



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOQUÍMICA

Vania Aparecida Mareze

**Complexos modificados de cobre/ triazaciclononano e novo modelo
quimérico de nuclease artificial sítio-específico**

Florianópolis 2023

Vania Aparecida Mareze

**Complexos modificados de cobre/ triazaciclononano e novo modelo
quimérico de nuclease artificial sítio-específico**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal de Santa Catarina
como requisito parcial para a obtenção
do título de Doutora em Bioquímica.

Orientador(a): Prof.(a) Dr.Hernán Terenzi

Florianópolis 2023

Mareze, Vania Aparecida

Complexos modificados de cobre/ triazaciclononano e novo modelo quimérico de nuclease artificial sítio-específico / Vania Aparecida Mareze ; orientador, Hernán Terenzi, 2023.

126 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Nucleases. 3. Complexos metálicos. 4. Bioconjugados. 5. Fator de transcrição. I. Terenzi, Hernán. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

Vania Aparecida Mareze

Complexos modificados de cobre/ triazaciclononano e novo modelo quimérico de nuclease artificial sítio-específico

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 25 de setembro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Maria Aparecida Fernandez,
Dr.(a) Universidade Estadual de Maringá

Prof.(a) Joana Margarida Navalho Gaspar,
Dr.(a) Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Christiane Fernandes Horn,
Dr.(a) Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Bioquímica.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof.(a) Dr. Hernán Terenzi Orientador

Florianópolis, 2023.

Este trabalho é dedicado às pessoas que me inspiraram: minha família,
meus amigos e alguns líderes que cruzaram o meu caminho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à magia da energia cósmica que move a vida, mas que muitas vezes chamamos de Deus.

Agradeço à minha família: meu pai, minha mãe e meu irmão por serem meus alicerces, me apoiar de todas as formas possíveis e incentivar meus estudos desde a infância. Só cheguei até aqui porque vocês sempre acreditaram na educação e fizeram disso uma prioridade. Jamais esquecerei de tudo que já fizeram por mim. Sem vocês, ser doutora seria impossível! Minha eterna gratidão, de coração!

Aos meus avós paternos (*in memoriam*) e materna por serem exemplos de resiliência para mim e para meus pais! À toda minha família no geral, pela compreensão por muitas vezes não estar presente fisicamente, devido à distância!

Agradeço meu namorado e todos meus amigos. Vocês me deram palavras de afago e de apoio, mesmo a maioria estando longe fisicamente. Aos meus familiares professores universitários, em especial meu irmão e meus tios pelo exemplo! Obrigada a todos pela força e incentivo!

A todos os profissionais de saúde que estiveram e/ou ainda estão presentes na minha vida, por auxiliar nos cuidados da minha saúde física e mental. Vocês foram muito importantes para minha conclusão!

Gratidão pela oportunidade de estudar em uma universidade pública de qualidade como a UFSC, no qual os serviços são prestados à comunidade e o pagamento dos servidores provém dos impostos pagos pelos cidadãos brasileiros. Obrigada por todo conhecimento e amadurecimento adquiridos!

Gratidão ao orientador Dr. Hernán Terenzi pela paciência e por acreditar na minha resiliência e na minha capacidade técnica! Obrigada por me receber no seu laboratório, acreditar em mim e confiar no meu trabalho, nunca duvidar da minha honestidade em cada um dos experimentos executados e apoiar as minhas ideias, o que foi importante para uma virada na tese.

Agradeço à MSc. Bruna Auras, doutoranda do programa de Química da UFSC, pela síntese e caracterização dos complexos metálicos, por toda troca e parceria. Sem seu trabalho anterior, de síntese e caracterização dos complexos metálicos, este trabalho não seria possível e não existiria desta forma! Ao professor Dr. Ademir Neves (*in memoriam*) que contribuiu com ideias importantes para este projeto, além de colocar em contato com sua aluna Bruna, citada anteriormente.

Jamais esquecerei do seu brilho nos olhos e seu amor à ciência e à educação, foi realmente uma honra tê-lo conhecido! À professora Dr^a. Rosely Peralta por assessorar na publicação e com o pessoal da universidade de Cambridge, durante sua passagem por lá.

Aos técnicos do LABIME Dr^a. Vanessa Oliveira, Dr^a. Martina Blank, MSc. Mauro Dartora e ex-técnica MSc. Elis Rosa, pelo grande auxílio nas análises de espectrometria de massas, além da iniciativa para ajudar a resolver os problemas gerais do laboratório. Aos colegas e ex-colegas de laboratório pelos momentos sociais de café da tarde, trocas culturais e de paciência em vários momentos.

Aos professores Dr. Fernando Xavier (UDESC) e Dr^a. Elene Pereira-Maia (UFMG) pelas análises *in silico* e em células. Ao professor Dr. Gonçalo Bernardes da Universidade de Cambridge e Universidade de Lisboa e seus doutores Lavinia Dunsmore e Victor Ayora, pelas trocas de e-mail/ mensagens e por fornecer alguns materiais, além de refazer algumas análises, provando que a modificação de proteínas do capítulo 2 deste trabalho é reprodutível.

Gratidão aos membros do congresso VII Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry (LABIC 2021) pelo prêmio de melhor pôster. Agradeço também todas as pessoas que contribuíram para a minha formação anterior, me trazendo aprendizados: ex-orientadores e profissionais de algumas empresas que trabalhei.

Gratidão ao órgão de fomento CAPES pela bolsa de estudos. Aos secretários da secretaria integrada SIPG, em especial ao Kleyton Steinbach, além de todos os membros do colegiado, coordenadores e professores do departamento e programa de Bioquímica, dos quais alguns tive contato. Obrigada por todo apoio.

Não menos importante, agradeço ao meu cachorrinho adotado por ser sempre tão querido, agradecido, carismático e amiguinho de todas as horas, além de aparecer na minha vida no momento menos esperado, mas mais oportuno. Todo dia aprendo com ele sobre gratidão e que não é necessário muito para ser feliz. Ter um bichinho de estimação me ajudou muito nos momentos difíceis!

O que solidifica são os aprendizados e as superações!

RESUMO

Os complexos metálicos geralmente são empregados na medicina com o papel de mimetizar a hidrólise natural da ligação fosfodiéster dos ácidos nucleicos e por isso também são conhecidos como metalonucleases artificiais. Para que estas moléculas sejam eficientes e seletivas em relação ao substrato que atuam, uma das estratégias utilizadas é incrementar a segunda esfera de coordenação. No primeiro capítulo, complexos de cobre (II) derivados de 1,4,7-triazaciclononano contendo grupos pendentos como: isopropoila (**C1**), pireno (**C2**), antraceno (**C3**), naftaleno (**C4**) e amino (**C5**), foram avaliados frente à capacidade de clivagem do DNA plasmidial, além de ser comparados ao modelo clássico da literatura (Cu[9]aneN3)Cl₂. Todos os complexos testados apresentaram atividade catalítica em 4h (**C2** e **C5**) e 8h (**C1**, **C3** e **C4**). Em relação à temperatura, **C5** foi ativo em 37 °C, diferentemente de **C1-C4** (45 °C). **C2** atuou como a melhor nuclease artificial, 1000 vezes mais potente que o complexo clássico (Cu[9]aneN3)Cl₂, seguindo a ordem **C2 > C5 > C3 = C4 > C1 = (Cu[9]aneN3)Cl₂**. Em relação à especificidade, **C1-C5** não são considerados seletivos ao DNA e atuam de forma inespecífica. Deste modo, para melhorar a especificidade das metalonucleases artificiais é comum ancorá-las peptídeos ou miniproteínas derivadas de fatores de transcrição, que se ligam especificamente ao ácido nucleico. Uma estratégia de ancoragem é a modificação quimio-seletiva de biomoléculas que envolve a conversão do aminoácido não abundante cisteína em dehidroalanina, seguida por adição de um ligante contendo grupo amino livre. Deste modo, a miniproteína recombinante 434wt, derivada do fator de transcrição *cl* do bacteriófago 434 que se liga à sequência 5'ACAA'3, e não contém resíduo de cisteína, foi escolhida, mutada (434cys; glicina25 → cisteína25) e empregada nos testes do capítulo 2. 434cys foi modificada quimicamente e ligada covalentemente ao grupo amino do ligante de **C5**. Finalmente, o bioconjugado obtido foi coordenado com cloreto de cobre (II), formando o novo híbrido **434_C5**. Em análises preliminares de redução da mobilidade eletroforética (EMSA) e clivagem direta, **434_C5** interagiu e clivou o DNA de forma sítio-específica. Como conclusão, todas as hipóteses propostas de melhorar a atividade catalítica e a especificidade dos complexos metálicos foram atingidas.

Palavras-chave: cobre, triazaciclononano, repressor *cl*.

ABSTRACT

Metal complexes are generally employed in medicine with the role of mimicking the natural hydrolysis of nucleic acid phosphodiester acids and are therefore also known as artificial metallonucleases. For these molecules being efficient and selective in relation to the substrate they act on, one of the strategies used is to increase the second coordination sphere. In the first chapter, copper (II) complexes derived from 1,4,7-triazacyclononane containing pending groups such as: isopropoyl (**C1**), pyrene (**C2**), anthracene (**C3**), naphthalene (**C5**) and amino (**C5**), were evaluated ahead of cleavage capacity of plasmid DNA, in addition to being compared to the literature classical model $(\text{Cu}[9]\text{aneN}_3)\text{Cl}_2$. All complexes tested showed catalytic activity during 4h (**C2** and **C5**) and 8h (**C1**, **C3** and **C4**). Respect to temperature, **C5** was active at 37°C, unlike **C1-C4** (45°C). **C2** acted as the best artificial nuclease, 1000 times more potent than the classical complex $(\text{Cu}[9]\text{aneN}_3)\text{Cl}_2$, following the order **C2** > **C5** > **C3** = **C4** > **C1** = $(\text{Cu}[9]\text{aneN}_3)\text{Cl}_2$. Regarding specificity, **C1-C5** are not considered selective to DNA and act in a non-specific way. Thus, to improve the specificity of artificial metallonucleases, it is common to anchor them peptides or miniproteins derived from transcription factors, which bind specifically to nucleic acid. One anchoring strategy is chemo-selective modification of biomolecules, that involves the conversion of the non-abundant amino acid cysteine into dehydroalanine, followed by the addition of a ligand containing free amine group. Thus, the recombinant miniprotein 434wt, derived from the transcription factor *cI* of bacteriophage 434 that binds to the sequence 5'ACAA'3, and does not contain cysteine residue was chosen, mutated (434cys; glycine25 → cysteine25) and employed in tests of chapter 2. 434cys was chemically modified and covalently bonded to the amine group of **C5** ligand. Finally, the bioconjugate obtained was coordinated with copper (II) chloride, forming the new hybrid **434_C5**. In preliminary analysis of electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and direct cleavage, **434_C5** interacted with and cleaved DNA in a site-specific manner. As a conclusion, all hypotheses proposed about improving the catalytic activity and specificity of metallic complexes were achieved.

