNA é chamado eletroforese de deslocamento de mobilidade (EMSA, do inglês: *electrophoretic mobility-shift assay*). O ensaio é baseado no fato de que a mobilidade eletroforética do complexo proteína-DNA é diferente da mobilidade do DNA livre o que se deve principalmente à diferença de tamanho entre as espécies livres e o complexo. Assim, quando uma mistura de DNA com uma proteína que se liga a ele é separada por eletroforese, uma nova banda, mais lenta do que o DNA puro, aparece no gel. O experimento é comumente feito empregando-se sondas de DNA marcado com fósforo radioativo (³²P) que são incubadas com a proteína em tampão adequado. Essa mistura é subsequente submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes, resultando no aparecimento de uma banda deslocada, em relação ao DNA livre, em caso positivo de ligação (Figura 2).

Figura 2. Esquema básico de um experimento tipo “mobility-shift” com separação eletroforética em gel e marcação/detecção por radioisótopos. A imagem do gel (B) foi retirada da referência 11 e refere-se à reação do fator de transcrição c-Jun ligado à sequência consenso AP1.

Além do resultado tipo “sim ou não” para a ligação proteína-DNA é comum a realização de experimentos comprobatórios como ensaios tipo “*supershift*” e experimentos de competição. No caso do *supershift* emprega-se um anticorpo anti-proteína que deve ligar-se à proteína antes da formação do complexo com DNA, bloqueando a ligação, ou após a complexação, resultando em deslocamento ainda maior da banda no gel pela formação de um complexo DNA-proteína-anticorpo. O tipo de experimento de confirmação mais comum é o ensaio de competição com seqüências diferentes de DNA. Esse tipo de ensaio é usado também para comprovar a especificidade da ligação pela seqüência alvo. No experimento de competição, adiciona-se à mistura uma sonda idêntica àquela com a seqüência alvo, mas sem a marcação radioativa. Essa sonda não marcada, chamada de “sonda fria”, compete com a sonda marcada (quente) na formação do complexo (Figura 3A e C). Como a sonda fria não pode ser detectada, observa-se o desaparecimento da banda deslocada Figura 4, 2ª

e 3^a canaletas. No mesmo experimento, prepara-se uma outra mistura contendo a sonda específica marcada e uma outra sonda não marcada, contendo uma seqüência de DNA diferente. Se a ligação for específica por uma determinada seqüência de DNA, esta sonda fria inespecífica não será capaz de competir pela formação do complexo (Figura 3B e D) e a banda deslocada continuará aparecendo no gel (Figura 4, 4^a canaleta).

Figura 3. Esquema ilustrativo de um ensaio de competição em experimento tipo "mobility-shift" e simulação dos eletroferogramas esperados. Sondas de dsDNA que não contêm a seqüência específica de ligação (A) não são capazes de competir pela proteína e a banda de DNA é deslocada ou seja, o complexo continua visível (B) na eletroforese. Porém, quando sondas de dsDNA não marcadas contendo a seqüência de ligação estão presentes na mistura (C), ocorre competição pela ligação à proteína e o complexo desaparece (D) pois é formado majoritariamente por DNA não marcado (em excesso) o que torna a banda de DNA deslocado invisível ao sistema de detecção.

Figura 4. Típico resultado obtido em experimento de EMSA, num ensaio de competição. A imagem do gel foi retirada da referência [11] e refere-se à reação do fator de transcrição c-Jun ligado à sequência consenso AP1, empregando a sequência consenso AP2 como competidor inespecífico.

Apesar de a detecção de radioisótopos apresentar alta sensibilidade e ser o método mais empregado no estudo de ligação proteína-DNA, o experimento é bastante demorado, trabalhosos e requer quantidade de amostra relativamente grande. Além disso, a principal desvantagem é a necessidade de se manusear material radioativo, o que requer treinamento adequado, cuidados especiais com o descarte dos resíduos e armazenamento das sondas. Também a etapa de marcação das sondas é comumente realizada pelo analista empregando kits com enzimas (kinase) para incorporação do ^{32}P e realizando a seguir a purificação do DNA efetivamente marcado.

Devido a estes inconvenientes, alguns sistemas de detecção alternativos foram desenvolvidos empregando, por exemplo, biotina, digoxigenina e especialmente marcação fluorescente.^{12, 13, 14} Recentemente, foram desenvolvidos kits de marcação fluorescente para experimentos tipo EMSA, os quais permitem a marcação em separado, das proteínas e do DNA no mesmo gel. A marcação é feita após a separação o que dispensa a necessidade de se trabalhar com as sondas marcadas.¹⁵ Todos estes sistemas de marcação alternativos não se tornaram tão populares e não foram capazes de diminuir o tempo do experimento que tem como gargalo a etapa da separação por eletroforese em gel e a de coloração do gel quando necessária.

Visando a redução do tempo de separação, a diminuição da quantidade de amostra necessária e eliminação da marcação isotópica vários métodos foram desenvolvidos empregando-se a técnica de eletroforese capilar.^{16,17} O método recebeu o nome de CEMSA (do inglês, *capillary electrophoresis mobility-shift assay*) e emprega detecção por fluorescência e etapa de separação em solução livre^{18, 19} ou usando soluções de polímeros como matriz de separação.²⁰ A versão capilar de ensaios tipo EMSA conseguiu eliminar várias das desvantagens do método clássico e tem a vantagem de possibilitar a determinação de constantes de ligação¹⁹ o que não é comumente factível pelo método clássico. Apesar dessas vantagens instrumentos de CE não são disponíveis em tantos laboratórios quantos necessitariam desse aparato para realizar experimentos de ligação. Além disso, como foi citado anteriormente, a técnica de eletroforese capilar requer bom conhecimento de seus princípios fundamentais para que os métodos possam ser desenvolvidos com êxito e a maioria dos usuários interessados em seu uso não tem formação na área e nem deveria perder o foco da questão biológica dedicando-se à metodologia.

Nos últimos anos uma das primeiras plataformas microfluídicas a se estabelecer de forma sólida no mercado, o Bioanalyzer (Agilent Technologies, Figura 5), têm substituído com êxito a técnica da eletroforese em gel para várias aplicações da análise de DNA, RNA e

proteínas. O sistema tem como principais vantagens a quantidade reduzida de amostra necessária, a rapidez da separação, da ordem de segundos, a detecção por fluorescência sem a necessidade de etapas de coloração pós-separação nem de reações antes da eletroforese. Além disso, os chips com os microcanais onde ocorre a separação são descartáveis o que reduz as chances de contaminação e a necessidade de etapas de limpeza e condicionamento antes da separação. Outra vantagem para o usuário é que os métodos são pré-determinados contendo rotinas já definidas para cada aplicação eliminando a necessidade de otimização, por exemplo, das condições de separação como tampão ideal, concentração de gel, tempo de separação, capo elétrico aplicado etc. Os kits contêm soluções prontas com padrões internos e padrões de tamanho para DNA e proteína, bem como a solução de polímero usada como matriz de separação.

Figura 5. Plataforma instrumental para análises de DNA, RNA e proteínas por eletroforese em microcanais. (A) Bioanalyzer, instrumento de análise que integra a parte ótica para detecção, eletrodos e controle eletrônico e de aquisição de dados; (B) chip na forma como é comercializado com os poços para amostras, padrões e matriz de separação; e (C) o chip com os microcanais e poços sem a capa plástica.

Baseado nas características desse aparato disponível comercialmente, decidimos testar a hipótese de usar o sistema para ensaios de ligação DNA-proteína que não apenas resolvesse os problemas do método clássico mas também fosse capaz de aumentar a

capacidade de processamento da técnica permitindo inclusive que se fizesse experimentos de *screening* por seqüências de DNA que ligar-se-iam especificamente a fatores de transcrição. Ao longo do desenvolvimento dos estudos foi encontrada uma publicação em que o mesmo sistema comercial foi usado para experimentos de ligação DNA-proteína. Neste artigo os autores relatam a possibilidade de se substituir os ensaios em gel pela plataforma microfluídica e apresentam resultados mostrando eletroferogramas equivalentes aos géis de retardo obtidos em EMSA.²¹ Os autores, entretanto, não realizaram experimentos de competição que são fundamentais para uma das principais aplicações de estudos de ligação DNA-proteína que é a caracterização de fatores de transcrição.

Para o estudo da hipótese foram empregados fatores de transcrição purificados e sondas de DNA contendo as seqüências consenso de ligação àquelas proteínas. As sondas foram adquiridas com e sem corantes fluorescente acoplados ao oligonucleotídeo para que servissem de sonda marcada e “sonda fria”, respectivamente. Aspectos como concentrações das espécies envolvidas na ligação, tempo de incubação, tampão de ligação, procedimento antes da separação eletroforética e interpretação dos resultados observados são alguns dos itens estudados.

Metodologia

Os fatores de transcrição purificados usados no estudo, c-Jun e p-50, bem como o extrato nuclear de células HeLa foram comprados da Promega (Madison, USA). O 5-amino-propargil-2'-deoxicitidina-5'-trifosfato ligado ao corante fluorescente Cy5® (Cy5-dCTP) foi obtido da Amershan Biosciences (Freiburg, Germany). Todos os nucleotídeos usados, incluindo aqueles marcados com o corante Cy5® foram adquiridos sob encomenda da Metabion (Planegg-Martinsried, Germany). Os oligonucleotídeos foram adquiridos na forma de ssDNA, liofilizados e purificados por HPLC.

Tabela 2. Relação das sondas de DNA usadas nos experimentos com suas respectivas seqüências de bases e nomes dados aos oligonucleotídeos fita simples e hibridizados em fita dupla.

Sonda (dsDNA)	Fita	Seqüência de bases*	Nome do oligo
AP1	Sense	5'-GTC GCT TGA TGA GTC AGC CGG AAT G	1
	anti-sense	5'-CAT TCC GGC TGA CTC ATC AAG CGA C	2
NFkB	Sense	5'-GAA GTT <u>GAG GGG ACT TTC CCA</u> GGC AG	3
	anti-sense	5'-CTG CCT GGG AAA <u>GTC</u> CCC <u>TCA</u> ACT TC	4
AP2	Sense	5'-GAT CGA ACT <u>GAC</u> CGC CCG CGG CCC GT	AP2sense
	anti-sense	5'-ACG GGC CGC GGG CGG <u>TCA</u> GTT CGA TC	AP2antisese

* Em vermelho, a seqüência alvo consenso do fator de transcrição c-Jun e em azul a seqüência alvo consenso do fator de transcrição NFkB. Os trechos sublinhados são blocos de bases presentes nas outras sondas cuja seqüência coincide com a seqüência alvo consenso da c-Jun.

Os oligonucleotídeos comprados foram solubilizados em água ultra-pura de forma que resultassem em soluções estoque em concentração de 100 µM. Para a preparação de dsDNA, quantidades equimolares de ssDNA foram reunidas e misturadas a temperatura

ambiente sendo que a correta hibridização dos oligonucleotídeos foi monitorada posteriormente por eletroforese em chip.

Como modelo de proteína que se liga a dsDNA foram empregados os fatores de transcrição AP1 c-Jun humana recombinante, fornecida pela Promega (Madison, EUA) a uma concentração de 0,3 mg/mL, e NF-KB p50 humano, obtida do mesmo fabricante a uma concentração de 350 µg/mL.

Tabela 3. Relação das proteínas usadas como padrão para ligação com DNA e o resultado esperado para EMSA de acordo com a descrição do fornecedor¹¹, para cada DNA alvo.

Proteína / extrato	DNA alvo	Bandas deslocadas
c-Jun (TF purificado)	AP1 (oligo1-2)	1 banda específica
p-50 (TF purificado)	NFkB (oligo 3-4)	1 banda específica

Todas as proteínas adquiridas foram separadas em alíquotas e congeladas a -80 °C. Antes de sua utilização, cada alíquota foi descongelada, agitada para evitar a formação de gradientes de concentração e então pipetada para a preparação das misturas. Quando o volume requerido para o ensaio foi superior ao volume de cada alíquota, as alíquotas descongeladas foram misturadas em um único tubo e homogeneizadas antes do uso. Na Tabela 4 apresenta-se a composição dos tampões de estocagem nos quais as proteínas foram obtidas dos fabricantes.

Tabela 4. Composição dos tampões de estoque nos quais as proteínas foram obtidas dos fornecedores. Estão destacados em vermelho os componentes que contribuem mais para a concentração total de sal na composição final das misturas de reação.

Componente	Extrato nuc. HeLa	p-50	c-Jun
Agente tamponante	HEPES (pH 7,9) 20 mM	HEPES (pH 7,9) 20 mM	Tris-HCl (pH 7,5) 20 mM
NaCl	-	50 mM	-
KCl	100 mM	-	50 mM
MgCl ₂	-	-	10 mM
Acetato de Zn	-	40 µM	-
EDTA	0,2 mM	-	1 mM
DTT	0,5 mM	5 mM	1 mM
Glicerol	20 %	10 %	30 %
Guanidina-HCl	-	-	500 mM
PMSF	0,5 mM	0,5 mM	-
NP40	-	0,1%	-

As misturas dos fatores de transcrição e com as sondas de DNA foram preparadas em volume total de 5 µL e na presença de tampão de ligação, tendo sido incubadas a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$). De cada mistura incubada foram retiradas alíquotas de 1 µL após diferentes intervalos de tempo, para a análise por eletroforese em chip.

Em alguns experimentos adicionou-se ao tampão de ligação poli(dIdC), um nucleotídeo sintético de tamanho médio 7285 pares de base que é usado como competidor não específico em ensaios de ligação DNA-proteína para neutralizar ligações inespecíficas. O reagente foi adquirido da Amersham Biosciences (Freiburg, Alemanha) liofilizado tendo sido solubilizado em água, formando uma solução estoque a 0,1 mg/mL, a qual foi aquecida a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos para garantir que o mesmo estivesse na conformação de dsDNA.

As separações eletroforéticas foram realizadas no instrumento 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha) empregando os kits de análise de DNA²² denominados DNA 1000, DNA 7500 ou DNA 1200. Cada kit é composto por uma matriz de separação que é uma solução de polímero, uma solução de corante fluorescente de intercalação à fita dupla de DNA e marcadores de tamanho de DNA. Os marcadores são de dois tipos, um é composto por apenas dois fragmentos de DNA que servem de padrões internos em cada análise (limites superior e inferior de tamanho) sendo usados pelo software para alinhar várias corridas do mesmo chip ou de chips diferentes. O outro marcador contém uma série de fragmentos de tamanhos conhecidos que servem para calibrar o sistema que atribui os tamanhos dos fragmentos a amostras desconhecidas. A identidade do polímero de separação, composição das soluções tampão, identidade do corante fluorescente, dimensões dos canais de separação no chip, bem como vários detalhes das características técnicas do instrumento são mantidas sob proteção proprietária pelo fabricante. O mesmo ocorre com as rotinas que compõe os vários “assays” como são chamadas as partes do software que controla o equipamento, a aquisição e o tratamento dos dados, específicas para cada kit.