Keywords: copper, triazacyclononane, *cI* repressor

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura dos nucleotídeos.....	25
Figura 2 – Ligações químicas dos ácidos nucleicos	26
Figura 3 - A estrutura do DNA	27
Figura 7 - Formação de ROS pelo mecanismo oxidativo	34
Figura 8 - Desenho ilustrativo das esferas de coordenação.....	36
Figura 9 - Interação das metalonucleases artificiais com o DNA	37
Figura 11 - Mecanismo de ação do Cu([9]aneN ₃)Cl ₂	39
Figura 12- Complexos C1-C5	40
Figura 13 - Mapa do plasmídeo pBlueScript II SK (+).....	43
Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose de DNA plasmidial clivado por complexos metálicos	45
Figura 15 - Complexos C1-C5	46
Figura 16 - Ilustração esquemática das etapas de todas as técnicas executadas.....	46
Figura 17 – Estrutura da netropsina e do verde de metila	48
Figura 18 - Foto de uma glove bag comercial.....	50
Figura 19 - Clivagem do DNA por (Cu[9]aneN ₃)Cl ₂ e C1	51
Figura 20 - Clivagem do DNA por C2-C4	52
Figura 21 - Gráfico de <i>K_{obs}</i> de C2-C4	53
Figura 22 – Estruturas dos complexos da literatura	55
Figura 23 - Efeito dos sequestradores de oxigênio na clivagem do DNA por C2-C4	56
Figura 24 - Efeito da ausência e presença de oxigênio na clivagem de DNA por C2-C4	57
Figura 25 - Avaliação da interação de C2-C3 pelo sulco menor e/ou maior utilizando inibidores netropsina e verde de metila.....	58
Figura 26 - Análises <i>in silico</i> de C2-C4	58
Figura 27 - Clivagem do DNA por C5	59
Figura 28 - Cálculo de <i>K_{obs}</i> de C5	60
Figura 29 – Estrutura dos complexos da literatura	61
Figura 30 - Efeito dos sequestradores de oxigênio na clivagem do DNA por C2-C4	62
Figura 31 – Estrutura das α -hélices e folhas β de proteínas.....	67
Figura 32 – Motivos de ligação ao DNA.....	68

Figura 33 – Complexo complexo de rutênio [Rh(phi)2(phenb)]3c contendo peptídeos derivados do repressor <i>cl</i> do fago 434	70
Figura 34 - Estrutura química do complexo Ru(brC)2.....	71
Figura 35 – HTH e ligação ao DNA.....	73
Figura 36 – Regulação gênica do ciclo lítico/ lisogênico do bacteriófago 434.....	75
Figura 37 – Modificação de proteína via dehidroalanina e adição de Aza-Michael	77
Figura 38 - Estrutura tridimensional da proteína repressora do 434	78
Figura 39 - Desenho esquemático das etapas necessárias para a montagem e caracterização da nova molécula híbrida	81
Figura 40 – Mapa da construção do plasmídeos	82
Figura 41 - Desenho ilustrativo do filtro Amicon 3 kDa de 0,5 ml (Millipore®).....	86
Figura 42- Sonda de DNA 5´ACAA´3, sítio OR1 do repressor <i>cl</i> do bacteriófago 434	88
Figura 43 - Reagentes necessários para a modificação química.....	89
Figura 44 - Etapas de modificação química de 434_cys25 por bis-alquilação eliminação, seguida de adição por Aza-Michael	90
Tabela 1 – Dados teóricos de MS esperados para o repressor <i>cl</i> do bacteriófago 434	94
Figura 45 – Gel de Tris-Tricina SDS-PAGE e dados cromatográficos da purificação de 434cys	96
Figura 46 -Dados de MS de 434wt e 434cys	97
Figura 47 – Perfil da estrutura secundária do repressor <i>cl</i> de 434 através do BestSel e do espectro de CD do 434wt através do Dichromatch	98
Figura 48 – Curva de CD e quantificação das α -hélices de 434wt.....	98
Figura 49 - Curva de CD e quantificação das α -hélices de 434cys.....	99
Figura 50 – Espectro de CD da proteína intacta, R1-69 e CT-1 do repressor de 434	100
Figura 51 – EMSA 434wt e 434cys.....	101
Figura 52 – Conversão da Cys25 em DHA25 na miniproteína 434cys	102
Figura 53 – Adição do tacn-Pr ⁱ -NH ₂ ao 434_DHA25	103
Figura 54- Ensaio de EMSA de 434_ tacn-Pr ⁱ -NH ₂	104
Figura 55 – Complexação do 434_ tacn-Pr ⁱ -NH ₂ por metal.....	105

Figura 56 - Clivagem direta do oligonucleotídeo 5'ACAA'3 por **434_C5** 108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados teóricos de MS esperados para o repressor <i>cI</i> do bacteriófago 434	94
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-BDNPP (*bis(2,4-dinitrophenyl)phosphate*)

6-FAM - 6-carboxifluoresceína

ACN - acetonitrila

APS - persulfato de amônio

Ar - argônio

A, T, G e C – adenina, timina, guanina e citosina

B-DNA – ácido desoxirribonucleico da forma B

CD – dicroísmo circular (*circular dichroism*)

CHR - *Carboxy-terminal leucine/isoleucine Heptad Repeat*

Cu – cobre

(Cu[9]aneN₃)Cl₂ - cobre(II) 1,4,7-triazaciclononano-dicloro ou [Cu^{II}(tacn)Cl₂]

C1 – [Cu^{II}(tacnⁱPr₂)Cl₂]

C2 – [Cu^{II}(tacnⁱPr₂- pireno)Cl₂]

C3 – [Cu^{II}(tacnⁱPr₂- antraceno)Cl₂]

C4- [Cu^{II}(tacnⁱPr₂- naftaleno)Cl₂]

C5 – [Cu^{II}(tacnⁱPr₂-NH₃)Cl₂]

CRISPR - *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

DNA – ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

DTT - ditioneitol

EDTA - ácido etilendiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)

Da – Dalton

DP – desvio padrão

e.g (*exempli gratia* – latim; por exemplo)

FI – DNA plasmidial na forma superenovelada

FII – DNA plasmidial na forma circular relaxada

FIII – DNA plasmidial na forma linear

g – grama

GST – glutationa-S-transferase

h – hora

K_D – Constante de dissociação

k – quilo

KI – iodeto de potássio

LABIME – Laboratório de Biologia Molecular Estrutural (UFSC)
LABINC - Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia (UFSC)
LC – cromatografia líquida (*Liquid Chromatography*)
m – metro
MALDI - *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*
MSc. – *Master of Science*
m/v – relação massa/ volume
mer – do grego *meros* (parte), refere-se ao número de nucleotídeos do oligonucleotídeo
molL⁻¹ – unidade de concentração molar
ESI – Ionização por Eletrospray (*Electrospray ionization*)
mdeg - *millidegree*
MS – espectrometria de massas (*mass spectrometry*)
MS/MS – espectrometria de massas em tandem
NaN₃ – azida de sódio
NET - netropsina
nm - nanômetro
PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida (*Polyacrylamide gel electrophoresis*)
pb – par de base
pKa - log negativo do *Ka* (constante de acidez)
pH - potencial hidrogeniônico
PMSF - *Phenylmethylsulfonyl fluoride*
Pt – platina
Prefixos do Sistema Internacional de Unidades – m (10⁻³), n (10⁻⁹), p (10⁻¹²)
RNA – ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)
RNAi – RNA de interferência
ROS – espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*)
RPM – rotações por minuto
SDS – dodecil sulfato de sódio
tacn - 1,4,7-triazaciclononano
tacnⁱPr₂- 1,4-diisopropil-1,4,7-triazaciclononano
t – tempo
T- temperatura
TBE - tris/borato/EDTA
TCEP - Tris(2-carboxietil)fosfina

TEMED – tetrametiletilenodiamina

Tris – tris(hidroximetil)aminometano

UDESC – Universidade do Estado de Santa Catarina

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

UV - ultravioleta

UV-Vis – espectrometria de ultravioleta visível VM – Verde de Metila

xg – força G ou Força centrífuga relativa

LISTA DE SÍMBOLOS

Å – Ångström

~ - aproximadamente

α - alfa

β – beta

°C – grau Celsius

ϵ – coeficiente de extinção molar

$[\theta]$ – Elipticidade molar

\leq - menor ou igual

® - marca registrada

μ – micro (10^{-6})

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	25
1 INTRODUÇÃO	25
1.1 ESTRUTURA DOS ÁCIDOS NUCLEICOS: CONCEITOS BÁSICOS	25
1.2 NUCLEASES: ENZIMAS QUE CLIVAM OS ÁCIDOS NUCLEICOS	30
1.3 METALONUCLEASES ARTIFICIAIS: O EXEMPLO DOS COMPLEXOS METÁLICOS.....	33
1.3.1 Estrutura e mecanismo de ação dos complexos metálicos	33
1.3.2 Contribuição das metalonucleases artificiais para a ciência	34
1.3.3 Esferas de coordenação dos complexos metálicos	35
1.3.4 Complexos de cobre (II) derivados de 1,4,7 - triazaciclononano (tacn)	38
1.3.4.1 <i>Melhorias nos complexos mononucleares clássicos de cobre(II) e tacn</i>	39
2 OBJETIVOS	41
3 INTRODUÇÃO À METODOLOGIA DO CAPÍTULO 1	43
3.1 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DE DNA PLASMIDIAL	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1 OBTENÇÃO, PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL	47
4.2 CLIVAGEM DO PLASMÍDEO POR C1-C5.....	47
4.3 INTERAÇÃO DOS COMPLEXOS METÁLICOS NO DNA	48
4.4 CINÉTICA DE CLIVAGEM DO DNA.....	49
4.5 MECANISMO DE CLIVAGEM	49
4.6 ANÁLISE DE DADOS	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 COMPLEXOS C1-C4	51
5.2 COMPLEXO C5	59
CAPÍTULO 2	65
7 INTRODUÇÃO	65
7.1 METALONUCLEASES ARTIFICIAIS SÍTIO-ESPECÍFICAS	65
7.2 PEPTÍDEOS, MINIPROTEÍNAS E FATORES DE TRANSCRIÇÃO	65
7.3 EXEMPLOS DE NUCLEASES ARTIFICIAIS SÍTIO-ESPECÍFICAS E PROPOSTA INICIAL DA TESE	70
7.4 REPRESSOR CI DO BACTERÍÓFAGO 434	72

7.5 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA CADEIA LATERAL DA CISTEÍNA (-SH).....	76
7.6 NOVO MODELO QUIMÉRICO DE NUCLEASE ARTIFICIAL SÍTIO ESPECÍFICA: COMPLEXO DE CU(II) TACN COM PENDENTE AMINO + REPRESSOR CI DO FAGO 434	77
8 OBJETIVOS.....	80
9 MATERIAIS E MÉTODOS	81
9.1 PROTEÍNA REPRESSORA DO 434	81
9.2 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS 434WT E 434CYS EM E. COLI	83
9.2.1 Purificação das proteínas 434wt e 434cys por cromatografia de afinidade (IMAC).....	83
9.2.2 SDS-PAGE e quantificação das proteínas.....	84
9.3 FINGERPRINTING DAS MASSAS DOS PEPTÍDEOS DE 434WT	85
9.4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR ELETROSPRAY (ESI-MS)	86
9.5 DICROÍSMO CIRCULAR.....	87
9.6 ENSAIO DE EMSA (ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY).....	87
9.7 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DAS MINIPROTEÍNAS.....	89
9.7.1 Modificação de proteína por bis-alkilação-eliminação.....	89
9.7.2 Adição de Aza-Michael do ligante tacn¹-Pr₂-NH₂ à proteína com DHA.....	90
9.7.3 Complexação do híbrido com CuCl₂	90
9.8 CLIVAGEM DIRETA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS	91
9.9 ELETROFORESE EM GEL DESNATURANTE DE POLIACRILAMIDA 16%	92
9.10 ANÁLISE DE DADOS	93
10 RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
10.1 NUCLEASE ARTIFICIAL HÍBRIDA: COMPLEXO C5 + REPRESSOR CI DE 434 MODIFICADO	94
10.1.1 Obtenção das miniproteínas 434wt e 434cys recombinantes.....	94
10.1.2 Estrutura secundária das miniproteínas 434wt e 434cys.....	97
10.1.3 Ligação de 434wt e 434cys ao DNA	100
10.1.4 Modificação química das miniproteínas	101
10.1.5 Clivagem direta do oligonucleotídeo 5´ACAA´3 pelo híbrido 434_C5	107
11 CONCLUSÃO	110
REFERÊNCIAS.....	111
ANEXO A.....	126

CAPÍTULO 1

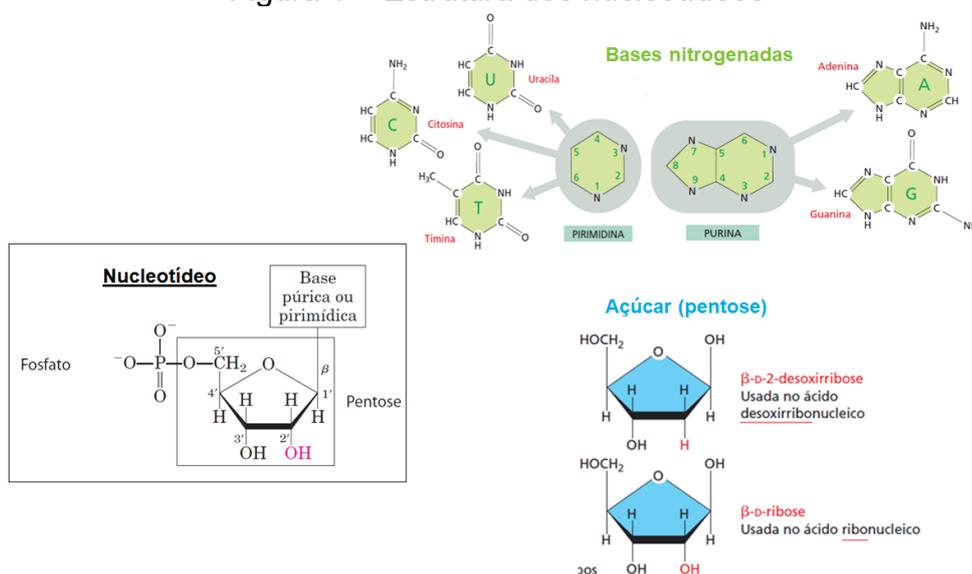
1 INTRODUÇÃO

1.1 ESTRUTURA DOS ÁCIDOS NUCLEICOS: CONCEITOS BÁSICOS

Os ácidos nucleicos são macromoléculas de grande importância para a vida, pois são responsáveis pelo armazenamento e transmissão da informação genética. O nome nucleico se deve ao fato que originalmente eles foram isolados do interior do núcleo de células eucarióticas. Os dois tipos de ácidos nucleicos são: DNA (ácido desoxirribonucleico) e RNA (ácido ribonucleico) (CAMPBELL; FARREL, 2015; ZAHA; BUNSELMeyer; PASSAGLIA, 2014).

RNA e DNA são polímeros, constituídos de várias repetições de unidades únicas (monômeros) de nucleotídeos (figura 1) (CAMPBELL; FARREL, 2015). Cada nucleotídeo é formado por uma base nitrogenada, um açúcar pentose na forma de β -furanose (anel fechado com cinco átomos), e um ou mais grupos fosfatos ($5'$ -PO₄ ou $5'$ -P). O que diferencia o DNA do RNA é o açúcar. O DNA possui um -H (β -D-2-desoxirribose), enquanto o RNA um -OH no carbono 2 da pentose (β -D-2-ribose) (figura 1). Portanto o DNA é formado de desoxirribonucleotídeo e o RNA de ribonucleotídeo (ALBERTS et al., 2017; NELSON; COX, 2014).

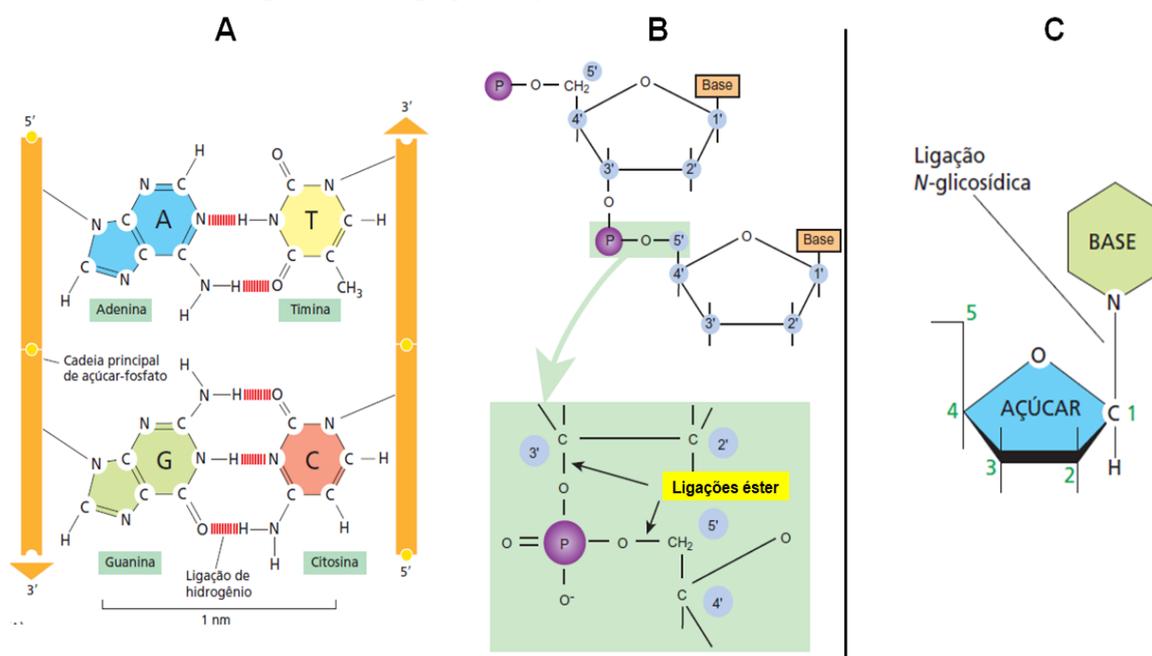
Figura 1 – Estrutura dos nucleotídeos



Fonte: (ALBERTS et al., 2017; NELSON; COX, 2014). Reorganizado pela autora.

As bases nitrogenadas são divididas em pirimídicas e púricas, anéis nitrogenados contendo um ou dois anéis, respectivamente, com grupos carbonila e grupos amino exocíclicos. As purinas são a adenina (A) e a guanina (G), enquanto as pirimidinas são a citosina (C) e a timina (T). No RNA, a timina é substituída pela uracila (U), enquanto a timina é encontrada no DNA (figura 1). Pela regra de Chargaff, purinas pareiam com pirimidinas, através de pontes de hidrogênio, em uma relação 1:1, ou seja, pareamento de A/T, A/U e G/C, conferindo complementariedade à cadeia nucleotídica. Entre A/T e A/U há duas pontes de hidrogênio, enquanto G/C são três (figura 2a). A proporção das bases nucleotídicas pareadas varia nas espécies (ALBERTS et al., 2017; CAMPBELL; FARREL, 2015; CHARGAFF, 1950; NELSON; COX, 2014; ZAHA; BUNSELMeyer; PASSAGLIA, 2014; WATSON; CRICK, 1953).