De acordo com o protocolo de análise destes kits, adiciona-se o corante fluorescente à matriz de separação a qual é introduzida nos canais do chip por pressão aplicada com um dispositivo próprio contendo uma seringa acoplada. Adiciona-se o marcador de tamanhos no poço adequado do chip e o padrão interno a cada poço de amostra. As amostras são adicionadas logo após a cada um dos poços e o chip é então agitado em sistema próprio semelhante a um vortex antes de ser colocado no local adequado do instrumento que realizará a corrida.

No caso dos experimentos de ligação, foram feitas algumas modificações no protocolo geral. O corante fluorescente do kit não foi adicionado à matriz, pois sendo um corante de intercalação ele torna fluorescente qualquer dsDNA com que tiver contato. Em

vez disso, adicionou-se Cy5-dCTP na concentração de 4,9 nM. A presença de algum sinal de fluorescência de fundo na matriz que preenche o canal é fundamental uma vez que o instrumento emprega esse sinal para ajustar o foco automaticamente ao ponto de detecção do canal de separação. O corante adicionado, porém, não é capaz de marcar o DNA durante a sua migração pelos microcanais, já que não é um corante de intercalação como o fornecido no kit DNA1000, por exemplo.

O resultado das separações foi registrado para avaliação através do software 2100 Expert²³ que não apenas comanda o instrumento como também contém um pacote de ferramentas para correções dos eletroferogramas com alinhamento dos picos, cálculo de tamanho e de concentração dos fragmentos. No caso das análises tipo EMSA, o alinhamento de picos foi usado apenas para facilitar a visualização dos resultados na comparação dos eletroferogramas de diferentes amostras ou misturas. Uma vez que no método desenvolvido para ensaios de ligação não conta com padrões internos, o alinhamento foi realizado atribuindo-se manualmente a identidade de *lower marker* ao primeiro pico e de *upper marker* ao maior pico ou a um dos maiores picos que fosse comum a todas as amostras. Quando apenas um pico era detectado, o que aconteceu em amostras controle contendo apenas a sonda livre, um “pico fantasma” foi atribuído manualmente ao um ponto do eletroferograma com tempo similar ao do pico usado como *upper marker*. Os procedimentos adotados no alinhamento dos eletroferogramas tiveram o objetivo de facilitar a comparação dos resultados e não tem qualquer significado físico.

Resultados e discussão

Reconhecimento molecular DNA-DNA

Os fatores de transcrição empregados neste trabalho como modelo para o desenvolvimento do método de EMSA em chip são proteínas que se ligam a seqüências específicas em DNA fita dupla. Por este motivo é de fundamental importância que as sondas estejam corretamente pareadas e este controle deve ser feito antes da preparação das misturas de reação. Na Figura 6 apresenta-se o resultado de análises de duas das sondas utilizadas sobrepondo-se os eletroferogramas de cada oligonucleotídeo ssDNA e das misturas de seqüências complementares. A análise comprova ser viável e relativamente simples a separação de ssDNA e dsDNA utilizando-se esse procedimento. Além disso, o rendimento da reação de hibridização é aproximadamente 100% uma vez que não se observa ssDNA residual quando se misturam quantidades equimolares das fitas complementares. Foi observado que para a preparação destas sondas não foi necessária a presença de sais de cátions divalentes como o magnésio nem aquecimento para a hibridização correta das fitas. Atribuiu-se esta facilidade ao fato das sondas serem curtas o que dificulta a formação de estruturas secundárias que poderiam levar a um pareamento errado. É importante lembrar que os oligonucleotídeos são modificados na extremidade 3' com o fluoróforo Cy5 o que confere à sonda uma mobilidade menor. O marcador inferior (pico "M"), por exemplo, tem 25 bp e migra mais rápido que os oligonucleotídeos 1 e 2 que têm o mesmo comprimento. Outra observação que deve ser feita diz respeito à intensidade do sinal dos picos. As sondas "1-2" e "3-4" estão na concentração de 1 μ M e apresentam sinal pelo menos duas vezes maior que dos oligonucleotídeos fita simples presentes em concentração 2 μ M. Esta aparente inconsistência se explica pela presença do corante de intercalação do kit o qual gera sinal de fluorescência quando intercalado ao dsDNA. Este

fato soma-se à diferença de mobilidade entre ssDNA e dsDNA para confirmar a hibridização das fitas.

Figura 6. Diferenciação de oligonucleotídeos fita simples e fita dupla, marcados com Cy5, por eletroforese em microcanais. Os oligos 1 e 2 e 3 e 4, respectivamente, têm seqüências complementares, formando as sondas fita dupla 1-2 (AP1) e 3-4 (NFkB) quando hibridizados. Todos os ssDNA são marcados com uma molécula de Cy5 cada e foram analisados em concentração de 2 μ M. Os dsDNA foram preparados adicionando-se volumes iguais de solução 2 μ M das fitas complementares resultando em solução a 1 μ M da dsDNA. A separação foi realizada no kit DNA 1000 pelo procedimento normal, ou seja, com a utilização do corante de intercalação do kit e os marcadores internos. Na legenda apresenta-se o comprimento aparente dos fragmentos, atribuído pelo programa, em contraste com o comprimento real mostrado entre parênteses. M é o marcador inferior usado como padrão interno para o alinhamento dos eletroferogramas.

Outra prova de que a hibridização foi correta e de que é possível monitorá-la por este tipo de análise é apresentado na Figura 7 em que além das misturas de oligos com seqüências complementares, experimentou-se misturar seqüências não complementares,

como os oligos 1 e 3. Neste caso, as duas bandas correspondentes ao ssDNA foram observadas e nenhuma banda na região esperada para dsDNA foi detectada.

Figura 7. Gel virtual gerado no monitoramento da formação de dsDNA a partir das amostras de ssDNA. As condições experimentais são idênticas às descritas na Figura 6.

Além da hibridização entre oligonucleotídeos com ambas as fitas contendo a modificação com o fluoróforo Cy5, foi possível preparar dsDNA contendo uma das fitas marcadas e a outra não. O resultado típico deste tipo de experimento é apresentado na Figura 8. Os resultados comprovam a validade das observações sobre a hibridização do DNA e abrem a possibilidade para novos estudos em que pequenos oligonucleotídeos marcados com Cy5 poderiam ser usados como sonda em experimentos de hibridização com misturas de DNA não marcados. O sistema atuaria como um sensor para seqüências específicas podendo ser usado em experimentos similares aos realizados em microarranjos de DNA (DNA *microarrays*) ou mesmo em ensaios com separações como os de amostra diferencial (*differential display*) ou hibridização em gel.

Figura 8. Eletroferograma de ssDNA e dsDNA formadas pela hibridização de fitas marcadas com o Cy5 e a fita complementar não-marcada. Os picos “M” no início e no fim dos eletroferogramas correspondem aos marcadores de tamanho inferior e superior usados para o alinhamento dos eletroferogramas. O apóstrofe após o número que representa a fita única indica que aquele ssDNA não é marcado com o Cy5. Por exemplo, o dsDNA 1'-2 é a sonda formada pela fita com a seqüência de 1, sem marcação fluorescente, hibridizada à fita de seqüência 2, marcada com cy5. A concentração dos dsDNA são de 1 μ M e ssDNA são 2 μ M. Separação realizada utilizando o procedimento normal e kit DNA 1000.

Desenho experimental para EMSA em chip

O desenho inicial dos experimentos de EMSA foi baseado nas instruções contidas no kit da Promega para ensaios tipo EMSA em gel na forma tradicional, com marcação radioativa.¹¹ Embora não tenham sido realizados experimentos de acordo com o protocolo da Promega para efeito de comparação, as imagens dos géis de EMSA bem como os demais resultados que constam no boletim técnico do fabricante foram aceitos como

verdadeiros e como padrão para as proteínas empregadas nestes experimentos. As reações no referido protocolo sugeriam um volume total de reação de 10 μL , contendo aproximadamente 0,035 pmol dsDNA marcado com ^{32}P e entre 1 e 2 μL de proteína (1 μg de proteína para c-Jun. Estas quantidades equivalem em concentração a 3,5 nM de sonda de dsDNA e 1,5 μM de proteína.

Uma das vantagens da substituição do método clássico pelo sistema em chip seria a redução do volume de amostra empregado. No procedimento de análise com o Bioanalyzer apenas 1 μL de cada amostra de DNA é colocado nos poços do chip ao passo que para eletroforese em gel, esse volume tipicamente é de 10 μL . Embora apenas 1 μL seja requerido para a análise, é difícil trabalhar com frações de μL empregando pipetas manuais e por esta razão optou-se por preparar as misturas de reação em volume total de 5 μL .

Antes de iniciar os experimentos de ligação DNA-proteína propriamente ditos, foi necessário estipular alguns parâmetros analíticos como a faixa ideal de concentração para se trabalhar com as sondas, a composição ideal do tampão de ligação, além das modificações no procedimento de análise original dos kits de separação de DNA para esta nova aplicação.

Com respeito à concentração de DNA possível de se detectar pelo Bioanalyzer, foram feitos alguns testes com ssDNA e dsDNA marcados com Cy5. Na Figura 9 apresenta-se a variação de sinal dependente da concentração do oligonucleotídeo 2 preparado em água pura e analisado seguindo-se o protocolo do kit DNA 1000 sem qualquer modificação. Neste caso, cada molécula de ssDNA tem uma molécula do fluoróforo e a matriz de separação contém também o corante de intercalação. O corante de intercalação cuja identidade não é revelada pelo fabricante do kit tem sua eficiência de fluorescência maximizada quando associado à hélice dupla do DNA, mas também é capaz de emitir fluorescência quando está livre em solução ou associado a DNA fita simples e RNA. Desta forma, o sinal detectado neste experimento (Figura 9) é uma soma da fluorescência oriunda

do Cy5 e do corante de intercalação. A relação entre sinal e concentração neste caso mostrou-se não linear especialmente no caso da área do pico. Esse resultado já indicava, ainda que de forma preliminar, que a concentração de trabalho não poderia ser inferior a alguns décimos de μM o que é 100 vezes mais concentrado que as sondas radioativas usadas no método clássico.

Figura 9. Variação da intensidade de sinal com a concentração de ssDNA marcado com Cy5. (A) Eletroferogramas sobrepostos de amostras a 1 μM (vermelho) e 0,1 μM (preto) em água. A análise foi realizada usando a rotina do DNA 1000 e o procedimento de preparo do chip sem modificações. M refere-se aos padrões internos do kit. (B) Gráfico da variação da área e da altura do pico de ssDNA.

Na adaptação do método para o formato LOC, a exemplo da marcação radioativa, apenas o DNA marcado com o Cy5 deveria ser visível e isso requer a não utilização do corante de intercalação presente nos kits de análise, visto que o mesmo torna fluorescente qualquer DNA presente. Por outro lado, é necessário que haja um sinal de fluorescência de fundo na matriz de separação que preenche o canal de separação, pois essa fluorescência é usada pelo instrumento para focalização do ponto de detecção. Para resolver essa questão, foi necessário adicionar um corante fluorescente à matriz de separação que não marcasse o DNA. Foi adicionado então Cy5-CTP na concentração de 4.9 nM à matriz polimérica. Na Figura 10 apresenta-se a variação da intensidade do sinal de fluorescência

em função da concentração de uma sonda dsDNA, na condição de análise modificada, ou seja, sem o corante de intercalação mas com Cy5-CTP adicionado à matriz. Embora a concentração mais baixa apresentada na figura (0,25 μM) ainda estivesse bem acima do limite de detecção, não foi possível trabalhar com concentrações abaixo destas em experimentos de ligação já que a banda deslocada, formada por apenas uma fração da sonda adicionada à mistura, não é mais detectável, como será mostrado mais adiante. A variação de sinal mostrada na Figura 10 é da sonda de dsDNA formada por apenas uma das fitas marcadas, ou seja, quando há apenas uma molécula do fluoróforo por molécula de DNA. Usando as duas fitas marcadas e tendo dessa forma duas moléculas do fluoróforo por sonda, naturalmente o sinal de fluorescência é maior. Porém, como será descrito mais adiante, observou-se que em experimentos de competição com dsDNA não marcado ocorre o aparecimento de um pico adicional, o que foi atribuído à troca cruzada entre fitas complementares de DNA.

Figura 10. Variação da intensidade de sinal com a concentração da sonda dsDNA 1'-2 (AP1). (A) Eletroferogramas sobrepostos com a sonda em concentrações variadas, próximas da faixa de trabalho empregada para as reações de ligação. A análise foi realizada com a rotina do kit DNA 12000 modificada pela adição de Cy5-CTP à matriz de separação em substituição ao corante de intercalação. (B) Gráfico da variação da área e da altura do pico de dsDNA.

Ainda em se tratando de experimentos preliminares, houve uma preocupação com o modo de introdução das amostras no canal de separação por meio da injeção eletrocinética. Este modo de injeção apresenta certa suscetibilidade à concentração de sal na matriz da amostra e a eficiência de introdução do analito dependerá de sua mobilidade relativa aos demais componentes. No caso dos destes experimentos, não se sabia o tamanho do complexo DNA-proteína formado nem sua carga e, portanto, sua mobilidade através na matriz polimérica. Na Figura 11 são apresentados resultados de testes feitos com a separação de padrões de tamanho de DNA usando as rotinas dos ensaios “DNA 7500” e “DNA 12000” e simulando a presença dos teores de sal contidos no tampão de estocagem das proteínas usadas nos ensaios de ligação.

Estes resultados mostram que com a adição de 1 μ L da solução de proteína a 5 μ L de volume total de reação (20% em volume), não há variação da quantidade de DNA introduzida por injeção eletrocinética de amostra. Entretanto, quando o volume de solução de proteína é 40% do volume total de reação, fragmentos de DNA maiores que 1000 pb não são introduzidos. No caso da formação de complexos DNA-proteína, pode-se afirmar que complexos supramoleculares cuja mobilidade eletroforética na matriz polimérica destes kits (DNA 7500 e DNA 1200) for superior à mobilidade de uma molécula de DNA com 1 kpb, não será detectado possivelmente por não ter sido introduzida no canal de separação pela discriminação no processo de injeção eletrocinética.

Figura 11. Efeito da concentração de sal na injeção de fragmentos de DNA do padrão de tamanho usando as rotinas (A), (B) e (C) “DNA 7500 assay” e (D), (E) e (F) “DNA 1200 assay” do Bioanalyzer. Em todos os casos utilizou-se o padrão “DNA 7500” exceto em (D) que emprega o padrão “DNA 12000”. Em (A) e (D) não há adição de sal; em (B) e (E) adicionou-se 1 µL do tampão de estocagem de c-Jun; em (C) e (F) adicionaram-se 2 µL do tampão de estocagem. Os padrões de DNA têm os seguintes tamanhos, em pares de base: 50, 100, 300, 500, 700, 1000, 1500, 2000, 3000, 5000, 7000, 10380 (e 17000 para o padrão do kit “DNA 12000”).

O tampão de ligação, ou seja, a solução na qual deve ocorrer a ligação entre as sondas e a proteína é um dos pontos críticos para o sucesso do experimento. No caso do kit da Promega, o tampão é fornecido no kit do ensaio e sua composição era conhecida. Na

Tabela 5, apresentam-se as concentrações dos componentes da solução na reação, resultante da mistura da solução da proteína com o tampão de ligação, de acordo com as quantidades recomendadas pelo fabricante.

Tabela 5. Concentração dos componentes na mistura final de reação de acordo com sua origem, seguindo o protocolo recomendado para o kit da Promega o qual emprega 2 µL da solução de proteína para um volume final de reação de 10 µL.

Componente	c-Jun (2 µL)	Tampão de ligação 5x (2 µL)	Final (10 µL)
Agente tamponante	Tris-HCl 4 mM (pH 7,5)	Tris-HCl 10 mM (pH 7,5)	14
NaCl (mM)		50	50
KCl (mM)	10		10
MgCl ₂ (mM)	2	1	3
EDTA (mM)	0,2	0,5	0,7
DTT (mM)	0,2	0,5	0,7
Glicerol (%)	6	4	10
Guanidina-HCl (mM)	100		100
Poli(dI-dC) (µg/µL)		0,05	0,05

Destacados em vermelho os componentes que contribuem significativamente para a concentração total de sal na mistura de ligação.

A alta concentração de sais inorgânicos nas misturas foi um dos obstáculos na adaptação do método clássico para o sistema de eletroforese em chip, especialmente pela presença de íons cloreto, espécie que compete com o DNA no momento da introdução de amostra no canal de separação no modo de injeção eletrocinético. No protocolo sugerido pela Promega a concentração final deste íon é de cerca de 166 mM. Esta concentração já é

bastante alta e preocupante uma vez que a recomendação para análise de amostras e DNA no Bioanalyzer é que a concentração de sal seja inferior a 125 mM para KCl ou NaCl e menor que 15 mM for MgCl_2 .²²

Na verdade, esta limitação conflita com a limitação da própria ligação DNA-proteína que é dependente da concentração de sais no meio em que ocorrem. A especificidade da ligação, a estabilidade do complexo e a estabilidade da proteína são fatores que dependem direta ou indiretamente da concentração de sais. Sabe-se que o DNA se comporta em solução como um eletrólito fraco devido à alta densidade de carga em sua superfície. A ligação de uma proteína então resulta na liberação de alguns contra-íons pareados ao DNA. Esta transferência de pequenos íons de uma área de alta concentração (próxima ao DNA) para uma região relativamente mais diluída da solução resulta num ganho significativo de entropia e esse ganho é a força motriz para a reação de ligação. Uma consequência direta disso é que a constante de ligação aparente para a reação de ligação muda drasticamente com a concentração de sal.²⁴ A consequência prática disso é que em estudos de ligação *in vitro* é necessário controlar cuidadosamente a concentração de sal proveniente de todos os componentes iônicos adicionados. Diminuir a concentração de sal vai não apenas aumentar a ligação específica de interesse, mas também qualquer ligação inespecífica. Na verdade, para muitas proteínas a ligação inespecífica é mais sensível à concentração de sal do que a ligação específica. Ao passo que se diminui a concentração de sal pode aumentar a força da ligação específica, isso pode diminuir a razão entre as forças de ligação específica e inespecífica. De fato, em teoria, é possível que, sob certas condições, a ligação inespecífica seja mais forte que a específica.²⁵ É importante notar que esse efeito é dependente da concentração total de sal e não da força iônica como é incorreta e freqüentemente expresso na literatura.

Com base nos parâmetros iniciais discutidos anteriormente, foram realizadas as primeiras tentativas de observação de bandas deslocadas em eletroforese em chip, partindo-se para a otimização do método de forma mais empírica.

Experimentos EMSA em chip

Uma vez que as soluções de estocagem das proteínas já continham grande quantidade de sais, os primeiros experimentos foram realizados sem a utilização de um tampão de ligação e, posteriormente, empregando-se um tampão de ligação similar ao da Promega, porém sem NaCl e $MgCl_2$ já que os demais componentes poderiam ser indispensáveis à ligação. Na Figura 12 apresenta-se o resultado de uma das tentativas iniciais de detecção de ligação DNA-proteína. O resultado mostra que o pico referente à sonda livre diminuiu quando foi adicionada a proteína indicando que o dsDNA foi consumido, provavelmente para formar o complexo. Entretanto, não se detectou qualquer pico adicional com mobilidade inferior que pudesse comprovar a formação do complexo. Levantou-se a possibilidade de que a concentração dos componentes deveria ser aumentada para melhorar a visibilidade dos complexos caso estivessem de fato sendo formados.

O aumento da concentração da sonda de dsDNA e de proteína revelou o aparecimento de novos picos com mobilidade menor que a do dsDNA livre, similar às *shifted-bands* esperadas na eletroforese em gel pelo método clássico (Figura 13).

Figura 12. Eletroferogramas de misturas de reação contendo c-Jun e 0,1 μM de dsDNA 1-2 (AP1), após 2 h de incubação a 25 $^{\circ}\text{C}$, usando o protocolo de DNA 7500 sem modificação. (-) controle, sem proteína; (-) 0,38 μM de c-Jun; e (-) 1,5 μM de c-Jun. M são picos de padrão interno de tamanho de DNA; As misturas foram preparadas em volume total de 5 μL mas foram diluídas à metade antes da análise para que a concentração de sal não fosse tão alta a ponto de não aparecer o marcador interno superior.

Figura 13. Eletroferogramas de misturas de reação contendo 5 μM de dsDNA 1-2 (AP1), após 2,5 h de incubação a 25 $^{\circ}\text{C}$, usando o protocolo de DNA 7500 sem modificação. M são picos de padrão interno de tamanho de DNA; (-) controle, sem proteína; (-) 3 μM de c-Jun (2 μL de proteína para 5 μL de solução).

Apesar de a detecção de picos adicionais com as características de complexos ter sido um avanço considerável, o número de picos observados foi maior que o esperado. Alguns destes picos poderiam ser fruto de interações inespecíficas o que precisava ser comprovado experimentalmente. Também num experimento controle em que a proteína c-Jun foi incubada com a sonda 3-4 (NFkB), a qual não tem a sequência alvo consenso para esta proteína, apareceram vários picos deslocados (Figura 14). Este resultado também indicava a formação de ligação inespecífica.

Figura 14. Eletroferogramas de misturas de reação contendo 5 μ M de dsDNA 3-4 (NFkB), após 2,5 h de incubação a 25 $^{\circ}$ C, usando o protocolo de DNA 7500 sem modificação. M são picos de padrão interno de tamanho de DNA; (-) controle, sem proteína; (-) 3 μ M de c-Jun (2 μ L para 5 de solução).

Para a outra proteína usada como modelo, a p-50, o resultado pareceu mais animador. Na Figura 15 apresenta-se um ensaio cruzado em que este fator de transcrição foi incubado com as sondas dsDNA1-2 (AP1), a qual não deveria formar ligações específicas, e dsDNA 3-4 (NFkB) que contém a sequência alvo do p-50. Observe-se que apenas o par correto, p-50 e dsDNA 3- 4 (NFkB), produziram um complexo.

Figura 15. Eletroferogramas de misturas de reação contendo 2 μ L de p-50 e 3 μ M de dsDNA, após 24 h de incubação sendo 12 h a 25 °C e 12 h a 4 °C, usando o protocolo de DNA 7500 modificado em que apenas DNA marcado com Cy5 é visível. (–) dsDNA1-2 (AP1); (–) dsDNA3-4(NFkB).

Como foi dito na introdução deste capítulo, a especificidade da ligação em ensaios tipo EMSA pode ser testada por meio de experimentos de competição em que sondas de dsDNA não marcadas, invisíveis ao sistema de detecção, são adicionadas à mistura de reação. Se a proteína for capaz de se ligar à sequência de bases do DNA competidor com afinidade similar àquela que tem pelo seu alvo principal, então o pico do complexo deve desaparecer do eletroferograma já que a o competidor invisível estará ocupando a proteína e formando com ela complexos que não podem ser detectados. Experimentos de competição foram então realizados com c-Jun e p-50.

Na Figura 16 apresenta-se um resultado de ensaio de competição para c-Jun usando-se o competidor específico que é o próprio dsDNA1'-2'(AP1) sem marcação, e competidores não específicos, ou seja que não contém a sequência alvo. Observa-se claramente que o competidor específico dsDNA1'-2'(AP1) extinguiu completamente os picos dos complexos ao passo que o competidor não específico dsDNA(AP2) causou uma

diminuição de intensidade apenas. Mesmo sendo parcial a competição de AP2 com o alvo AP1, este resultado não é convincente para mostrar a especificidade de ligação e sobram dúvidas quanto a identidade dos complexos e o número deles.

Figura 16. Eletroferograma referentes a experimento EMSA de competição de c-Jun-dsDNA1-2(AP1) com diferentes competidores. 3 μ L de c-Jun e 3 μ M de dsDNA marcado em competição com 4 μ M de dsDNA competidor, após 3,5 h de incubação a 25 °C, usando o protocolo de DNA 12000 modificado em que apenas DNA marcado com Cy5 é visível.

Os picos observados, e inesperados, para a reação de c-Jun com dsDNA3-4 (NFkB), mostrada na Figura 14, se mostraram mesmo inespecíficos uma vez que todos os competidores usados foram capazes de extinguir os picos dos complexos (Figura 17).

Figura 17. Eletroferograma de misturas referentes a experimento EMSA de competição de c-Jun-dsDNA3-4(NFkB) com diferentes competidores. 2 μ L de c-Jun e 2 μ M de dsDNA marcado em competição com 2 μ M de dsDNA competidor, após 4 h de incubação a 25 °C, usando o protocolo de DNA 7500 modificado em que apenas DNA marcado com Cy5 é visível; (–) dsDNA3-4 (NFkB); (–) dsDNA3-4 (NFkB) em competição com dsDNA3'-4'(NFkB); (–) dsDNA3-4 (NFkB) em competição com dsDNA(AP2); (–)dsDNA3-4 (NFkB) em competição com dsDNA1'-2'(AP1).

Na busca pelas possíveis causas da falta de especificidade observada para a ligação entre c-Jun e dsDNA1-2(AP1), foram levantadas possíveis fontes para o insucesso do experimento e entre elas estavam a composição do tampão e as relações entre concentração de DNA e proteína nas misturas. Com respeito à composição do tampão de ligação, foi preparado um tampão similar ao do kit da Promega, porém sem os sais e os componentes DTT e Poly(dI-dC) foram testados como aditivos à mistura, separadamente. Nem a utilização do tampão de ligação nem dos componentes citados modificou o perfil dos eletroferogramas (dados não mostrados). Pelo contrário, o aparecimento de seis picos com baixa especificidade de ligação de c-Jun com a sequência alvo AP1 mostrou boa reprodutibilidade. Quando se compara o método clássico com este que estava sendo

desenvolvido, as principais diferenças são as razões entre as concentrações de DNA e proteína e a etapa de separação eletroforética. No método clássico emprega-se uma concentração de DNA cerca de 10^3 vezes menor que a de proteína e a etapa eletroforética é demorada e mais drástica no que diz respeito à exposição dos analitos à temperatura e difusão pelo gel. Estas duas características poderiam servir para selecionar apenas os complexos mais resistentes, ou seja, de ligação forte, específica, para serem detectados no final do experimento. Por outro lado, no caso do método em chip, a concentração molar de DNA e proteína é da mesma ordem de grandeza e a separação é extremamente rápida o que poderia estar favorecendo a detecção de complexos menos estáveis. Se esta observação estiver correta, os resultados observados podem não ser “erros” mas sim o retrato de uma realidade que não pode ser captada pelo método clássico. Observando-se com atenção o perfil do gel obtido pelo método clássico (Figura 18 B) pode-se perceber um rastro de sinal entre a banda de DNA livre e o complexo. Este rastro poderia ser equivalente aos picos de menor intensidade observados no eletroferograma (Figura 18 A).

Figura 18. Eletroferograma típico obtido para a análise de misturas de reação de c-Jun com dsDNA1-2(AP1). 3 μ M de c-Jun e 4 μ M de DNA. Análise realizada após 2,5 h de incubação usando-se o protocolo DNA 12000 modificado.

Assumindo-se que os resultados apresentados podem ser verdadeiros e talvez até mais fiéis à realidade que os encontrados pelo método clássico, resolvemos explorar a questão da proporção entre DNA e proteína, visando melhorar a seletividade da formação de um dos picos. O pico 5 (Figura 18 A) foi considerado como o complexo de ligação específica sendo os demais considerados produtos ou complexos secundários. Na Figura 19 são apresentados os eletroferogramas sobrepostos de diferentes misturas de reação com concentrações variadas de c-Jun e dsDNA1-2(AP1).

Figura 19. Efeito da razão proteína:DNA no intensidade dos picos ou complexos formados. (A) eletroferogramas de diferentes reações de c-Jun com dsDNA1-2(AP1). Reações preparadas contendo tampão de ligação sem sais e um volume constante de solução tampão de estocagem de proteínas igual a 2 μ L. As concentrações de proteína e DNA bem como a razão de concentrações resultante estão indicadas na legenda do gráfico. A análise foi realizada após 2,5 h de incubação a 25 °C, utilizando-se o protocolo DNA 12000 modificado.