Figura 2 – Ligações químicas dos ácidos nucleicos



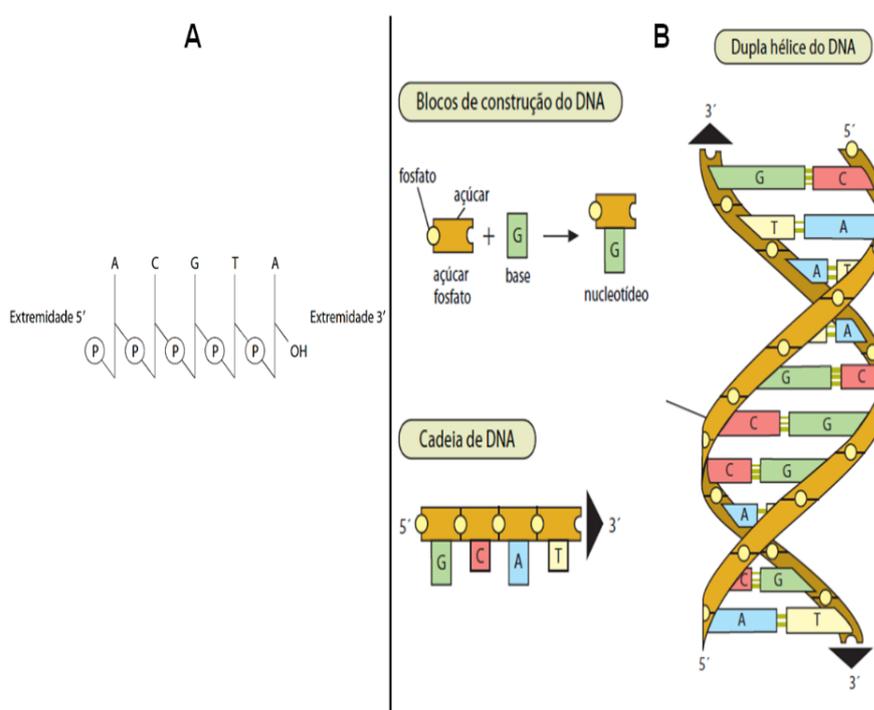
A. Pontes de hidrogênio entre as bases. **B.** Ligação fosfodiéster dos ácidos nucleicos. **C.** Ligação N-glicosídica. Fonte: originais de (ALBERTS et al., 2017; CLARK; PAZDERNIK; MCGEHEE, 2018); reorganizados e modificados pela autora.

Tanto no DNA quanto no RNA, os nucleotídeos são unidos covalentemente por ligações fosfodiéster, ou seja, o grupo fosfato da posição 5' de um nucleotídeo é ligado ao grupo 3'-hidroxila do nucleotídeo consecutivo (figura 2b). As bases são ligadas ao açúcar por ligações N-glicosídicas, onde o nitrogênio da base nitrogenada se liga ao carbono 1 da pentose (figura 2c) (ALBERTS et al., 2017; NELSON; COX, 2014). Tais unidades monoméricas também participam da estrutura de inúmeras

outras moléculas importantes para o metabolismo celular, como as moedas químicas (exemplo: ATP), as coenzimas (e.g coenzima A ou CoA) e os intermediários metabólicos (e.g sinalização celular) (ALBERTS et al., 2017; CAMPBELL; FARREL, 2015; NELSON; COX, 2014).

O modelo de estrutura secundária do DNA proposto por Watson e Crick (1953), com auxílio dos dados cristalográficos de Franklin e Wilkins, é uma dupla hélice, onde duas fitas complementares em direções antiparalelas se enrolam em torno do próprio eixo, ou seja, as ligações fosfodiéster estão em direções opostas, uma na direção $5' \rightarrow 3'$ e a outra fita complementar na direção $3' \rightarrow 5'$. Isto ocorre devido ao pareamento das bases nitrogenadas, citado no parágrafo acima. A identidade dos ácidos nucleicos são as bases nitrogenadas, por isto no sequenciamento linear (estrutura primária) de uma fita simples de DNA, a anotação se dá pelas letras (A, C, T, G) representantes dos pares de bases (pb) na direção $5' \rightarrow 3'$, como na figura 3a: $5'ACGTA'3$ (ALBERTS et al., 2017; CLARK; PAZDERNIK; MCGEHEE, 2018; FRANKLIN; GOSLING, 1953; NELSON; COX, 2014; RIBEIRO, 2009; WATSON; CRICK, 1953; WILKINS; STOKES; WILSON, 1953; ZAHA; BUNSELMAYER; PASSAGLIA, 2014).

Figura 3 - A estrutura do DNA

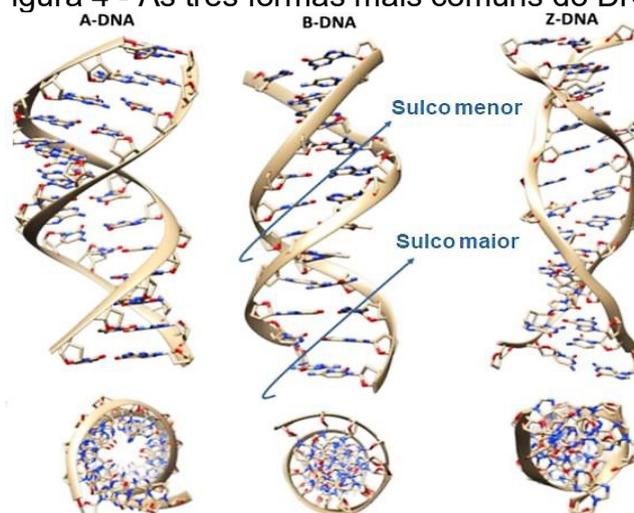


A. Exemplo de oligonucleotídeo, ou seja, uma cadeia curta de nucleotídeos. As letras acima indicam os pares de bases. **B.** Montagem do DNA. Fonte: (NELSON; COX, 2014; RIBEIRO, 2009). Reorganizado pela autora.

Na figura 3a, a linha diagonal marca o grupo fosfato (P), indicando as ligações fosfodiéster, enquanto as verticais indicam a posição dos açúcares, com a extremidade 3' contendo uma hidroxila livre. As desoxirriboses ligadas ao grupamento fosfato compõem o esqueleto açúcar-fosfato, que por serem hidrofílicos, ficam na parte externa da hélice exposto ao meio aquoso (pH neutro), como se fosse um corrimão de uma escada circular. As bases nitrogenadas ficam empilhadas no interior da hélice, devido à sua natureza hidrofóbica, conferindo estabilidade à macromolécula. Deste modo, as bases encontram-se perpendiculares ao eixo longitudinal, formando os degraus de uma escada (figura 3b) (ALBERTS et al., 2017; CLARK; PAZDERNIK; MCGEHEE, 2018; NELSON; COX, 2014; RIBEIRO, 2009; WATSON; CRICK, 1953; ZAHA; BUNSELMeyer; PASSAGLIA, 2014).

A estrutura do DNA citada anteriormente é a forma B, a mais encontrada na natureza, com um diâmetro interno de aproximadamente 1,1 nm (11 Å), ou seja, a mesma distância das pontes de hidrogênio entre as bases das duas fitas. O diâmetro externo é de 2 nm (20 Å) e a extensão da volta completa da hélice tem 3,4 (34 Å), aproximadamente 10,5 pares de bases, com giro das hélices voltada para à direita. Por causa das ligações *N*-glicosídicas não estarem exatamente opostas, duas cavidades vazias são formadas, uma denominada de sulco maior e outra de sulco menor (figura 4). O DNA-A também possui giro para direita, no entanto cerca de 20° inclinado em relação ao DNA-B, com um sulco maior aprofundado e o sulco menor superficial, além 11 pb por volta da hélice. Na forma Z, o arcabouço do ácido desoxirribonucleico aparece mais fino e alongado como um zigue-zague, com sequências GC alternadas, 12 pb por volta e giro da hélice para à esquerda (figura 4). DNA-A aparece principalmente quando há baixa umidade e quando há híbridos DNA:RNA, enquanto que o Z está relacionado com a regulação. O DNA também pode assumir outras formas e outros pareamentos, mais raros (ALBERTS et al., 2017; CLARK; PAZDERNIK; MCGEHEE, 2018; GONZALEZ-GARCIA; VILAR, 2017; NELSON; COX, 2014; RIBEIRO, 2009; WATSON; CRICK, 1953; ZAHA; BUNSELMeyer; PASSAGLIA, 2014).

Figura 4 - As três formas mais comuns do DNA



Fonte: (GONZALEZ-GARCIA; VILAR, 2017). Traduzido pela autora.

O DNA possui grande estabilidade e flexibilidade, além de alto peso molecular. No ser humano, em uma célula diploide, existem 3,055 bilhões de pares de base, incluindo sequenciamento completo de telômero a telômero, o que responderia à aproximadamente 1,7m de macromolécula, caso ela fosse estendida, o que não caberia em uma célula eucariótica, que tem cerca de 50 μm . Deste modo, o DNA se associa com proteínas como a histonas e se dobra, formando a estrutura terciária supertorcida denominada cromatina (ALBERTS et al., 2017; NURK et al., 2022; ZAHA; BUNSELMEYER; PASSAGLIA, 2014).

O RNA no geral apresenta uma cadeia única, curta e inúmeras conformações espaciais distintas, devido principalmente aos pareamentos internos. No geral, esta macromolécula é extremamente complexa pois apresenta inúmeras funções e localizações dentro da célula, característica que faz com que seja nomeada de forma distinta de acordo com a sua classificação, como por exemplo: RNA transportador, RNA mensageiro e RNA ribossômico, entre outros. Uma das principais funções é a transcrição, tradução e processamento, etapas essenciais para a síntese de proteínas e metabolismo celular. Por ser majoritariamente fita simples e conter hidroxila no carbono 2' da pentose, o RNA é menos estável e mais susceptível às hidrólises do que o DNA. Como o enfoque deste trabalho é apenas o DNA, a estrutura do RNA não será muito abordada nesta seção (ALBERTS et al., 2017; CLARK; PAZDERNIK; MCGEHEE, 2018; NELSON; COX, 2014; RIBEIRO, 2009; ZAHA; BUNSELMEYER; PASSAGLIA, 2014)

1.2 NUCLEASES: ENZIMAS QUE CLIVAM OS ÁCIDOS NUCLEICOS

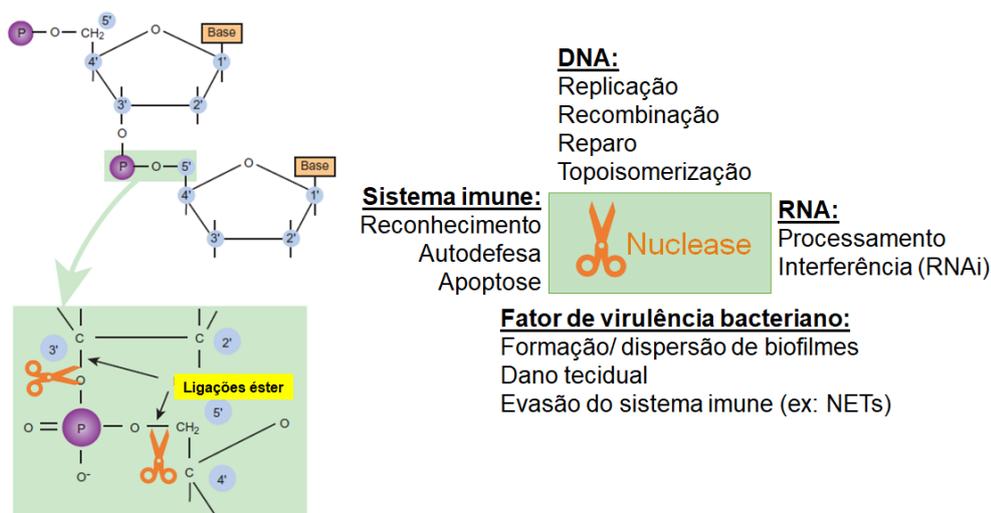
Ter capacidade de catalisar reações químicas com eficiência e seletividade é uma condição essencial para a vida. Sem catalisadores, o tempo de meia vida do DNA seria de 30 milhões de anos em hidrólise espontânea (GATES, 2009). Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA catalíticas, mais de 99% das catálises são realizadas por proteínas, denominadas enzimas. O poder catalítico destas macromoléculas é surpreendente, elas aceleram a velocidade das reações químicas até 10^{20} vezes mais do que as não catalisadas. Por sua vez, os catalisadores não enzimáticos, como os sintéticos e os inorgânicos, normalmente aumentam a velocidade da reação em potências de 10^2 à 10^4 (ALBERTS et al., 2017; NELSON; COX, 2014; PUNEKAR, 2018; RIBEIRO, 2009; ZAHA; BUNSELMEYER; PASSAGLIA, 2014).