Os dados extraídos dos eletroferogramas da Figura 19 foram organizados em gráficos os quais são mostrados na Figura 20. Os dados mostram que quanto maiores as concentrações de DNA e proteína, maior será o sinal obtido para os complexos formados. Essa informação é de certa forma óbvia visto que é a concentração total que está sendo

aumentada dessa forma. Por outro lado, comparado este ponto com a condição em que a concentração de proteína é a mesma e a de DNA cai à metade (proteína:DNA=1,5), percebe-se que não há perda proporcional do sinal absoluto do Pico 5. Analisando os dados de outra forma, não pela área absoluta do pico 5 mas por sua área relativa à área total dos picos de complexos, outra relação interessante veio à tona. No gráfico apresentado na Figura 20 B, fica evidente que o pico 5 é o produto majoritário quando há na mistura 3 vezes mais moléculas de proteína que de DNA.

Figura 20. Efeito da razão Proteína:DNA na intensidade dos picos dos complexos e na seletividade para a formação do pico 5. (A) Área do pico 5 em função da concentração de DNA e da razão entre as concentrações de proteína e DNA; (B) Área do pico 5 em relação à soma das áreas de todos os picos de complexos, em função da concentração de DNA e da razão entre as concentrações de proteína e DNA.

Este é possivelmente o ponto ótimo para a realização dos experimentos de EMSA em chip com o protocolo atual de separação embora razões ainda maiores, como no caso do método clássico em que essa razão pode ultrapassar 10^3 , pudessem resultar em método

mais adequado. Aumentar a concentração de proteína, mantendo-se a relação proteína:DNA igual a três não é possível uma vez que a alta concentração de sal proveniente do tampão de estocagem da proteína resultaria em concentrações que ultrapassam sobremaneira o limite aceitável. Por outro lado, manter a concentração de proteína em 3 μ M (20 % do volume total) e diminuir a concentração da sonda de DNA acarreta em perda significativa de sinal.

Mesmo na condição maximizada de seletividade para a formação do pico 5 os experimentos de competição não deram resultados diferentes daqueles apresentados na Figura 16. O competidor específico, com a mesma seqüência do DNA alvo, causa o desaparecimento dos picos de complexos, como era esperado. Porém, os competidores não específicos com as seqüências de NFkB e AP2 que não deveriam competir pela ligação também causaram a diminuição dos picos apesar de ter sido em menor escala. A falta de especificidade na ligação poderia ser atribuída às condições experimentais usadas no método as quais são limitadas pela etapa de separação eletroforética no chip ou também à própria proteína que poderia estar impura ou degradada. As condições experimentais não puderam ser modificadas além do que foi tentado e descrito anteriormente a não ser que a própria fonte de amostra fosse outra ou tivesse a concentração de sal no tampão de estocagem diminuída, o que não chegou a ser tentado.

A pureza da proteína foi analisada empregando-se o próprio Bioanalyzer e o kit para eletroforese de proteínas.²⁶ Os resultados para ambos os fatores de transcrição usados como modelo neste estudo foram bons e são apresentados na Figura 21 e na Figura 22, para c-Jun e p-50, respectivamente. A linha de base no eletroferograma de c-Jun mostrou certa instabilidade, bem como o marcador de tamanho apresentou variação na intensidade do pico para condições redutora e não redutora. Este fato deve-se à presença de guanidina-HCl no tampão da proteína, componente que pode prejudicar a análise conforme advertido no manual do kit de análise de proteínas do Bioanalyzer. Apesar da baixa qualidade da linha

de base foi possível comprovar que não havia impurezas na amostra de c-Jun fornecida pela Promega, tendo sido detectado um único pico com massa molecular próxima da esperada.

Figura 21. Análise do fator de transcrição purificado, c-Jun, fornecido pela Promega. A análise foi realizada de acordo com o protocolo descrito no kit 200²⁶ para condição redutora e não redutora.

Figura 22. Análise do fator de transcrição purificado, p-50, fornecido pela Promega. A análise foi realizada de acordo com o protocolo descrito no kit 200²⁶ para condição não redutora e para a condição redutora em duas concentrações sendo que a menor foi a metade da primeira.

O fator de transcrição p-50, também usado como modelo neste estudo, mostrou ser mais promissor em termos de especificidade de ligação conforme foi mostrado na Figura 15 em que a sonda dsDNA1-2(AP1) não formou complexo. Para confirmar aquele resultado, foi preparado um ensaio de competição cujo resultado é mostrado na Figura 23. Este resultado foi bastante animador já que apresentou apenas um complexo, o qual se liga especificamente à sequência alvo NFkB. Entretanto, o pico do complexo só foi detectado após tempos de incubação muito longos o que torna o ensaio muito demorado e de resultado duvidoso uma vez a maioria das proteínas pode se degradar ou perder a atividade após tantas horas.

Figura 23. Ensaio de competição para p-50 com a sonda alvo dsDNA3-4(NFkB). Misturas preparadas com 700 ng de proteína (2 μ L), 5 μ M de sonda marcada e 5 μ M de dsDNA não marcado usado como competidor. A análise foi realizada após 20 h de incubação usando o protocolo do kit DNA 7500 modificado.

O ensaio foi então otimizado inicialmente buscando concentração de proteína maior e quantidade mais adequada de DNA visando aumentar o rendimento e a velocidade de formação do complexo. Também foram adicionados ao tampão de ligação DTT preparado

pouco antes do ensaio e o resultado pode ser visto na Figura 24. Embora se tenha conseguido a detecção do complexo após pouco mais de 2 h de incubação e encontrado concentrações mais adequadas para o ensaio, os eletroferogramas não apresentaram linha de base estável e freqüentemente algumas corridas eram perdidas por oscilação intensa de corrente durante a eletroforese.

Figura 24. Análise de misturas de reação de p-50 com a sonda alvo dsDNA3-4(NFkB) em diferentes concentrações de proteína e DNA, conforme indicado na legenda do gráfico. As misturas foram analisadas após 2,5 h de incubação a 25 °C usando o protocolo de análise DNA 12000 modificado.

Observando-se a composição do tampão de estocagem de p-50 (Tabela 4) pode-se ver que o mesmo contém um detergente não iônico (NP40). A presença de tensoativos nas amostras analisadas nos chips é inadequada pois causam a umectação das bordas dos poços de amostra no chip o que resulta em fuga de corrente durante a eletroforese. Uma das soluções práticas para este tipo de problema quando a presença de tensoativos não pode ser evitada é não agitar o chip ou diminuir a velocidade de agitação após o carregamento das amostras. A redução da velocidade de 2000 rpm para 1000 rpm foi suficiente para garantir resultados ótimos como o apresentado no experimento de competição na Figura 25. Este resultado figura não apenas como prova de princípio, mas

também como caso de sucesso para a substituição do método clássico de EMSA por métodos desenvolvidos para plataformas microfluídicas.

Figura 25. Ensaio de competição para p-50 com a sonda alvo dsDNA3-4(NFkB). Misturas preparadas com 700 ng de proteína (2 μ L), 2 μ M de sonda marcada e 5 μ M de dsDNA não marcado usado como competidor. A mistura de reação recebeu ainda 5 mM de DTT preparado pouco antes da realização do ensaio. A análise foi realizada após 1 h de incubação usando o protocolo do kit DNA 12000 modificado. Resultados de ensaios de competição como o apresentado da Figura 25 são do tipo desejado por quem estuda a ligação específica de proteínas como os fatores de transcrição a seqüências definidas de DNA. É comum inclusive que se modifiquem as condições experimentais, em geral a composição do tampão, até que tal resultado seja encontrado. O próprio fornecedor dos kits, Promega, sugere que se faça uma titulação da mistura de reação com poli(dIdC) até que encontre o ponto “ótimo” de especificidade sem de fato compreender ou que pode estar ocorrendo no sistema e atribuindo qualquer desvio deste comportamento dito ideal, à ligações inespecíficas.²⁷ Este tipo de avaliação é bastante simplista e possivelmente decorre da dificuldade de se obter resultados quantitativos pelo método clássico em que a avaliação do resultado é qualitativa, do tipo “sim ou não” referente à detecção ou não de uma banda deslocada no gel. Entretanto, com o método baseado em chip é possível obter respostas quantitativas e precisas o que permite estudar com mais critério os desvios daquele

“comportamento ideal”. É o caso do fator de transcrição c-Jun cujo ensaio de competição mostrado na Figura 16 indica que a ligação desta proteína ao alvo AP1 não é específica. Especificamente no caso do fator de transcrição c-Jun, há muitos outros fatores que podem estar contribuindo para a aparente inespecificidade de ligação. Estudos mostraram que *in vivo* c-Jun forma um heterodímero com a proteína Fos e que este heterodímero é que se liga ao DNA. Além disso, pode haver outros fatores que regulem esta ligação os quais ainda não estão totalmente elucidados e que podem ser difíceis de se reproduzir *in vitro*.²⁸ Sabe-se, e é intuitivo se pensar dessa forma, que a ligação específica de uma proteína ao DNA é precedida pela ligação inespecífica o que acelera bastante a busca pelo sítio de ligação específica. Desta forma, fatores com a estrutura e a dinâmica do DNA são bastante importantes no processo e as condições experimentais podem afetar esses fatores de forma drástica.²⁹

Com o método de EMSA em chip, é possível acompanhar a área dos picos e usar estas medidas mais precisas para tentar expressar fisicamente pequenas diferenças de especificidade. Na Figura 26 apresenta-se o resultado da análise de uma série de misturas de reação de experimentos de competição com quantidades progressivas de competidor. À medida que a quantidade de competidor aumenta, a intensidade dos picos de complexos diminui e o pico de DNA livre aumenta tendendo à um máximo que coincide com a área do pico de DNA livre de uma mistura controle na qual não se adicionou proteína. Com a medida da área do pico livre em cada condição foi possível construir gráficos como o apresentado na Figura 26 B em que se apresenta a variação dessa área em função da concentração de competidor. O perfil desta curva lembra o de uma curva de ligação a partir da qual se pode determinar o valor da constante de ligação. Aos pontos experimentais foi ajustada uma função de ligação que permite o cálculo de uma constante, teoricamente a constante de ligação. Apesar da função se ter se ajustado bem aos pontos experimentais, o significado físico real da constante obtida é questionável e não pode ser atribuído à constante de

equilíbrio da reação de formação de um único complexo já que foram detectados seis picos e todos eles tiveram o sinal esmaecido com a competição.

Figura 26. Análise de reações de ensaio de competição com concentração crescente de DNA competidor AP1 sem marcação. (A) Eletroferogramas sobrepostos para mostrar a diminuição progressiva do sinal dos picos de complexos e (B) gráfico da área do pico de sonda marcada livre em função da concentração de DNA competidor (sonda fria). Condições experimentais: 5 μ L de mistura em tampão de ligação (30 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM KCl, 0,7 mM DTT, 10% de Glicerol, 3 mM MgCl₂, 0,7 mM EDTA, 0,05 μ g/ μ L, Poli(dI-dC)); 3 μ M de c-Jun; 3 μ M de dsDNA1-2 (AP1); concentração de competidor conforme indicado na legenda. Eletroforese foi realizada após 3 h de incubação a 25°C, usando o protocolo do kit/ensaio “DNA 12000” modificado.

Outra tentativa de expressar os resultados de experimentos de competição de forma mais precisa e comparativa está demonstrado na Figura 27 em que foi construído um gráfico da área relativa do pico 5 em função da concentração do competidor na mistura. Neste caso não se chegou a ajustar uma função matemática modelo, mas apenas comparar a eficiência de competição das duas sondas frias sobrepondo-se as curvas. A área relativa expressa no gráfico é o percentual de área do pico 5 com respeito à soma das áreas de todos os picos. Optou-se por expressar desta forma para normalizar os valores de área absolutos que podem variar nas mistura, cada qual colocada em um poço do chip.

Figura 27. Gráfico da área relativa do pico 5 em função da concentração de “sonda fria” usada no experimento de competição. As condições experimentais são idênticas às descritas na Figura 26. A área relativa do pico 5 foi calculada como o percentual de área sobre o total das áreas de todos os picos no eletroferograma.

Esta forma de expressar o resultado permite analisar isoladamente cada um dos picos de complexo ao contrário do exemplo anterior em que a sonda marcada livre “recuperada” pela competição com as sondas frias provém de todos os picos de complexo quer sejam específicos ou não. Em teoria seria possível encontrar complexos formados por ligações de maior especificidade em meio à vários complexos inespecíficos ainda que a diferença entre as constantes de ligação fosse sutil.

Mesmo não tendo ainda um significado físico bem definido, devido a falta de um modelo generalista para a ligação, curvas desse tipo poderiam ser usadas para comparar a especificidade de ligação a diferentes seqüências mesmo em casos como o da c-Jun em que aparentemente um experimento de competição dá resultados indesejáveis. Do ponto de vista metodológico isto representa um avanço considerável da técnica de eletroforese em sistema microfluídico sobre o procedimento clássico, sem contar as vantagens operacionais.

Conclusão e Perspectivas

Foi possível mostrar a utilização da plataforma microfluídica tipo *Lab-on-a-chip* da Agilent Technologies para ensaios tipo EMSA. Ensaios de ligação DNA-proteína foram realizados e a ligação pôde ser comprovada por meio de experimentos de competição. O método desenvolvido para eletroforese em microcanais apresenta diversas vantagens sobre o método clássico, como a rapidez da etapa de separação eletroforética que permite o resultado praticamente em tempo real, a não utilização de reagentes radioativos, o consumo reduzido de amostras e reagentes. Além da simplificação do procedimento de execução das análises o método desenvolvido apresenta a vantagem da obtenção de resultados mais precisos e quantitativos uma vez que a análise fornece medidas de área e altura dos picos que podem ser relacionadas diretamente com a concentração. Apesar das vantagens, os métodos precisam ser otimizados para cada proteína. Deve-se atentar para questões como a proporção de proteína relativa a quantidade de DNA e a composição salina do tampão de ligação. Uma das desvantagens da técnica é a injeção da amostra que é eletrocinética e pode levar à introdução diferenciada das espécies químicas presentes, de acordo com suas mobilidades eletroforéticas.

Este estudo representou os primeiros passos na direção da substituição de métodos clássicos de EMSA por modernas técnicas de análise em dispositivos miniaturizados, deixando perspectivas interessantes para a continuidade do estudo metodológico e de aplicações. Ficou claro a necessidade de flexibilizar as condições da etapa de eletroforese visando otimizar o procedimento para este tipo específico de ensaio. Seria desejável testar métodos de pré-concentração e/ou formas alternativas de marcação fluorescente que permitissem diminuir o limite de detecção para os complexos para que se pudesse trabalhar com concentrações mais baixas dos componentes e, por consequência de sal. Novos desenhos para o chip também poderiam ser desenvolvidos incluindo formas alternativas

para a injeção das amostras e para a separação dos complexos. Outra perspectiva interessante para estudo é a modelagem física do sistema visando aproveitar melhor as medidas fornecidas com a técnica e indisponíveis ou imprecisas no método clássico. O objetivo seria encontrar a forma mais adequada de expressar e explorar as medidas obtidas acessando informações que podem auxiliar na elucidação do processo bioquímico.

Os experimentos aqui relatados serviram para comprovar a hipótese de que seria possível usar o sistema comercial *Bioanalyzer* para ensaios tipo EMSA. Embora não se possa esperar sucesso na aplicação com todas as proteínas sem realizar modificações no procedimento, a plataforma para eletroforese em chip poderá ser adaptada para este tipo de ensaio. Este estudo indica que seriam necessárias modificações no sistema de introdução de amostra e nas condições de eletroforese.

Capítulo II – Atividade enzimática: Desenvolvimento de um método não radioativo para monitoramento de atividade GTPase

Introdução

Atividade GTPase

A atividade GTPase é caracterizada pela hidrólise do trifosfato de guanosina (GTP) produzindo o difosfato de guanosina (GDP) e um íon fosfato. O método usado comumente para caracterizar a atividade GTPase emprega GTP marcado com o radioisótopo ^{32}P e uma técnica de separação como cromatografia em camada delgada.^{30, 31} Apesar de ser um método largamente utilizado, ele é trabalhoso, demorado e requer o manuseio de material radioativo com todas as questões de proteção individual e descarte de resíduos envolvidas no processo.

Visando superar estas desvantagens, métodos não radioativos foram desenvolvidos e estão relatados na literatura. Um exemplo disso são métodos baseados na técnica de cromatografia de alto desempenho (HPLC) que permite a separação e quantificação de GTP e GDP sem a necessidade de marcação radioativa.^{32, 33} A técnica de eletroforese capilar (CE) também foi aplicada com sucesso na separação de nucleotídeos e seus íons mono-, di- e trifosfato^{34, 35, 36, 37} oferecendo todas as vantagens inerentes à técnica, tais como baixo consumo de amostra e reagentes, tempos reduzidos de análise, alto poder de separação e facilidade de automatização da rotina analítica. Especificamente tratando-se de atividade GTPase, Kawata e colaboradores relataram o desenvolvimento de um método em CE para separar e quantificar GTP e GDP após reação enzimática.³⁸ Com este método, foi possível separar GTP e GDP em 7,2 minutos usando capilares de sílica fundida. Tendo este trabalho como base, foi desenvolvido um método com a separação otimizada pelo uso de capilares

com recobrimento interno de poli(vinil álcool) (PVA). Além disso, o procedimento analítico inteiro foi simplificado com o objetivo aumentar a eficiência do processo analítico já que estudos cinéticos, comumente o alvo de ensaios de atividade requerem um grande número de análises. O método desenvolvido foi aplicado ao estudo de uma septina humana recombinante e construções do suposto domínio catalítico com glutathione-S-transferase (GST) tendo como objetivos não apenas comprovar que havia de fato atividade na proteína recombinante, mas também caracterizar a atividade com base em estudos de cinética enzimática.

Estudo de caso: atividade GTPase de uma Septina

Septinas são proteínas do citoesqueleto altamente conservadas e presentes em células animais e fungos, porém jamais detectada em plantas. Estas proteínas têm a propriedade de se agrupar formando filamentos os quais ficam envolvidos pela membrana plasmática e são necessárias para completar o ciclo celular.^{39,40,41} Cerca de 10 septinas distintas já foram identificadas em mamíferos e recentemente foi proposta uma nomenclatura que unifica denominações anteriores desta família de proteínas.⁴² Estas proteínas têm uma estrutura altamente conservada que inclui um domínio de ligação a GTP, uma região N-terminal variável e a maioria das septinas contém também domínio super-hélice (*coiled coil*) na parte C-terminal.⁴³

O gene da Bradeiona, como era denominada anteriormente a septina humana agora classificada da categoria SEP4⁴², foi identificado por Tanaka e colaboradores a partir de uma biblioteca de cDNA de cérebro humano^{44,45}. O gene é expresso fortemente no cérebro e fracamente em tecido do coração e a expressão é estágio-específica. Esta especificidade na expressão conforme o tipo de célula ocorre também em alguns tipos de câncer sendo detectável apenas em câncer colorretal e melanoma maligno.^{44,45} Este tipo de perfil de expressão não havia sido observado antes para nenhum membro da família das septinas e

esta característica satisfaz critérios básicos de molécula alvo para o monitoramento do desenvolvimento de câncer.

O papel da atividade GTPase no ciclo celular de células cancerosas ainda não é compreendido e por isso a caracterização das propriedades bioquímicas destas proteínas é altamente desejável. Em estudo realizado no Centro de Biologia Molecular e Estrutural do Instituto de Física de São Carlos, Da Silva⁴⁶ realizou a expressão, purificação e estudos preliminares de caracterização estrutural da septina humana recombinante SEPT4. Posteriormente o domínio catalítico foi definido com base em características estruturais da família das septinas⁴⁷ (resíduos 144 – 166) e expresso e purificado.

Os estudos cinéticos foram realizados com a proteína inteira SEPT4_v2 recombinante (rDGTPase) assim como com uma construção contendo o apenas suposto domínio GTPase em fusão com GST (GST-rDGTPase).

Princípios de Cinética Enzimática

A caracterização da cinética enzimática é uma das estratégias mais empregadas para o estudo do mecanismo de reações catalisadas por enzimas e está baseada na medição da taxa de conversão de substrato e como ela é afetada por variações nas condições experimentais. As condições experimentais tradicionalmente monitoradas durante a investigação das propriedades catalíticas de uma enzima são o pH em que ocorre a reação, a concentração de substrato(s) e a necessidade de co-fatores e sua concentração ótima. De posse dos dados experimentais o procedimento seguinte é a modelagem dos mesmos, buscando descrições matemáticas que possibilitem a descrição do sistema por parâmetros físico-químicos como constantes cinéticas ou termodinâmicas. Dentre os modelos já consolidados para descrever a catálise enzimática, certamente o mais popular é o descrito por Leonor Michaelis e Maud Menten, amplamente difundido em qualquer livro texto na área bioquímica.

Todas as enzimas que apresentam uma dependência hiperbólica da velocidade inicial de reação com a concentração de substrato são consideradas enzimas que seguem a cinética de Michaelis-Menten. E para estas enzimas é válida a regra prática de que a constante de Michaelis-Menten, K_m , é igual à concentração de substrato quando a velocidade inicial é a metade da velocidade máxima, V_{max} , (Equação 1).⁴⁸

$$V_0 = V_{max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \text{Equação 1}$$

Outro parâmetro que pode ser obtido em um estudo cinético é a constante catalítica ou k_{cat} , definida como a razão da velocidade máxima pela concentração de enzima. k_{cat} é equivalente ao número de moléculas de substrato convertidas a produto por unidade de tempo, por uma única molécula de enzima, na condição de saturação ($[S] \gg [E]$).

A maneira mais apropriada de se comparar a eficiência catalítica de uma mesma enzima por diferentes substratos ou de duas enzimas por um mesmo substrato é comparar a razão k_{cat}/K_m para as duas reações. Este parâmetro, chamado algumas vezes de constante de especificidade. k_{cat}/K_m é a constante cinética (*rate constant*) para a conversão de E+S a E+P, quando a $[S] \ll K_m$.⁴⁸

Metodologia

Todos os reagentes usados foram de grau de pureza analítico, comprados da Sigma (St. Louis, MO, USA). As soluções foram preparadas com água ultra-pura e aquelas usadas para eletroforese, como eletrólitos de separação e soluções de limpeza do capilar foram filtradas usando filtros com diâmetro de poro de 0,45 μm .

As amostras de proteína purificadas foram fornecidas pelos colaboradores e a descrição completa dos procedimentos de expressão e purificação estão descritas na referência 46. A concentração da proteína foi determinada através da medida de absorbância a 280 nm relacionada ao coeficiente de extinção teórico obtido por cálculo.⁴⁹

Os ensaios de atividade enzimática para GST-rDGTPase foram realizados em solução tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo 100 mM de NaCl. As reações foram realizadas na presença de diferentes concentrações de Mg^{2+} ou Mn^{2+} e do substrato GTP, conforme será indicado para cada resultado de experimento apresentado. A concentração típica de proteína usada foi de 0,18 mg mL^{-1} (O.D. = 0,2). A reação foi iniciada pela adição de GTP à mistura e incubada a 28 °C. Aliquotas de 25 μL foram coletadas do tubo de reação em diferentes intervalos de tempo, colocadas em tubos *ependorf* e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para parar a atividade da enzima. Antes de serem analisadas por eletroforese, as amostras foram descongeladas, equilibradas à temperatura ambiente agitadas em vortex e centrifugadas para evitar que qualquer partícula de precipitado fosse introduzida no capilar.

As análises de CE foram realizadas em um instrumento modelo HP 3DCE (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha) equipado com detector de absorbância com arranjo de diodos. Os analitos foram monitorados a 254 nm com largura de banda de 30 nm. As separações foram realizadas em tampão MES 50 mM, pH 6,5 sendo que as amostras foram injetadas por pressão a 50 mBar por 5 s (9 nL).

Dois métodos distintos foram usados para obter a separação de GTP e GDP. No primeiro, capilares de sílica fundida sem qualquer recobrimento interno foram empregados e a eletroforese foi realizada no modo normal (ânodo no frasco de entrada). Empregou-se uma capilar de 50 cm de comprimento (41,7 cm até o detector) e 50 μ m de diâmetro interno. A tensão aplicada foi de 28 kV e a separação dos analitos de interesse foi obtida em 6 min. No segundo método, empregou-se capilar com recobrimento interno de PVA e a eletroforese foi realizada no modo inverso (cátodo no frasco de entrada). As separações de GTP e GDP puderam ser obtidas em menos de 2 min usando um capilar de 32,5 cm de comprimento (24,2 cm até o detector) e 50 μ m de diâmetro interno com uma tensão aplicada de 25 kV. Para o capilar sem recobrimento interno, antes de iniciar cada ciclo de análises, realizou-se uma lavagem com NaOH 0,1 M e água por 10 min cada. Antes de cada injeção, foi realizada etapa de pré-condicionamento lavando o capilar por 0,5 min com NaOH seguido de água por mais 1 min e tampão de separação por 1,5 min. No caso do capilar com recobrimento de PVA, a lavagem inicial foi feita com água por 10 min e a etapa de pré-condicionamento foi realizada com água por 1 min e tampão de separação por 2 min.

As concentrações de GDP e GTP foram determinadas pela área relativa dos picos. A área total, ou seja, a soma das áreas dos picos de GDP e GTP foram consideradas como 100% do conteúdo de nucleotídeos e igual à concentração nominal da solução preparada. A área do pico de GDP foi então designada como a proporção percentual de GDP formado (GTP hidrolisado). Este procedimento dispensa a construção de curvas de calibração e previne desvios devidos à diferença de volume injetado. Quando necessário, a concentração de GDP residual nas preparações de GTP foi determinada em experimentos controle para correção dos valores de GDP provenientes da reação enzimática apenas.

Para medir a taxa de conversão do substrato e determinar a velocidade inicial de reação, a concentração de GDP produzido foi colocada num gráfico em função do tempo de reação. A velocidade inicial V_0 foi determinada pela declividade da reta ajustada à porção

linear dos pontos experimentais naquele gráfico. De posse dos valores de V_0 para uma série de concentrações de substrato, foi construído então um gráfico de Michaelis-Menten, ou seja $V_0 \times [\text{GTP}]$. Aos pontos experimentais nesse gráfico ajustou-se uma função hiperbólica retangular cujos parâmetros são equivalentes à velocidade máxima e à constante de Michaelis-Menten. Os dois procedimentos de ajuste linear e não linear foram feitos usando o programa Microcal Origin 6.0 (Microcal Software, Northampton, MA, USA).

Resultados e discussão

A técnica de eletroforese capilar mostrou-se perfeitamente capaz de substituir o método radioativo usado tradicionalmente para detectar atividade GTPase. Os dois métodos desenvolvidos neste estudo, tanto para capilares sem recobrimento interno quanto para os recobertos com PVA, mostraram-se robustos e adequados para a utilização na caracterização deste tipo de reação enzimática. Na Figura 28 são apresentados três eletroferogramas sobrepostos, os quais se referem às análises realizadas em capilares de sílica fundida sem recobrimento interno. Os resultados mostram uma reação catalisada pela enzima em dois momentos distintos para mostrar o avanço da reação e a comparação com uma reação controle cuja mistura não contém Mg^{2+} .

Figura 28. Ensaio de atividade GTPase da GST-rDGTPase por eletroforese capilar usando o método para capilares sem recobrimento interno. Os eletroferogramas são de alíquotas retiradas das misturas de reação contendo 0,1 mg/mL de proteína e 5 mM de GTP. Em preto, sem Mg^{2+} após 12 h de incubação, em vermelho, com 1 mM de Mg^{2+} após 2 h de incubação e em azul, com 1 mM de Mg^{2+} após 9 h de incubação.

Na Figura 29 apresenta-se um exemplo de análises de GTP e GDP em alíquotas retiradas de uma reação em diferentes intervalos de tempo. A separação foi feita em capilar recoberto com PVA em que foi possível obter separação em 1,7 min.

Figura 29. Hidrólise de GTP catalisada por enzima, monitorada por meio de eletroforese capilar. GST-rDGTPase (0,25 mg/mL) foi incubada com 500 μ M de GTP e 1 mM de $MgCl_2$. Alíquotas foram coletadas após diferentes tempos de incubação e analisadas pelo método descrito para capilares com recobrimento interno de PVA.

Com o intuito de acelerar o procedimento analítico em estudos aplicados à caracterização de cinética enzimática foram feitas algumas simplificações no procedimento que seria realizado normalmente através da determinação, com exatidão, da concentração absoluta dos analitos. O procedimento padrão recomendado em química analítica seria a construção de curvas analíticas. Especialmente em se tratando de CE, o uso de um padrão interno seria altamente recomendado para corrigir variações da quantidade de amostra injetada. No caso de estudos cinéticos, mais ainda em se tratando de substituir métodos pouco precisos como a detecção de bandas por marcação isotópica em cromatografia de camada delgada, a dispensa do rigor analítico pode ser justificada se o ganho em

processamento for significativo. No método descrito nesta tese, o GTP convertido em GDP foi determinado de forma relativa, normalizando-se a área do pico pela área total, fruto da soma das áreas dos picos de GDP e GTP. Dessa maneira, corrigem-se possíveis variações da quantidade de amostra injetada e a quantidade de GTP convertido pode ser expressa tanto em percentual quanto em concentração. No segundo caso, o percentual deve ser associado à quantidade inicial de GTP que deve ser conhecida. Esta aproximação se baseia no fato de que o GDP é o único produto de reação possível e que a quantidade de GTP ou GDP ligados à proteína no momento da medição é desprezível.