As hidrolases, por exemplo, catalisam as reações de hidrólise, ou seja, são capazes de transferir grupos funcionais para a molécula de água e quando clivam os ácidos nucleicos são subclassificadas em nucleases (ALBERTS et al., 2017; NELSON; COX, 2014). Estas, são fosfodiesterases que clivam (cortam) uma das duas ligações fosfodiéster, na ponte P-O, seja na extremidade 5' ou 3' do ácido nucleico (figura 5). Para isto, utilizam majoritariamente água desprotonada como nucleófilo - bases de Lewis que doam par de elétrons nas ligações químicas. No entanto, (desoxi)ribose, fosfato inorgânico e as cadeias laterais de aminoácidos como histidina, serina e tirosina também podem ser utilizados (YANG, 2011; MULLER, 1994).

Funcionalmente, estas tesouras biológicas são consideradas indispensáveis para a vida, pois estão envolvidas em diferentes papéis dentro da célula, sendo as principais relacionadas com os processos metabólicos do DNA: replicação, recombinação, reparo, alterações na torção da hélice (topoisomerização); e do RNA: maturação ou processamento (*splicing*) e interferência (RNAi). Além de prover a regeneração de nutrientes, as nucleases são fundamentais para o sistema imune inato do hospedeiro, por meio da autodefesa, através da estrita regulação de mecanismos de reconhecimento (*sensing*) de ácidos nucleicos microbianos, além de estar associada à morte celular programada (apoptose) (SANTA et al., 2021; YANG, 2011).

Nas bactérias, as nucleases também são considerados fatores de virulência, pois participam da adesão celular, dano tecidual e evasão do sistema imune do hospedeiro, por exemplo ao degradar o DNA presente nas redes extracelulares liberadas por neutrófilos (NETs), como as enzimas Xds e Dns de *Vibrio cholerae* e EndA de *Streptococcus pneumoniae*. Outro exemplo é o papel na formação e dispersão de biofilmes, como no caso das termonucleases NuC2 e NuC3 de bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus*, grandes causadores de infecções hospitalares (LIAO et al., 2022; SHARMA et al., 2019). Deste modo, fosfodiesterases também podem ser empregadas como biomarcadores para diagnóstico de infecções bacterianas (GARCIA GONZALEZ; HERNANDEZ, 2022). A figura 5 mostra um resumo das funções destas hidrolases específicas nos ácidos nucleicos.

Figura 5 - As nucleases e suas funções



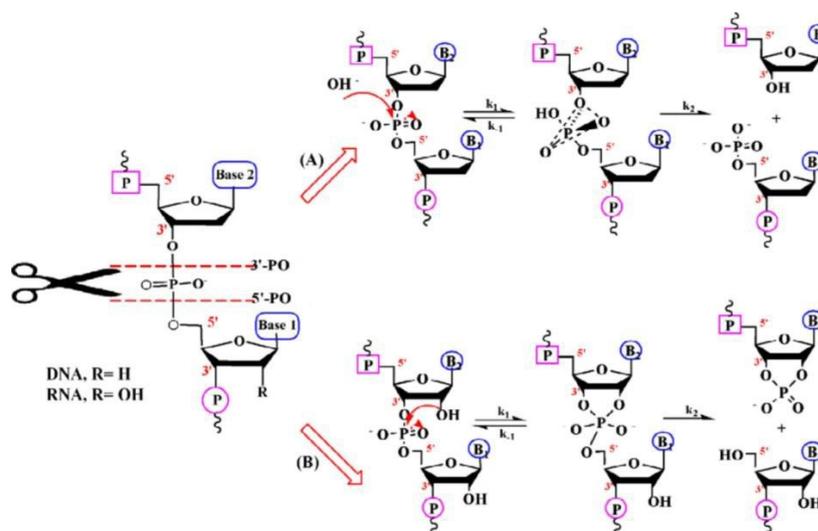
Clivagem das ligações fosfodiéster pelas nucleases e suas principais funções. Fonte: figura de (CLARK; PAZDERNIK; MCGEHEE, 2018), modificada pela autora a partir das informações contidas em (LIAO et al., 2022; SANTA et al., 2021; SHARMA et al., 2019; YANG, 2011).

Quanto ao mecanismo catalítico, estas enzimas podem ser classificadas como endonucleases, quando clivam a partir dos sítios internos ou exonucleases, quando removem nucleotídeo a partir da extremidade da fita do ácido nucleico. Quando clivam apenas o DNA, são denominadas DNAses e quando clivam apenas o RNA, são denominadas RNAses (NELSON; COX, 2014; YANG, 2011).

Em relação à hidrólise, a ruptura da ponte P-O do DNA e RNA ocorre de forma diferente. No DNA, a reação é intermolecular, onde a água derivada do nucleófilo (OH^-) ataca o fósforo do fosfato, formando um estado de transição penta

coordenado, com conseqüente protonação do grupo de saída, numa via que pode envolver tanto a quebra da ligação 3'P-O quanto da 5'P-O. Já no RNA, a reação inicial é uma transesterificação intramolecular, que ocorre devido a presença do grupo 2'OH da ribose, atuando como nucleófilo intramolecular, seguido de uma desprotonação de um fosfato ciclístico 2'3', em uma reação de hidrólise (figura 6). Por isto, pode-se dizer que o RNA se degrada de forma mais rápida que o DNA, devido ao grupo hidroxila da posição 2 da ribose, que na desoxirribose é um hidrogênio (ANJOMSHOA; AMIRHEIDARI, 2022; ZENKOVA, 2004). É importante ressaltar estas diferenças, já que as nucleases representam um número diversificado de fosfodiesterases. Entretanto, o tema desta tese é direcionada apenas às nucleases que clivam o DNA, uma vez que sua ligação fosfodiéster é mais difícil de ser rompida.

Figura 6 - Hidrólise do DNA e RNA



A. Hidrólise do DNA (reação intermolecular). **B.** Transesterificação (reação intramolecular k_1), seguida de hidrólise do RNA (k_2). Fonte: (ANJOMSHOA; AMIRHEIDARI, 2022).

No que se refere à necessidade de cofatores enzimáticos - pequenas moléculas que auxiliam as enzimas - estas hidrolases podem ser dependentes de nenhum, um ou dois íons metálicos. A DNase I, uma das primeiras famílias de nucleases a ser estudada é muito importante na apoptose, na digestão e são indispensáveis para muitas funções, garantindo a homeostase. Para que a DNase I seja ativa são necessários os íons Mg^{2+} e Ca^{2+} . Outro exemplo de nuclease que necessita de Mg^{2+} são as encontradas em bactérias, denominadas de enzimas de

restrição ou endonucleases de restrição classe tipo II, responsáveis por clivar o DNA exógeno em sequências específicas (sítios de restrição). Estas macromoléculas são muito importantes para área de Biologia Molecular, pois são empregadas em inúmeras técnicas, principalmente na tecnologia do DNA recombinante. Estas duas enzimas são exemplos de metalonucleases (KEYEL, 2017; NELSON; COX, 2014; ROBERTS, 2005; SMITH; WELCOX, 1970; YANG, 2011).

1.3 METALONUCLEASES ARTIFICIAIS: O EXEMPLO DOS COMPLEXOS METÁLICOS

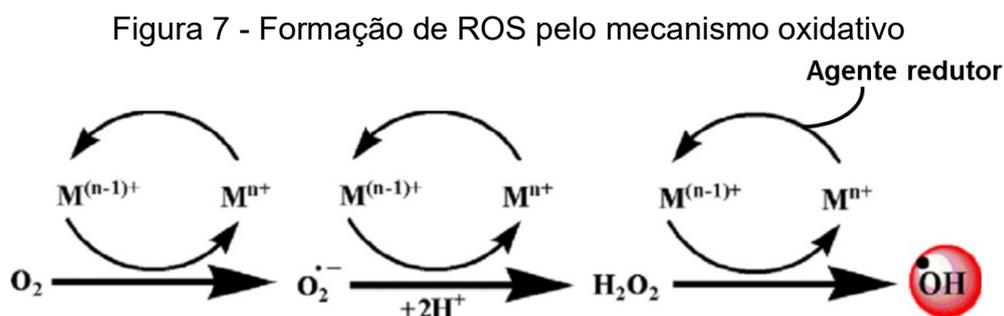
1.3.1 Estrutura e mecanismo de ação dos complexos metálicos

A maioria dos íons metálicos (M), principalmente polivalentes (M^{2+}), como os metais de transição, estão envolvidos com a ruptura dos ácidos nucleicos, acelerando a hidrólise enzimática em pelo menos 17 ordens de magnitude. Os metais de transição são elementos químicos da tabela periódica que possuem o orbital atômico incompleto, seja no átomo neutro ou em seus cátions, apresentando vários estados de oxidação (M^{n+}) (SHRIVER; ATKINS, 2009; STROHFELDT, 2015). O fato de o centro metálico ser carregado positivamente favorece a ligação com as moléculas carregadas negativamente, como o DNA (BARRA; NETTO, 2015). Nos complexos metálicos, os ligantes são os responsáveis pela coordenação, doando as bases de Lewis para o orbital incompleto do metal de transição (PFENNIG, 2015).

Em solução aquosa, conforme o pH do meio, eles podem se coordenar com uma molécula de água, atuando como ácidos ($M-OH_2$) ou bases gerais ($M-OH$) de Lewis. Geralmente, estas reações de hidrólise ocorrem indiretamente, onde o ligante de saída costuma ser substituído pela água. Deste modo, diferentes mecanismos podem atuar: ativação do nucleófilo, estabilização do complexo de transição, protonação do grupo de saída e, portanto, a aceleração da hidrólise do substrato. ANJOMSHOA; AMIRHEIDARI, 2022; BLACKMAN; GAHAN, 2018; DUPUREUR, 2008; MANCIN et al., 2005; MANCIN; SCRIMIN; TECILLA, 2012; ZENKOVA, 2004 BARRA; NETTO, 2015;; ZENKOVA, 2004).