Na faixa estudada de concentração inicial de GTP que foi de 0,5 a 4 mM, foi possível detectar variações de concentração de GDP formado da ordem de 10^{-5} M, o que foi bastante satisfatório para o tipo de aplicação desejada. Dentro desta faixa de concentração e empregando-se 0,184 mg/mL de proteína, a menor atividade foi detectável após 30 min de reação. Neste intervalo de tempo, a concentração de GTP variou de $7,36 \times 10^{-3}$ mM para $2,15 \times 10^{-2}$ mM. Expressando este resultado em atividade, ou seja, a quantidade mínima de enzima necessária para converter 1 μ mol de GTP em um minuto, chegou-se ao valor de 6,6 μ M de proteína. Isto significa que é necessário ter 6,6 μ M de enzima na reação para detectar atividade após 30 min.

O GTP usado neste trabalho foi de grau de pureza analítico e não foi realizado qualquer processo de purificação antes de seu emprego nas reações. Todo o GTP testado para uso neste o estudo (diferentes fornecedores, amostras armazenadas a tempo ou mesmo as provenientes de frascos recém abertos) apresentou pequenas quantidades de GDP residual, possivelmente fruto de hidrólise espontânea. Devido a isso, a concentração inicial de GDP em cada experimento de determinação de v_0 não foi constante e tampouco nula como pode ser constatado comparando as curvas para 1 e 4 mM de concentração inicial de GTP (Figura 30 A). Em média, a concentração de GDP residual foi de cerca de 5% e assumimos que esta quantidade, bem menor que a de GTP, substrato da enzima, não é

capaz de afetar significativamente a cinética da reação. Quando o objetivo da análise for a determinação exata da quantidade de GDP produzido na reação, o GDP residual deverá ser cuidadosamente quantificado em experimentos controle e então subtraído da medida observada para a reação. Entretanto, no caso de estudos cinéticos, a concentração inicial de GDP, contanto que seja pequena, não chega a afetar a determinação da velocidade inicial de reação já que ela é medida pela declividade da reta que não depende da concentração em tempo zero (Figura 30 A). Neste caso, não há necessidade de medir a concentração inicial de GDP senão com o intuito de garantir que esta concentração seja mesmo pequena.

Apesar de o método ter proporcionado separações tão rápidas quanto 1,7 min a construção de um gráfico de Michaelis-Menten ainda é uma tarefa bastante laboriosa. Um gráfico de Michaelis-Menten com cinco pontos requer o mesmo número de reações cada qual com uma concentração inicial de GTP. Cada reação será monitorada em pelo menos seis tempos diferentes o que totaliza trinta análises. Além disso, é recomendável que se faça um experimento controle, sem a enzima, para cada reação, dos quais são retiradas três alíquotas em tempos inicial, mediano e final, adicionando mais quinze análises. Somando-se as análises, chega-se ao número de quarenta e cinco corridas. Cada separação leva menos de 2 min, mas contando-se os tempos de injeção e pré-condicionamento do capilar, cada análise toma cerca de 6 min o que dá um total de 5 h apenas de funcionamento do instrumento CE. Mesmo assim, com as facilidades das ferramentas de programação para seqüências de análises no instrumento, é possível iniciar a rotina e deixar que o instrumento realize a tarefa de analisar as quarenta e cinco amostras sem a presença constante do pesquisador.

Com respeito ao estudo de caso, este é o primeiro trabalho a empregar a técnica de eletroforese capilar para comprovar a atividade GTPase de uma septina e fazer caracterizações cinéticas básicas. Até onde se sabe não há valores publicados para as

mesmas constantes medidas neste estudo e que poderiam permitir comparações. Porém, pode-se discutir variações hipotéticas de valores em comparação à forma selvagem da septina humana. Essas variações dever-se-iam basicamente a dois fatores: i) a caracterização da atividade foi realizada utilizando-se uma proteína recombinante construída com a fusão de GST com o suposto domínio catalítico da septina humana; e ii) não se pode descartar a possibilidade de existirem fatores de troca de nucleotídeos que interfiram na entrada do substrato ou saída do produto de hidrólise do sítio ativo da enzima.

A proteína recombinante em fusão mostrou-se relativamente estável apresentando atividade mesmo após 48 h do final do processo de purificação⁴⁶, quando mantida em gelo. Especialmente por este motivo ela foi usada como modelo neste estudo.

Em relação aos fatores que poderiam interferir na atividade da enzima, sabe-se que outras GTPases necessitam de proteínas auxiliares para realizarem o ciclo catalítico.⁵⁰ De fato não há descrição até o momento de fatores de troca de nucleotídeos para septinas⁵¹ e o fato de ter sido possível observar a atividade da enzima purificada indica ao menos que um fator auxiliar não é imprescindível. No entanto, não se pode descartar a possibilidade de haver algum e por este motivo, foi decidido empregar o termo “aparente” para as constantes cinéticas determinadas *in vitro*.

Os valores médios dos parâmetros cinéticos determinados foram os seguintes: $V_{\max} = 1,7 \mu\text{M min}^{-1} \pm 0,1$ e $K_m = 1,0 \text{ mM} \pm 0,3$; $K_{\text{cat}} = 9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ e os gráficos com os quais se chegou a estes resultados são apresentados na Figura 30.

Figura 30. Exemplo do método gráfico usado para os estudos de cinética enzimática. A concentração de GDP na mistura de reação foi determinada por eletroforese capilar colocada, em um gráfico, em função do tempo de reação, (A) para 1 mM (quadrados) e 4 mM (círculos) de GTP, ambos na presença de 1 mM de MgCl_2 . A concentração de proteína no ensaio foi de 0,184 mg/mL ($\sim 3,1 \mu\text{M}$). Uma reta foi ajustada à parte linear dos pontos experimentais fornecendo, pela sua declividade, a velocidade inicial de reação, v_0 . (B) Gráfico de Michaelis-Menten apresentando a velocidade inicial de reação em função da concentração de substrato. Os parâmetros K_m e $V_{\max}$, foram obtidos por regressão não-linear usando um função hiperbólica retangular ajustada aos pontos experimentais. Dois experimentos, realizados em dias e com lotes diferentes de proteína estão sobrepostos na Figura. Os parâmetros cinéticos calculados para estes dois experimentos foram os seguintes: (lozango e linha cheia) $V_{\max} = 1,7 \mu\text{M min}^{-1} \pm 0,1$ e $K_m = 1,1 \text{ mM} \pm 0,3$; (círculos e linha tracejada) $V_{\max} = 1,7 \mu\text{M min}^{-1} \pm 0,1$ e $K_m = 1,0 \text{ mM} \pm 0,2$.

As constantes determinadas para a GST-rDGTPase diferem um pouco das mesmas medidas determinadas para a septina recombinante inteira⁴⁶: $K_m = 2,0 \text{ mM}$; $k_{cat} = 0,25 \text{ s}^{-1}$. O k_{cat} da proteína inteira é aproximadamente 25 vezes maior que o da GST-rDGTPase. Isto significa que a proteína inteira parece ser capaz de converter 25 moléculas de GTP enquanto a construção contendo o domínio catalítico converte uma.

Uma maneira mais adequada de comparar duas enzimas atuando sobre um mesmo substrato é através da constante de especificidade, definida pela razão k_{cat}/K_m . O cálculo desta constante gerou os seguintes valores: $0,1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ para GST-rDGTPase e de $9 \times 10^{-3} \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ para a proteína inteira. A constante de especificidade da septina é pelo menos dez vezes maior que a construção contendo apenas o domínio catalítico, ou seja, a proteína integral é mais ativa. Esta diferença observada não pode ser considerada grande já que há relatos na literatura de que a mutação de um único aminoácido no sítio ativo de uma enzima provoca diferenças de 10^2 a 10^4 vezes na constante de afinidade.⁵² Outro dado relatado na literatura que pode ser comparado ao observado aqui é que uma GTPase apresentou uma diferença de 13 vezes na constante de especificidade quando GTP e XTP foram comparados como substratos para a GTPase. Esta diferença foi considerada baixa pelos autores.⁵³

O motivo exato da diferença de especificidade e eficiência da enzima ainda não pôde ser elucidado, mas algumas especulações podem ser feitas. A septina contém domínios adicionais, além do domínio GTPase, os quais podem ter funções bioquímicas relacionadas à hidrólise do GTP. Por exemplo, sabe-se que há domínios de ligação à membrana e foi observada a propriedade da septina de formar filamentos, possivelmente através da oligomerização.⁵⁴ Ainda não se sabe como estas funções podem estar relacionadas à hidrólise de GTP, mas a eficiência da ligação ao GTP e liberação de GDP pode ser facilitada por mudanças conformacionais nestes outros domínios, ausentes na GST-rDGTPase.

Finalmente, existe a possibilidade de que a simples presença da proteína GST em fusão com o domínio esteja prejudicando sensivelmente a atividade da enzima.

Uma boa parte deste estudo com a GTPase foi ocupado não com a determinação de constantes cinéticas mas na caracterização da dependência da atividade com o co-fator magnésio. A exemplo do comportamento de várias outras GTPases,^{55,56} a atividade da GST-rDGPase é dependente da presença do cátion divalente. Na ausência de Mg^{2+} não se observou atividade enzimática. Além disso, o cátion Mn^{2+} foi capaz de substituir o Mg^{2+} na ativação da hidrólise, porém, em menor extensão (Figura 31).

Figura 31. Percentual de GDP após reação catalisada por GST-rDGPase, para alíquotas coletadas em diferentes intervalos de tempo, comparando o efeito de 0,5 mM $MgCl_2$ ou $MnCl_2$ com a mistura controle (sem co-fator). As reações foram feitas com 3 mM de GTP e concentração de proteína de 0,18 mg/mL.

O papel do magnésio na reação pode não apenas estar limitado à ativação da enzima, mas também parece ter função regulatória. Na presença de excesso de cátion, a atividade da enzima diminuiu. Na Figura 32.A apresenta-se a variação da velocidade inicial de reação com a concentração de magnésio. Em concentrações superiores 2,5 mM (em

reação contendo 3 mM de GTP) a atividade começa a cair. Na busca de uma explicação para esta observação, percebemos que havia uma dependência interessante, não relativa à concentração absoluta de Mg^{2+} , mas relativa à concentração de GTP. Esta tendência pode ser claramente observada na Figura 32.B em que os mesmos dados são colocados num gráfico de v_0 em função da concentração relativa $[GTP]/[Mg^{2+}]$. A ativação ótima da enzima ocorre para $[GTP]/[Mg^{2+}]$ entre 1 e 4, sendo que fora desta faixa velocidade inicial diminui. A atividade máxima corresponde a grosso modo à situação em que há pelo menos um Mg^{2+} para cada GTP

Figura 32. Dependência da catálise enzimática em função da concentração de magnésio. (A) velocidade inicial de reação em função da concentração de Mg^{2+} . As misturas de reação continham 3 mM de GTP, 0,18 mg/mL de proteína e a concentração de magnésio variada. Note-se que o eixo x está em escala logarítmica. (B) Os mesmos dados apresentados agora em função da razão de concentrações de GTP e Mg^{2+} .

Com a observação de que o Mn^{2+} também foi capaz de ativar a enzima abriu-se a possibilidade para a realização de ensaios usando a técnica de ressonância paramagnética eletrônica (EPR)⁵⁷ o que foi realizado por colaboradores⁴⁶ deste estudo com o objetivo de medir a ligação destes íons ao GTP e à proteína. Os resultados de uma investigação preliminar mostraram que os íons Mn^{2+} ligam-se preferencialmente ao GTP em comparação à GST-rDGTPase. A adição GTP em quantidade equimolar à solução de Mn^{2+} extinguiu completamente o sinal de EPR observado para este íon livre em solução indicando que provavelmente todos os estavam ligados a um GTP. Por outro lado, quantidade equimolar de proteína causou apenas uma diminuição parcial do sinal do Mn^{2+} livre. Estes indícios corroboram com um modelo simples que poderia explicar o papel do Mg^{2+} na ativação e inibição (quando presente em altas proporções). O modelo é baseado no fato de que algumas GTPases necessitam que o GTP esteja ligado ao Mg^{2+} para que este se ligue ao sítio ativo.⁵⁶ Desta forma, pode-se imaginar que a atividade ótima ocorra quando cada molécula de GTP está ligada a um íon Mg^{2+} . Para razões $[GTP]/[Mg^{2+}]$ muito altas, por exemplo, acima de quatro, a concentração de Mg^{2+} é muito pequena para garantir que cada GTP que “encontra” a enzima esteja apto a ligar-se a ela. Por isso a atividade seria menor. Já na situação oposta, quando há Mg^{2+} suficiente para saturar o GTP e ainda ficar livre em solução, este cátion poderia difundir para o interior do sítio ativo, ligando-se à proteína e impedindo, por efeito eletrostático ou espacial, que o GTP se ligasse à enzima. Uma vez que a afinidade do Mn^{2+} é maior pelo GTP que pela proteína, pode-se supor que sua ligação à proteína, inibindo a atividade, ocorrerá apenas a partir do ponto em que sua concentração for superior à de GTP. Na Figura 32.B nota-se justamente um diminuição de v_0 para valores de $[GTP] / [Mg^{2+}] < 1$. Como foram empregadas quantidades muito pequenas de enzima nos experimentos para garantir a condição de concentração da enzima muito menor que a de substrato, necessárias para estudos de estado estacionário, pequenas quantidades de Mg^{2+} , acima de $[GTP] / [Mg^{2+}] = 1$ já afetam significativamente a velocidade de reação. Este

modelo ainda requer novos experimentos para ser comprovado e ainda está sob investigação.

O método descrito aqui se mostrou potencialmente útil para aplicação não apenas a GTPases mas também para sistema em que a transformação de algum nucleotídeo seja convertido da sua forma trifosfato para difosfato. Na Figura 33 são apresentadas separações de outros nucleotídeos como ATP e γ SGTP.

Figura 33. Eletroforese capilar de (A) γ SGTP/GDP, (B) ATP/ADP e (C) GTP/GDP seguindo as condições descritas para o método desenvolvido para capilar com recobrimento interno de PVA. As amostras foram preparadas originalmente com 5 mM dos trifosfatos de cada nucleotídeo. Antes de serem analisadas, as amostras ficaram armazenadas nas seguintes condições: γ SGTP ficou a -20°C por mais de seis meses; GTP foi preparado pouco antes da análise e ATP ficou a 7°C por duas semanas. Sob estas condições, em todos os casos, foi detectado um pico correspondente ao difosfato do respectivo nucleotídeo.

Conclusão e Perspectivas

Foi desenvolvido um método analítico baseado em eletroforese capilar, o qual permitiu separações das formas di- e trifosfato de nucleotídeos. O método contém simplificações no procedimento de quantificação que o tornam adequado para a realização de estudos cinéticos e monitoração de atividade enzimática de trifosfatases, reduzindo o tempo total dos experimentos. O método foi aplicado ao estudo de uma septina humana recombinante que apresenta características estruturais de uma GTPase e a atividade enzimática foi detectada e caracterizada com respeito a parâmetros cinéticos como as constantes de Michaelis-Menten, de catálise e de especificidade. Além disso, o método serviu para descrever a influência do co-fator Mg^{2+} na velocidade de reação levando inclusive à proposição inicial de um modelo para explicar a inibição a atividade observada para concentrações altas deste co-fator.

Há perspectivas de novos estudos aplicados visando a caracterização da atividade enzimática da proteína sobre outros nucleotídeos e também o efeito de mutações sítio-dirigidas na proteína. O método poderá se tornar uma ferramenta bastante útil no estudo destas proteínas substituindo o método clássico que emprega material radioativo. Devido à relativa facilidade de execução dos ensaios e robustez do método será possível padronizar o procedimento para quantificação de atividade em qualquer amostra contendo a enzima, inclusive ao longo do processo de expressão e purificação da proteína ou em amostras armazenadas, submetidas a modificações químicas ou sob condições especiais.

Referências Bibliográficas

- [1] TAVARES, M.F.M. Capillary Electrophoresis: Basic concepts. *Química Nova*, v.19, n.2, p.173-181, 1996.
- [2] TAVARES, M.F.M. Separation mechanisms in capillary electrophoresis. *Química Nova*, v.20, n.5, p.493-511, 1997.
- [3] ZUBRINSKY, E. How analytical chemists saved the human genome project *Analytical Chemistry*, v.74, n.1, p.23A-26A, 2002.
- [4] HARRISON, D.J.; FLURI, K.; SEILER, K.; FAN, Z.H.; EFFENHAUSER, C.S.; MANZ, A. Micromachining a miniaturized capillary electrophoresis-based chemical-analysis system on a chip. *Science*, v.261, n.5123, p.895-897, 1993.
- [5] REYES, D.R.; IOSSIFIDIS, D.; AUROUX, P.; MANZ, A. A Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. *Analytical Chemistry*, v.74, n.12, p.2623-2636, 2002.
- [6] AUROUX, P.; IOSSIFIDIS, D.; REYES, D.R.; MANZ, A. A Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications. *Analytical Chemistry*, v.74, n.12, p. 2637-2652, 2002.
- [7] VILKNER, T.; JANASEK, D.; MANZ, A. Micro total analysis systems. Recent developments *Analytical Chemistry*, v.76, n.12, 3373-3386, 2004.
- [8] BILITEWSKI, U.; GENRICH, M.; KADOW, S.; MERSAL, G. Biochemical analysis with microfluidic systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.377, n.3, p.556-569, 2003.
- [9] LANDERS, J.P. Molecular diagnostics on electrophoretic microchips. *Analytical Chemistry*, v.75, n.12, p.2919-2927, 2003.
- [10] MOXLEY, R.A.; JARRETT, H.W.; MITRA, S. Methods for transcription factor separation *Journal of Chromatography B*, v.797, n.1-2, p.269-288, 2003.
- [11] Gel Shift Assay System, Promega Technical Bulletin n.110. www.promega.com

- [12] LUDWIG, L.B.; HUGHES, B.J.; SCHWARTZ, S.A. Biotinylated probes in the electrophoretic mobility shift assay to examine specific dsDNA, ssDNA or RNA-protein interactions *Nucleic Acids Research*, v.23, n.18, p.3792-3793, 1995.
- [13] SUSKE, G.; GROSS, B.; BEATO, M. Non-Radioactive method to visualize specific DNA-protein interactions in the band shift assay *Nucleic Acids Research*. v.17, n.11, p.4405-4405, 1989.
- [14] ONIZUKA, T.; ENDO, S.; HIRANO, M.; KANAI, S.; AKIYAMA, H. Design of a fluorescent electrophoretic mobility shift assay improved for the quantitative and multiple analysis of protein-DNA complexes *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. v.66, n.12, p.2732-2734, 2002.
- [15] JING, D.; BEECHEM, J.M.; PATTON, W.F. The utility of a two-color fluorescence electrophoretic mobility shift assay procedure for the analysis of DNA replication complexes *Electrophoresis* v.25, n.15, p.2439–2446, 2004.
- [16] STEBBINS, M.A.; HOYT, A.A.; SEPANIAK, M.J.; HURLBURT, B.K. Design and optimization of a capillary electrophoretic mobility shift assay involving trp repressor-DNA complexes *Journal of Chromatography B* v.683, n.1, p.77-84, 1996.
- [17] TANAKA, Y.; TERABE, S. Estimation of binding constants by capillary electrophoresis *Journal of Chromatography A* v.768, n.1, p.81-92, 2002.
- [18] RONAI, Z.; WANG, Y.; KHANDURINA, J.; BUDWORTH, P.; SASVARI-SZEKELY, M.; WANG, X.; GUTTMAN, A. Transcription factor binding study by capillary zone electrophoretic mobility shift assay *Electrophoresis* v.24, n.1-2, p.96–100, 2003.
- [19] FOULDS, G.J.; ETZKORN, F.A. A capillary electrophoresis mobility shift assay for protein–DNA binding affinities free in solution *Nucleic Acids Research* v.26, n.18, p.4304–4305, 1998.
- [20] XIAN, J.; HARRINGTON, M.G.; DAVIDSON, E.H. DNA–protein binding assays from a single sea urchin egg: A high-sensitivity capillary electrophoresis method *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* v.93, n.1 p.86–90, 1996.

- [21] CLARK, J.; SHEVCHUK, T.; SWIDERSKI, P.; DABUR, R.; CROCITTO, L.E.; BURYANOV, Y.I.; SMITH, S.S. Mobility-shift analysis with microfluidics chips *Biotechniques* v.35, n.3 p.548-554, 2003.
- [22] Reagent Kit Guide DNA 7500 and 12000 Assay, Agilent Technologies, www.agilent.com
- [23] “2100 expert” software manual, Ed: November 2003, Agilent Technologies, www.agilent.com
- [24] LOHMAN, T.M. Kinetics of protein-nucleic acid interactions - use of salt effects to probe mechanisms of interaction *CRC Critical Reviews in Biochemistry* v.19, n.3, p.191-245, 1986.
- [25] GARNER, M.M. Electrophoretic studies of DNA-protein interactions, In: Advances in Electrophoresis Ed. Chrambach, A.; Dunn, J.J.; Radola B.J. v.5, p.137.
- [26] Reagent Kit Guide Protein 200 Plus Assay, Agilent Technologies, www.agilent.com
- [27] LIN, B. Gel shift analysis with Human Recombinant AP1(c-jun): The effect of poly d(I-C) on specific complex formation *Promega Notes Magazine* n.37, p.14-19, 1992.
- [28] ABATE, C.; BAKER, S.J.; LEES-MILLER, S.P.; ANDERSON, D.R.M.; CURRAN, T. Dimerization and DNA binding alter phosphorylation of Fos and Jun *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* v.90, n.14 p.6766-6770, 1993.
- [29] KALODIMOS, C.G.; BIRIS, N.; BONVIN, A.M.J.J.; LEVANDOSKI, M.M.; GUENNUEGUES, M.; BOELEN, R.; KAPTEIN, R. Structure and Flexibility Adaptation in Nonspecific and Specific Protein-DNA Complexes *Science* v.305, n.5682, p.386-389, 2004.
- [30] MEJILANO, M.R.; SHIVANNA, B.D.; HIMES, R.H. Studies on the nocodazole-induced GTPase activity of tubulin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* v.336, n.1, p.130-138, 1996.
- [31] BHULLAR, R.P.; SENEVIRATNE, H.D. Characterization of human platelet GTPase activating protein for the Ral GTP-binding protein *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* v.1311, n.3, p.181-188, 1996.

- [32] OKADA, D.; TSUKIDA, K.; IKAI, A. Functional properties of cattle rhodopsin in soluble complex with phospholipids and deoxycholate *Photochemistry and Photobiology* v.42, n.4, p.405-411, 1985.
- [33] BINNS, D.D.; HELMS, M.K.; BARYLKO, B.; DAVIS, C.T.; JAMESON, D.M.; ALBANESI, J.P.; ECCLESTON, J.F. The mechanism of GTP hydrolysis by dynamin II: A transient kinetic study *Biochemistry* v.39, n.24, p.7188-7196, 2000.
- [34] TSUDA, T.; NAKAGAWA, G.; SATO, M.; YAGI, K. Separation of nucleotides by high-voltage capillary electrophoresis *Journal of Applied Biochemistry* v.59, n.4-5, p.330-336, 1983.
- [35] UHROVA, M.; DEYL, Z.; SUCHANEK, M. Separation of common nucleotides, mono-, di- and triphosphates, by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B* v.681, n.1 p.99-105, 1996.
- [36] GELDART, S.E.; BROWN, P.R. Analysis of nucleotides by capillary electrophoresis *Journal of Chromatography A* v.828, n.1-2, p.317–336, 1998.
- [37] QURISHI, R.; KAULICH, M.; MULLER, C.E. Fast, efficient capillary electrophoresis method for measuring nucleotide degradation and metabolism *Journal of Chromatography A* v.952, n.1-2, p.275–281, 2002.
- [38] KAWATA, H.; KURODA, K.; ENDO, Y.; INOUE, Y.; ENDO, G. Simple and rapid determination of GTPase activity by capillary electrophoresis without radioisotope *Tohoku Journal of Experimental Medicine* v.192, n.1, p.67-79, 2000.
- [39] BYERS, B.; GOETSCH, L. A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. *Journal of Cell Biology* v.69, n.3, p.717–721, 1976.
- [40] FIELD, C.M.; AL-AWAR, O.; ROSENBLATT, J.; WONG, M.L.; ALBERTS, B.; MITCHISON, T.J. A purified *Drosophila* septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity *Journal of Cell Biology* v.133, n.3, p.605–616, 1996.
- [41] FRAZIER, J.A.; WONG, M.L.; LONGTINE, M.S.; PRINGLE, J.R.; MANN, M.; MITCHISON, T.J.; FIELD, C. Polymerization of purified yeast septins: evidence that organized filament arrays may not be required for septin function *Journal of Cell Biology* v.143, n.3, p.737–749, 1998.

- [42] MACARA, I.G.; BALDARELLI, R.; FIELD, C.M.; GLOTZER, M.; HAYASHI, Y.; HSU, S.C.; KENNEDY, M.B.; KINOSHITA, M.; LONGTINE, M.; LOW, C.; MALTAIS, L.J.; MCKENZIE, L.; MITCHISON, T.J.; NISHIKAWA, T.; NODA, M.; PETTY, E.M.; PEIFER, M.; PRINGLE, J.R.; ROBINSON, P.J.; ROTH, D.; RUSSELL, S.E.; STUHLMANN, H.; TANAKA, M.; TANAKA, T.; TRIMBLE, W.S.; WARE, J.; ZELEZNIK-LE, N.J.; ZIEGER, B. Mammalian septins nomenclature *Molecular Biology of the Cell* v.13, n.12, p.4111–4113, 2002.
- [43] KARTMANN, B.; ROTH, D. Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis *Journal of Cell Science* v.114, n.5, p.839-844, 2001.
- [44] TANAKA, M.; TANAKA, T.; KIJIMA, H.; ITOH, J.; MATSUDA, T.; HORI, S.; YAMAMOTO, M. Characterization of tissue- and cell-type-specific expression of a novel human septin family gene, Bradeion *Biochemical and Biophysical Research Communications* v.286, n.3, p.547-553, 2001.
- [45] TANAKA, T.; KIJIMA, H.; ITOH, J.; MATSUDA, T.; TANAKA, T. Impaired expression of a human septin family gene Bradeion inhibits the growth and tumorigenesis of colorectal cancer *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Gene Therapy* v.9, n.6, p.483-488, 2002.
- [46] DA SILVA, W.J.G. *Estudos estruturais e bioquímicos das Septinas Humanas Bradeiona α e β* . São Carlos, 2005. 112p. Tese (Doutorado) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- [47] BOURNE, H.R.; SANDERS, A.D.; MCCORMICK, F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism *Nature* v.349, n.6305, p.117-127, 1991.
- [48] NELSON, D.L.; COX, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3.ed. New York, Worth Publishers, 2000. Cap.8, p.243-292: Enzymes.
- [49] GILL, S.C.; VON HIPPEL, P.H. Calculation of proteins extinction coefficients from amino-acid sequence data *Analytical Biochemistry* v.182, n.2, p.319-326, 1989.
- [50] PAN, J.Y.; SANFORD, J.C.; WESSLING-RESNICK, M. Influence of Mg^{2+} on the structure and function of Rab5 *Journal of Biological Chemistry* v.271, n.3, p.1322-1328, 1996.