Além desta via hidrolítica, alguns metais ao serem auto-oxidados (e.g $Cu^{+1} \rightarrow Cu^{+2}$) reduzem o oxigênio molecular (O_2), formando espécies reativas de oxigênio (ROS), como: o ânion superóxido ($O^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio

singlete ($^1\text{O}_2$) e o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) (figura 7). Deste modo, os ROS promovem diretamente ou indiretamente a desestabilização da ligação *N*-glicosídica, causando dano ao DNA ao modificar bases nitrogenadas e resíduos de açúcares (ANJOMSHOA; AMIRHEIDARI, 2022; DUPUREUR, 2008; MANCIN et al., 2005; MANCIN; SCRIMIN; TECILLA, 2012; ZENKOVA, 2004). Este mecanismo também pode ser acentuado através da adição de agentes redutores, como o DTT, o ascorbato e o Fe-EDTA, que ao serem oxidados atuam regenerando o metal de transição para o estado reduzido, e com isso retroalimentam o ciclo de formação de ROS. Estas reações redox são denominadas do tipo Fenton (figura 7). (ANJOMSHOA; AMIRHEIDARI, 2022; FENTON, 1894; JIANG et al., 2007; MANCIN; SCRIMIN; TECILLA, 2012; WARDMAN; CANDEIAS, 1996; YU; COWAN, 2018)



M indica o metal e o número de sua valência. Fonte: (ANJOMSHOA; AMIRHEIDARI, 2022), modificado pela autora.

1.3.2 Contribuição das metalonucleases artificiais para a ciência

Os grandes progressos no estudo acerca das estruturas do DNA, no campo da genômica e da biotecnologia estimularam a busca e o desenvolvimento de ferramentas eficazes para manipular o material genético. Adicionalmente a estes avanços científicos, a crescente diversidade de complexos formados por metais de transição permitiu que novos agentes sintéticos pudessem ser utilizados com a função de clivar hidroliticamente os ácidos nucleicos. Deste modo, os complexos metálicos começaram a ser empregados como sistemas biomiméticos das metalonucleases naturais e serem utilizados como alvos para tratamentos de doenças e no auxílio da elucidação dos mecanismos de ação de algumas enzimas (MANCIN et al., 2005; MEDICI et al., 2015; PAGES et al., 2015).

O primeiro complexo metálico sintetizado e usado clinicamente como fármaco foi a *cis*-diaminodicloroplatina (cisplatina), um agente quimioterápico utilizado para tratar com sucesso câncer sólidos como o de testículo, ovário, cabeça, pulmão, estômago, entre outros. Este complexo teve a capacidade de se ligar covalentemente com o DNA, através da formação de aductos, acarretando na apoptose das células (GOSH, 2019; HIGBY et al., 1974; ROSENBERG et al. 1965). Desde então, cientistas vem modificando e melhorando a estrutura da cisplatina aos longos dos anos, assim como de outras metalonucleases artificiais, com o intuito de desenvolver potenciais fármacos anticancerígenos, anti-inflamatórios, antibacterianos, antirreumáticos, antimaláricos e antivirais, cada vez mais específicos e com menos efeitos colaterais. Deste modo, muitos metais de transição, tais como: platina, paládio, rutênio, ouro, prata, cobre, ródio, irídio, ósmio e rênio têm sido estudados na química medicinal (ANTHONY et al., 2020; FANTONI et al., 2021; GOSH, 2019; MEDICI et al., 2015; PAGES et al., 2015; ROTTENBERG et al., 2021).

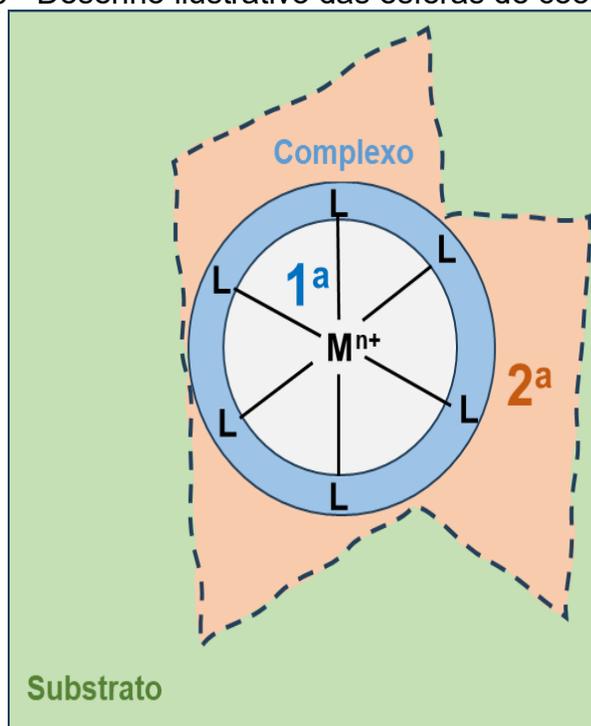
Em relação à esta seletividade por alvos biológicos, a mesma depende do grau de variabilidade dos complexos de metal de transição, conforme: o tipo de metal, o estado de oxidação, os ligantes coordenados, geometria de coordenação (formato) e tamanho. Todas estas características impactam na solubilidade e capacidade/modo de interação destas tesouras artificiais com o substrato. Portanto, é importante conhecer suas respectivas esferas de coordenação. (ANTHONY et al., 2020; FANTONI et al., 2021; MEDICI et al., 2015; PAGES et al., 2015; LEWIS, 2013; REEK et al., 2022; ZENKOVA, 2004; ZHAO; LIN, 2005).

1.3.3 Esferas de coordenação dos complexos metálicos

Assim como ocorre com as metalonucleases naturais, nos complexos metálicos há uma participação de uma esfera interna de coordenação metal-ligantes que atua diretamente na reação, denominada de primeira esfera de coordenação. Na segunda esfera de coordenação (figura 8), ligantes próximos modulam a reação, conferindo estabilidade ao estado de transição, através de efeitos estéricos e interações não covalentes (ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals), que podem ocorrer entre os próprios ligantes, com o meio

ambiente e também com o substrato, conferindo estereo e regio seletividade (LEWIS, 2013; REEK et al., 2022; ZENKOVA, 2004; ZHAO; LIN, 2005). Cientistas tem demonstrado que ligações de hidrogênio possuem um papel crucial neste caso (REEK et al., 2022).

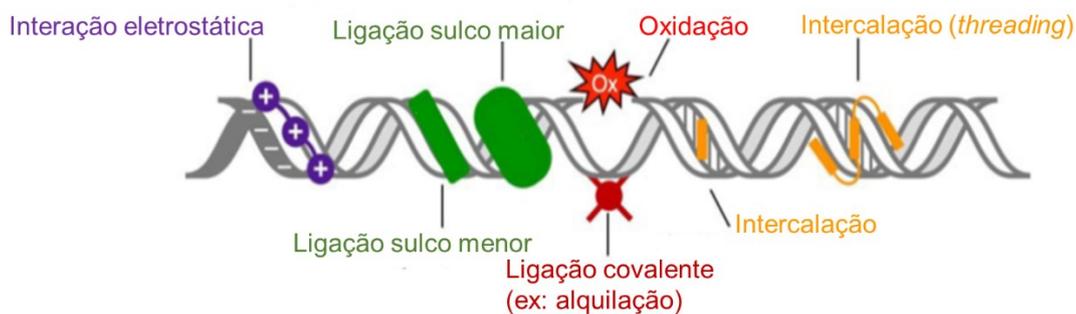
Figura 8 - Desenho ilustrativo das esferas de coordenação



L (ligante); M^{n+} (metal de transição coordenado); verde (substrato); azul (primeira esfera de coordenação do complexo); laranja claro (segunda esfera de coordenação). A segunda esfera medeia a primeira na interação com o substrato. Fonte: autora, a partir de informações contidas em (DAVIES; DUX; DUHME-KLAIR, 2009; LEWIS, 2013; REEK et al., 2022).

As esferas de coordenação influenciam também no modo como o complexo metálico se interage com o DNA. Seja através de ligações covalentes, por meio da formação de aductos metal-nucleobase como no caso da cisplatina, ou por meio de interações não covalentes reversíveis, como as eletrostáticas, as ligações aos sulcos (maior e/ ou menor) e a intercalação com o DNA (figura 9) (FANTONI; BROWN; KELLETT, 2021).

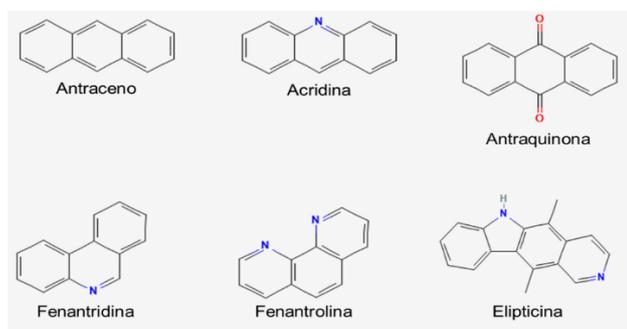
Figura 9 - Interação das metalonucleases artificiais com o DNA



Fonte: traduzido de FANTONI et al., 2021.

Em relação à intercalação, esta ocorre geralmente quando uma molécula aromática policíclica carregada positivamente é inserida não covalentemente entre os pares de base do DNA, através de empilhamento (interações do tipo π - π), trazendo mudanças estruturais significativas de alongamento, enrijecimento e desenrolamento da dupla hélice. Fazem parte da família de intercaladores os antracenos, as fenantrolinas, as acridinas, antraquinonas e elipticinas. Outro tipo de intercalação menos comum é o *threading*, que combina intercalação com ligação aos sulcos do DNA (ANDREZÁLOVÁ; ORSZÁGHOVÁ, 2021; BARRA; NETTO, 2015; GRIMME, 2008; ZEGLIS; PIERRE; BARTON, 2007) (figura 10). Os ligantes de sulco maior (e.g verde de metila) e menor (e.g netropsina) penetram nas respectivas cavidades do DNA, através de interações eletrostáticas, de van der Waals e de pontes de hidrogênio. Neste caso, diferentemente da intercalação, o impacto sobre a estrutura do DNA é menor (ANDREZÁLOVÁ; ORSZÁGHOVÁ, 2021; PAGES et al., 2015).