- [51] FIELD, C.M.; KELLOGG, D., Septins: cytoskeletal polymers or signaling GTPases? *Trends in Cell Biology* v.9, n.10, p.387-394, 1999.
- [52] BISHOP, A.; BUZKO, O.; HEYECK-DUMAS, S.; JUNG, I.; KRAYBILL, B.; LIU, Y.; SHAH, K.; ULRICH, S.; WITUCKI, L.; YANG, F.; ZHANG, C.; SHOKAT, K.M. Unnatural ligands for engineered proteins: new tools for chemical genetics *Annual Review of Biophysics And Biomolecular Structure* v.29, p.577-606, 2000.
- [53] SHAN, S.; WALTER, P. Induced nucleotide specificity in a GTPase *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* v.100, n.8, p.4480-4485, 2003.
- [54] ZHANG, J.S.; KONG, C.; XIE, H.; MCPHERSON, P.S.; GRINSTEIN, S.; TRIMBLE, W.S. Phosphatidyl inositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP *Current Biology* v.9, n.24, p.1458-1467, 1999.
- [55] ZHANG, B.L.; ZHANG, Y.Q.; WANG, Z.X.; ZHENG, Y. The role of Mg²⁺ cofactor in the guanine nucleotide exchange and GTP hydrolysis reactions of Rho family GTP-binding proteins *Journal of Biological Chemistry* v.275, n.33, p.25299-25307, 2000.
- [56] ZHAO, J.; WANG, W.N.; TAN, Y.C.; ZHENG, Y.; WANG, Z.X. Effect of Mg(2+) on the kinetics of guanine nucleotide binding and hydrolysis by Cdc42. *Biochemical and Biophysical Research Communications* v.297, n.3, p.653-658, 2002.
- [57] SCHNEIDER, B.; SIGALAT, C.; AMANO, T.; ZIMMERMANN, J-L. Evidence for changes in the nucleotide conformation in the active site of H⁺-ATPase as determined by pulsed EPR spectroscopy *Biochemistry* v.39, n. 50, p.15500-15512, 2000.

-
- [1] TAVARES, M.F.M. Capillary Electrophoresis: Basic concepts. *Química Nova*, v.19, n.2, p.173-181, 1996.
- [2] TAVARES, M.F.M. Separation mechanisms in capillary electrophoresis. *Química Nova*, v.20, n.5, p.493-511, 1997.
- [3] ZUBRINSKY, E. How analytical chemists saved the human genome project *Analytical Chemistry*, v.74, n.1, p.23A-26A, 2002.
- [4] HARISSON, D.J.; FLURI, K.; SEILER, K.; FAN, Z.H.; EFFENHAUSER, C.S; MANZ, A. Micromachining a miniaturized capillary electrophoresis-based chemical-analysis system on a chip. *Science*, v.261,n.5123, p.895-897, 1993.
- [5] REYES, D.R.; IOSSIFIDIS, D.; AUROUX, P.; MANZ, A. A Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. *Analytical Chemistry*, v.74, n.12, p.2623-2636, 2002.
- [6] AUROUX, P.; IOSSIFIDIS, D.; REYES, D.R.; MANZ, A. A Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications. *Analytical Chemistry*, v.74, n.12, p. 2637-2652, 2002.
- [7] VILKNER, T.; JANASEK, D.; MANZ, A. Micro total analysis systems. Recent developments *Analytical Chemistry*, v.76, n.12, 3373-3386, 2004.
- [8] BILITEWSKI, U.; GENRICH, M.; KADOW, S.; MERSAL, G. Biochemical analysis with microfluidic systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.377, n.3, p.556-569, 2003.
- [9] LANDERS, J.P. Molecular diagnostics on electrophoretic microchips. *Analytical Chemistry*, v.75, n.12, p.2919-2927, 2003.
- [10] MOXLEY, R.A.; JARRETT, H.W.; MITRA, S. Methods for transcription factor separation *Journal of Chromatography B*, v.797, n.1-2, p.269–288, 2003.
- [11] Gel Shift Assay System, Promega Technical Bulletin n.110. www.promega.com
- [12] LUDWIG, L.B.; HUGHES, B.J.; SCHWARTZ, S.A. Biotinylated probes in the electrophoretic mobility shift assay to examine specific dsDNA, ssDNA or RNA-protein interactions *Nucleic Acids Research*, v.23, n.18, p.3792-3793, 1995.

- [13] SUSKE, G.; GROSS, B.; BEATO, M. Non-Radioactive method to visualize specific DNA-protein interactions in the band shift assay *Nucleic Acids Research*. v.17, n.11, p.4405-4405, 1989.
- [14] ONIZUKA, T. ENDO, S. HIRANO, M. KANAI, S. AKIYAMA, H. Design of a fluorescent electrophoretic mobility shift assay improved for the quantitative and multiple analysis of protein-DNA complexes *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. v.66, n.12, p.2732-2734, 2002.
- [15] JING, D.; BEECHEM, J.M.; PATTON, W.F. The utility of a two-color fluorescence electrophoretic mobility shift assay procedure for the analysis of DNA replication complexes *Electrophoresis* v.25, n.15, p.2439–2446, 2004.
- [16] STEBBINS, M.A, HOYT, A.A., SEPANIAK, M.J., HURLBURT, B.K. Design and optimization of a capillary electrophoretic mobility shift assay involving trp repressor-DNA complexes *Journal of Chromatography B* v.683, n.1, p.77-84, 1996.
- [17] TANAKA, Y., TERABE, S. Estimation of binding constants by capillary electrophoresis *Journal of Chromatography A* v.768, n.1, p.81-92, 2002.
- [18] RONAI, Z, WANG, Y, KHANDURINA, J., BUDWORTH, P., SASVARI-SZEKELY, M., WANG, X., GUTTMAN, A. Transcription factor binding study by capillary zone electrophoretic mobility shift assay *Electrophoresis* v.24, n.1-2, p.96–100, 2003.
- [19] FOULDS, G.J., ETZKORN, F.A. A capillary electrophoresis mobility shift assay for protein–DNA binding affinities free in solution *Nucleic Acids Research* v.26, n.18, p.4304–4305, 1998.
- [20] XIAN, J., HARRINGTON, M.G., DAVIDSON, E.H. DNA–protein binding assays from a single sea urchin egg: A high-sensitivity capillary electrophoresis method *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* v.93, n.1 p.86–90, 1996.
- [21] CLARK, J., SHEVCHUK, T., SWIDERSKI, P., DABUR, R., CROCITTO, L.E., BURYANOV, Y.I., SMITH, S.S. Mobility-shift analysis with microfluidics chips *Biotechniques* v.35, n.3 p.548-554, 2003.
- [22] Reagent Kit Guide DNA 7500 and 12000 Assay, Agilent Technologies, www.agilent.com
- [23] “2100 expert” software manual, Ed: November 2003, Agilent Technologies, www.agilent.com

- [24] LOHMAN, T.M. Kinetics of protein-nucleic acid interactions - use of salt effects to probe mechanisms of interaction *CRC Critical Reviews in Biochemistry* v.19, n.3, p.191-245, 1986.
- [25] GARNER, M.M. Electrophoretic studies of DNA-protein interactions, In: *Advances in Electrophoresis* Ed. Chrambach, A.; Dunn, J.J.; Radola B.J. v.5, p.137.
- [26] Reagent Kit Guide Protein 200 Plus Assay, Agilent Technologies, www.agilent.com
- [27] LIN, B. Gel shift analysis with Human Recombinant AP1(c-jun): The effect of poly d(I-C) on specific complex formation *Promega Notes Magazine* n.37, p.14-19, 1992.
- [28] ABATE, C., BAKER, S.J., LEES-MILLER, S.P., ANDERSON, D.R.M., CURRAN, T. Dimerization and DNA binding alter phosphorylation of Fos and Jun *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* v.90, n.14 p.6766-6770, 1993.
- [29] KALODIMOS, C.G., BIRIS, N., BONVIN, A.M.J.J., LEVANDOSKI, M.M, GUENNUEGUES, M., BOELEN, R. KAPTEIN, R. Structure and Flexibility Adaptation in Nonspecific and Specific Protein-DNA Complexes *Science* v.305, n.5682, p.386-389, 2004.
- [30] MEJILANO, M.R., SHIVANNA, B.D., HIMES, R.H. Studies on the nocodazole-induced GTPase activity of tubulin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* v.336, n.1, p.130-138, 1996.
- [31] BHULLAR, R.P., SENEVIRATNE, H.D. Characterization of human platelet GTPase activating protein for the Ral GTP-binding protein *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* v.1311, n.3, p.181-188, 1996.
- [32] OKADA, D., TSUKIDA, K., IKAI, A. Functional properties of cattle rhodopsin in soluble complex with phospholipids and deoxycholate *Photochemistry and Photobiology* v.42, n.4, p.405-411, 1985.
- [33] BINNS, D.D., HELMS, M.K., BARYLKO, B., DAVIS, C.T., JAMESON, D.M., ALBANESI, J.P., ECCLESTON, J.F. The mechanism of GTP hydrolysis by dynamin II: A transient kinetic study *Biochemistry* v.39, n.24, p.7188-7196, 2000.
- [34] TSUDA, T., NAKAGAWA, G., SATO, M., YAGI, K. Separation of nucleotides by high-voltage capillary electrophoresis *Journal of Applied Biochemistry* v.59, n.4-5, p.330-336, 1983.

-
-
- [35] UHROVA, M., DEYL, Z., SUCHANEK, M. Separation of common nucleotides, mono-, di- and triphosphates, by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B* v.681, n.1 p.99-105, 1996.
- [36] GELDART, S.E., BROWN, P.R. Analysis of nucleotides by capillary electrophoresis *Journal of Chromatography A* v.828, n.1-2, p.317–336, 1998.
- [37] QURISHI, R., KAULICH, M., MULLER, C.E. Fast, efficient capillary electrophoresis method for measuring nucleotide degradation and metabolism *Journal of Chromatography A* v.952, n.1-2, p.275–281, 2002.
- [38] KAWATA, H., KURODA, K., ENDO, Y., INOUE, Y., ENDO, G. Simple and rapid determination of GTPase activity by capillary electrophoresis without radioisotope *Tohoku Journal of Experimental Medicine* v.192, n.1, p.67-79, 2000.
- [39] BYERS, B., GOETSCH, L. A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. *Journal of Cell Biology* v.69, n.3, p.717–721, 1976.
- [40] FIELD, C.M., AL-AWAR, O., ROSENBLATT, J., WONG, M.L., ALBERTS, B., MITCHISON, T.J. A purified *Drosophila* septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity *Journal of Cell Biology* v.133, n.3, p.605–616, 1996.
- [41] FRAZIER, J.A., WONG, M.L., LONGTINE, M.S., PRINGLE, J.R., MANN, M., MITCHISON, T.J., FIELD, C. Polymerization of purified yeast septins: evidence that organized filament arrays may not be required for septin function *Journal of Cell Biology* v.143, n.3, p.737–749, 1998.
- [42] MACARA, I.G., BALDARELLI, R., FIELD, C.M., GLOTZER, M., HAYASHI, Y., HSU, S.C., KENNEDY, M.B., KINOSHITA, M., LONGTINE, M., LOW, C., MALTAIS, L.J., MCKENZIE, L., MITCHISON, T.J., NISHIKAWA, T., NODA, M., PETTY, E.M., PEIFER, M., PRINGLE, J.R., ROBINSON, P.J., ROTH, D., RUSSELL, S.E., STUHLMANN, H., TANAKA, M., TANAKA, T., TRIMBLE, W.S., WARE, J., ZELEZNIK-LE, N.J., ZIEGER, B. Mammalian septins nomenclature *Molecular Biology of the Cell* v.13, n.12, p.4111–4113, 2002.
- [43] KARTMANN, B., ROTH, D. Novel roles for mammalian septins: from vesicle trafficking to oncogenesis *Journal of Cell Science* v.114, n.5, p.839-844, 2001.
- [44] TANAKA, M., TANAKA, T., KIJIMA, H., ITOH, J., MATSUDA, T., HORI, S., YAMAMOTO, M. Characterization of tissue- and cell-type-specific expression of a novel human

-
- septin family gene, Bradeion *Biochemical and Biophysical Research Communications* v.286, n.3, p.547-553, 2001.
- [45] TANAKA, T., KIJIMA, H., ITOH, J., MATSUDA, T., TANAKA, T. Impaired expression of a human septin family gene Bradeion inhibits the growth and tumorigenesis of colorectal cancer *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Gene Therapy* v.9, n.6, p.483-488, 2002.
- [46] DA SILVA, W.J.G. *Estudos estruturais e bioquímicos das Septinas Humanas Bradeiona α e β* . São Carlos, 2005. 112p. Tese (Doutorado) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- [47] BOURNE, H.R., SANDERS, A.D., MCCORMICK, F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism *Nature* v.349, n.6305, p.117-127, 1991.
- [48] NELSON, D.L.; COX, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3.ed. New York, Worth Publishers, 2000. Cap.8, p.243-292: Enzymes.
- [49] GILL, S.C., VON HIPPEL, P.H. Calculation of proteins extinction coefficients from amino-acid sequence data *Analytical Biochemistry* v.182, n.2, p.319-326, 1989.
- [50] PAN, J.Y., SANFORD, J.C., WESSLING-RESNICK, M. Influence of Mg^{2+} on the structure and function of Rab5 *Journal of Biological Chemistry* v.271, n.3, p.1322-1328, 1996.
- [51] FIELD, C.M., KELLOGG, D., Septins: cytoskeletal polymers or signaling GTPases? *Trends in Cell Biology* v.9, n.10, p.387-394, 1999.
- [52] BISHOP, A., BUZKO, O., HEYECK-DUMAS, S., JUNG, I., KRAYBILL, B., LIU, Y., SHAH, K., ULRICH, S., WITUCKI, L., YANG, F., ZHANG, C., SHOKAT, K.M. Unnatural ligands for engineered proteins: new tools for chemical genetics *Annual Review of Biophysics And Biomolecular Structure* v.29, p.577-606, 2000.
- [53] SHAN, S., WALTER, P. Induced nucleotide specificity in a GTPase *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* v.100, n.8, p.4480-4485, 2003.
- [54] ZHANG, J.S., KONG, C., XIE, H., MCPHERSON, P.S., GRINSTEIN, S., TRIMBLE, W.S. Phosphatidyl inositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP *Current Biology* v.9, n.24, p.1458-1467, 1999.

-
- [55] ZHANG, B.L., ZHANG, Y.Q., WANG, Z.X., ZHENG, Y. The role of Mg^{2+} cofactor in the guanine nucleotide exchange and GTP hydrolysis reactions of Rho family GTP-binding proteins *Journal of Biological Chemistry* v.275, n.33, p.25299-25307, 2000.
- [56] ZHAO, J., WANG, W.N., TAN, Y.C., ZHENG, Y., WANG, Z.X. Effect of Mg^{2+} on the kinetics of guanine nucleotide binding and hydrolysis by Cdc42. *Biochemical and Biophysical Research Communications* v.297, n.3, p.653-658, 2002.
- [57] SCHNEIDER, B., SIGALAT, C., AMANO, T., ZIMMERMANN, J-L. Evidence for changes in the nucleotide conformation in the active site of H^{+} -ATPase as determined by pulsed EPR spectroscopy *Biochemistry* v.39, n. 50, p.15500-15512, 2000.