Figura 10 - Família de intercaladores de DNA



Fonte: PubChem CID: 995; 3213; 6780; 8418; 9215; 9189 por (KIM et al., 2023); modificado pela autora.

1.3.4 Complexos de cobre (II) derivados de 1,4,7 - triazaciclononano (tacn)

O cobre é um dos metais cruciais para várias funções fisiológicas, por exemplo: respiração mitocondrial, assimilação de nitrogênio, defesa contra o estresse oxidativo mediada principalmente pela superóxido dismutase (SOD), interação com o ácido nucleico e proteínas, além de ser utilizado no desenvolvimento de antibióticos (DALECKI; CRAWFORD; WOLSCHEENDORF, 2017). Na natureza, ambos os estados de oxidação - cobre(I) e cobre(II) - podem estar envolvidos na catálise e no transporte de oxigênio, interagindo com diferentes átomos e moléculas dependendo do estado de oxidação e do ambiente, apresentando estruturas e geometrias variáveis (LEON et al., 2017; SANTINI et al., 2014).

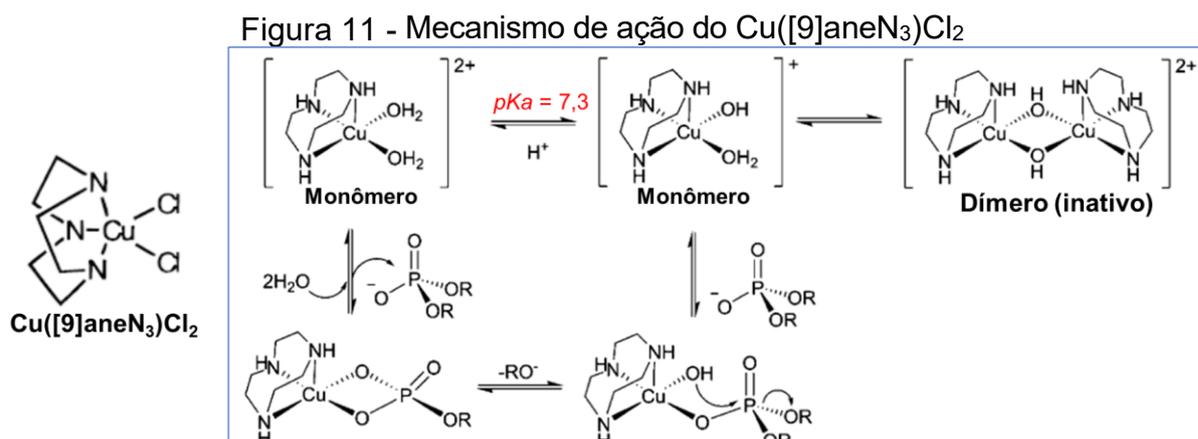
O cobre(II) é encontrado coordenado a grupos fosfato ou nucleobases, preferencialmente pares de bases guanina-citosina N7, além de ser um forte ácido de Lewis (ERXLEBEN, 2018; HEGG; BURSTYN, 1998; SANTINI et al., 2014; SISOËFF; GRISVARD; GUILLÉ, 1978). A atuação deste metal pode ser tanto por via hidrolítica quanto oxidativa, o que torna este metal muito versátil (ZENKOVA, 2004).

As pesquisas envolvendo este metal é muito antigo. Além dos antibióticos, desde a década de 1960, complexos de cobre têm sido testados e aplicados para muitos fins biológicos, tais como sondas de DNA, anticancerígenos e para uso experimentais em ensaios de clivagem e *footprinting* (DALECKI; CRAWFORD; WOLSCHEENDORF, 2017; ERXLEBEN, 2018).

Em relação aos compostos utilizados em química inorgânica biológica, ligantes N-doadores são geralmente utilizados para mimetizar resíduos de aminoácidos que apresentam átomos de nitrogênio como coordenantes, como por exemplo a histidina. Macrociclos de poliaza, como o 1,4,7-triazaciclononano (tacn) são N-doadores com estrutura cíclica e coordenação facial usados como cerne para compostos supramoleculares, tornando-se muito populares como ligantes por serem versáteis na complexação seletiva de íons metálicos, devido sua alta estabilidade cinética e termodinâmica, conferida pelo seu efeito quelante (AURAS et al., 2016; DE ALMEIDA et al., 2013; JOSHI; GRAHAM; SPICCIA, 2015; MACEDI et al., 2020). A primeira nuclease artificial usando tacn como ligante foi um complexo de cobre(II) descrito pelo grupo de pesquisa liderado pela pesquisadora Judith Burstyn (DEAL;

BURSTYN, 1993; DEAL; HENGGE; BURSTYN, 1996; DECK; TSENG; BURSTYN, 2002; HEGG; BURSTYN, 1996, HEGG; BURSTYN, 1998).

Em uma solução aquosa, o complexo cobre(II)(1,4,7-triazaciclononano) dicloro, também conhecido como $\text{Cu}([\text{9}]\text{aneN}_3)\text{Cl}_2$, forma uma espécie de dímero e monômero com ponte hidroxô. Para que ocorra a hidrólise do DNA, a espécie ativa (monomérica) deve ser formada pela desprotonação de uma molécula de água coordenada, que é dependente do pH do meio reacional, gerando o nucleófilo e permitindo o ataque ao substrato fosfodiéster (figura 11). Em pH muito próximo ao neutro, ou seja $\leq pK_a$ 7,3 de formação do monômero menos protonado, o estado dimérico (inativo) é prevaletido e a hidrólise não acontece. $\text{Cu}([\text{9}]\text{aneN}_3)\text{Cl}_2$ atua na presença ou ausência de oxigênio (pH 7,8) sugerindo uma via mista (hidrolítica e oxidativa) para a clivagem do DNA (HEGG; BURSTYN, 1996, HEGG; BURSTYN, 1998).



Fonte: modificado pela autora a partir de (DEAL; BURSTYN, 1996; HEGG, BURSTYN, 1998; JOSHI et al 2015).

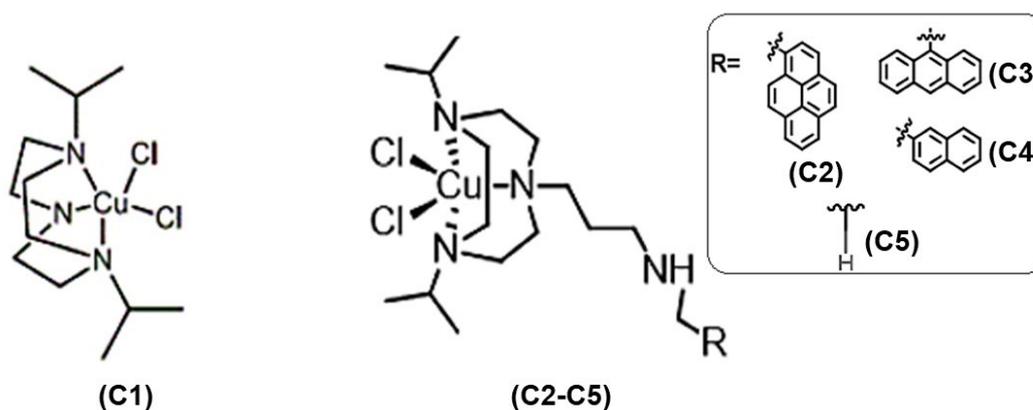
1.3.4.1 Melhorias nos complexos mononucleares clássicos de cobre(II) e tacn

Conforme descrito anteriormente, ao longo do tempo, os complexos metálicos foram modificados com a intuito de trazer melhorias na segunda esfera de coordenação, conseqüentemente trazendo acréscimos na especificidade, na eficiência catalítica e na afinidade ao DNA, ou seja, melhor desempenho (ANJOMSHOA; AMIRHEIDARI, 2022; LEWIS, 2013; MANCIN et al., 2005; REEK et al., 2022; ZENKOVA, 2004; ZHAO; LIN, 2005). Um exemplo disso são os complexos binucleares $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ com ponte μ -hidroxô, que mimetizam as fosfatases ácidas púrpuras (PAPs) do feijão vermelho (NEVES et al., 2007), nos quais a introdução de pendentos diaminas (SILVA et al., 2017) e de um intercalante pireno (CAMARGO et al.,

2018) trouxeram incremento à atividade catalítica sobre o DNA. A incorporação de mais um centro metálico de paládio $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{Pd}^{\text{II}}(1)$ permitiu também a formação de aductos covalentes com o DNA (GABRIEL et al., 2022).

Deste modo, pensando em incrementar a segunda esfera de coordenação, seja por interações π - π (intercalação), de Van der Waals, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas, grupos isopropil (**C1**) e pendentos contendo pireno (**C2**), antraceno (**C3**), naftaleno (**C4**) e grupo amino (**C5**) (figura 12) foram incorporados aos ligantes 1,4,7-triazaciclono-nano dos complexos de cobre(II) descritos no tópico anterior (HEGG; BURSTYN, 1996).

Figura 12- Complexos **C1-C5**



Fonte: modificado pela autora a partir de dados não publicados (doutorado) da MSc. Bruna Auras e AURAS, 2017.

A síntese, a caracterização e a atividade catalítica usando o substrato modelo de fosfodiéster 2,4- BDNPP foram realizadas previamente pela MSc. Bruna Luiza Auras, como parte de seu mestrado (AURAS, 2017) e doutorado (não concluído) pelo programa de Química da UFSC.

Nesta tese, para complementar os estudos de Auras (2017), as metalonucleases artificiais **C1-C5** foram testadas biologicamente com o DNA plasmidial (ensaios *in vitro*) e os resultados obtidos foram comparados com a literatura.

2 OBJETIVOS

- a. Verificar se estes complexos metálicos **C1-C5** citados acima, são capazes de clivar o DNA plasmidial, interagir pelo sulco maior e/ou menor e reagir de forma dependente ou não de oxigênio (mecanismo oxidativo e/ou hidrolítico).
- b. Comparar os dados cinéticos obtidos com a literatura e averiguar, se neste caso, a presença dos grupos inseridos é relevante para aumentar a atividade nucleásica destas novas moléculas frente ao DNA plasmidial.

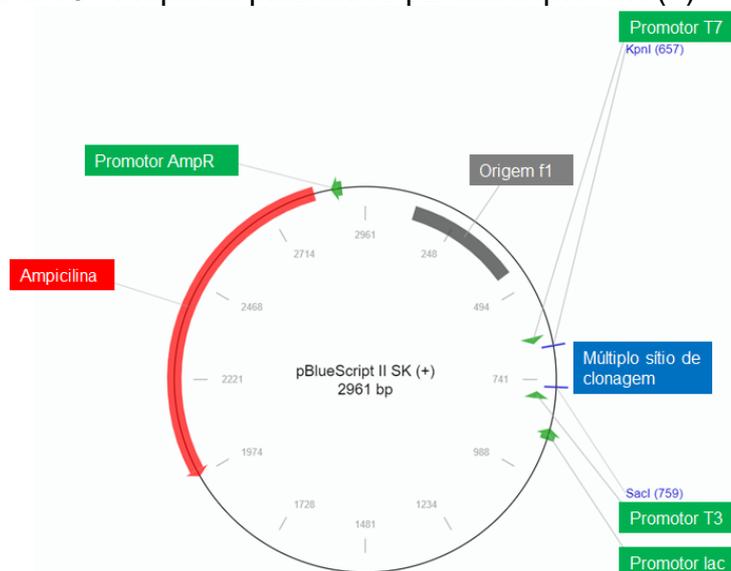
3 INTRODUÇÃO À METODOLOGIA DO CAPÍTULO 1

3.1 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DE DNA PLASMIDIAL

O plasmídeo é um DNA extracromossômico, geralmente de fita dupla e circular que ocorre naturalmente em alguns microorganismos, como por exemplo nas bactérias. A grande vantagem é a capacidade do mesmo em conter genes com propriedades de resistência, defesa e virulência importantes para garantir a sobrevivência de muitos microorganismos, incluindo os patogênicos. Alguns exemplos são os genes de resistência aos antibióticos, aos metais pesados e à radiação. De forma artificial, plasmídeos podem ser construídos através de ferramentas de biologia molecular e utilizados como vetores para clonagem, expressão heteróloga de um gene e/ ou transferência de genes (CLARK; PAZDERNIK; MCGEHEE, 2018; COHEN et al., 1973; ZAHA; BUNSELMAYER; PASSAGLIA, 2014).

A figura 13 representa um mapa do plasmídeo pBlueScript II SK (+) (Addgene) com a indicação dos seus elementos principais.

Figura 13 - Mapa do plasmídeo pBlueScript II SK (+)



Mapa contendo os elementos principais do plasmídeo, como origem de replicação f1 (cinza), promotores (verde) T3, lac e T7 e AmpR, gene de resistência ao antibiótico ampicilina (vermelho) e o múltiplo sítio de clonagem (MCS) ou polylinker (azul) que se inicia em KpnI e termina em SacI. As flechas indicam o sentido da transcrição que podem ser senso ou anti-senso. Fonte: fabricante Addgene, traduzida pela autora.

Os elementos principais de um plasmídeo são: a) origem de replicação: sequência que indica onde a replicação deve se iniciar; b) gene de resistência à

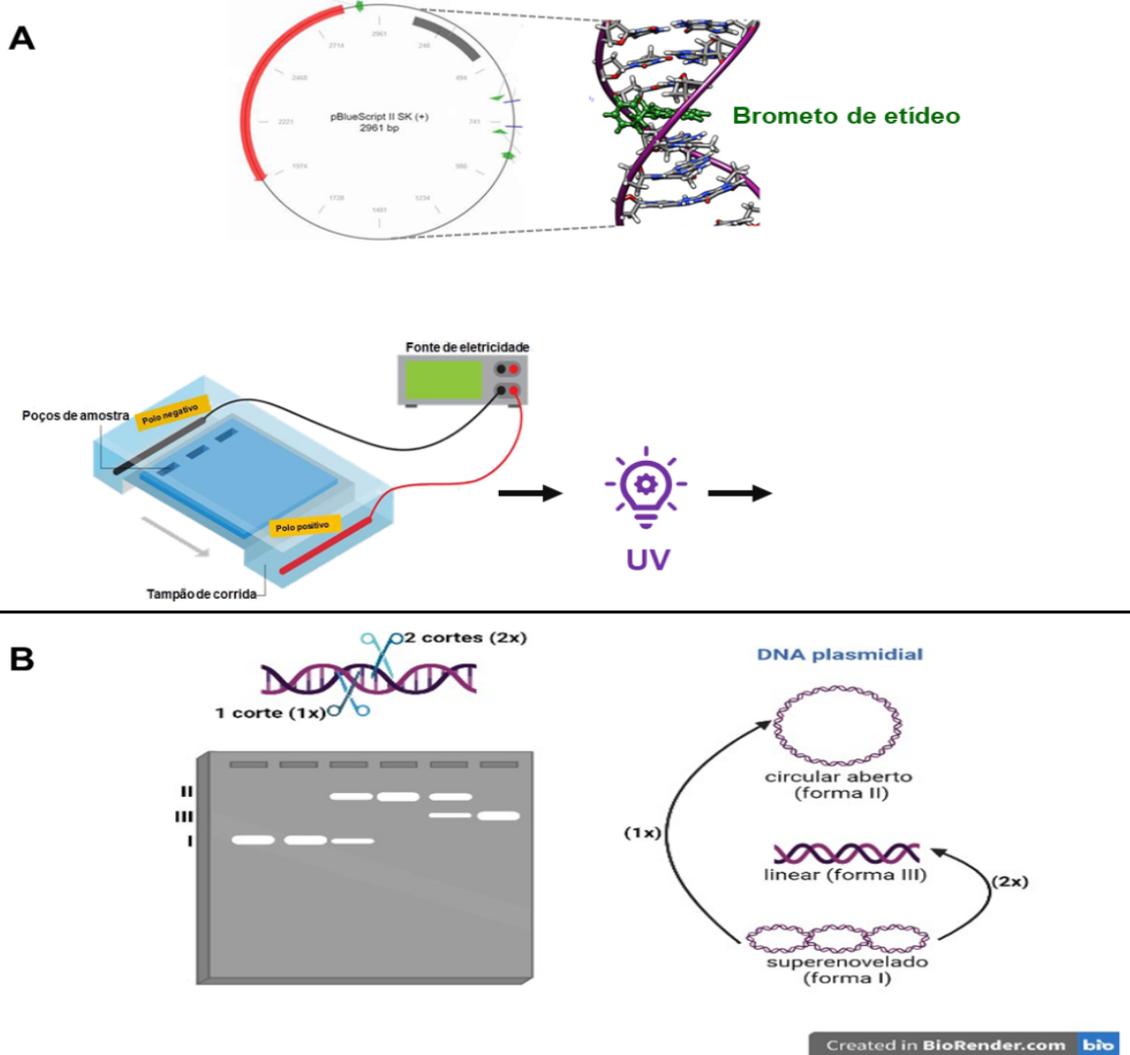
antibióticos; c) região promotora: local onde a enzima RNA polimerase se posiciona para iniciar a transcrição; d) múltiplo sítio de clonagem ou *polylinker*: região contendo vários sítios para enzimas de restrição distintas, importantes para facilitar a inserção de um fragmento de DNA por meio de técnica de clonagem; e) terminador: local que indica à RNA polimerase onde ocorre o fim da transcrição (CLARK; PAZDERNIK; MCGEHEE, 2018).

A técnica de eletroforese em gel de agarose é utilizada para separar material genético através do tamanho e carga elétrica. O DNA possui carga total negativa devido a presença de oxigênio do grupamento fosfato. Isso permite que o material genético juntamente com um intercalante, por exemplo o brometo de etídeo, possa migrar de forma diferente em um gel de agarose solidificado, quando submetido a uma diferença de potencial elétrico. Com isso, as moléculas menores conseguem migrar primeiro de forma mais rápida, enquanto as maiores migram de forma mais lenta (figura 14). Após a corrida eletroforética, o gel é visualizado e fotografado sob uma luz ultravioleta, possibilitando enxergar assim todas as bandas marcadas pelo intercalante (AAIJ; BORST, 1972; BORST, 2005; CARVALHO; RICCI; AFFONSO, 2010).

O emprego de DNA plasmidial nos ensaios de clivagem por complexo metálico se deve ao fato que são existentes três formas distintas de DNA plasmidial: superenovelada (I), circular aberta (II), e linear (III) (ROTH; HELINSKI, 1967). FI por ser mais compactado migra no gel de forma mais rápida, enquanto a forma III é intermediária e FII por ser a forma relaxada corre mais devagar no gel (AAIJ; BORST, 1972; BORST, 2005).

FI quando submetido a uma cisão de uma das suas fitas passa a migrar de forma lenta (FII) e quando sofre uma segunda cisão na outra fita, passa a correr no gel de agarose de forma intermediária (FIII) (figura 14). Deste modo, é possível verificar a clivagem do DNA plasmidial pelo complexo metálico a partir da separação, interpretação e quantificação das diferentes bandas de gel de agarose que representam as diferentes formas de DNA com mobilidade eletroforética diferenciadas (HORMANN; STRELLER; KULAK, 2018; SHUBSDA; GOODISMAN; DABROWIAK, 1997).

Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose de DNA plasmidial clivado por complexos metálicos

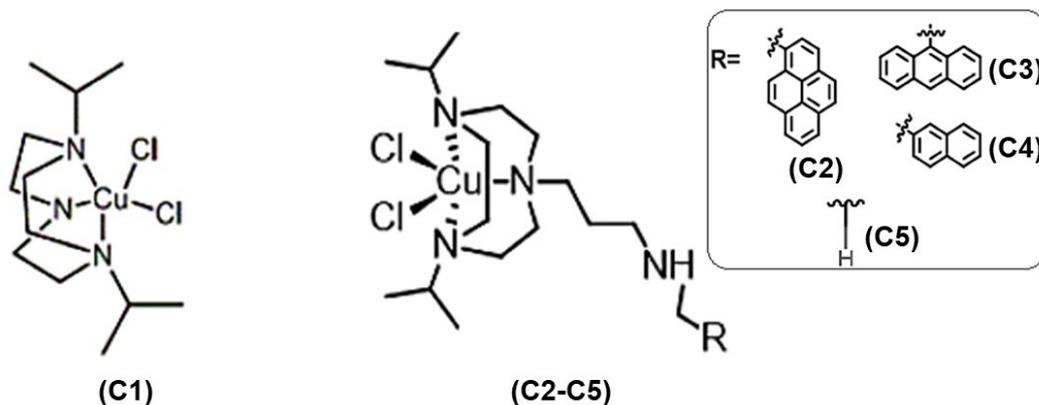


Fonte: (BIORENDER, 2023; GALINDO-MURILLO; CHEATHAM; 2021; KHAN ACADEMY, 2023; TECHNOLOGY NETWORKS, 2023) modificado elaborado pela autora.

A ideia central envolvendo DNA plasmidial e eletroforese serve como base para compreensão de todas as metodologias descritas nos tópicos a seguir.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

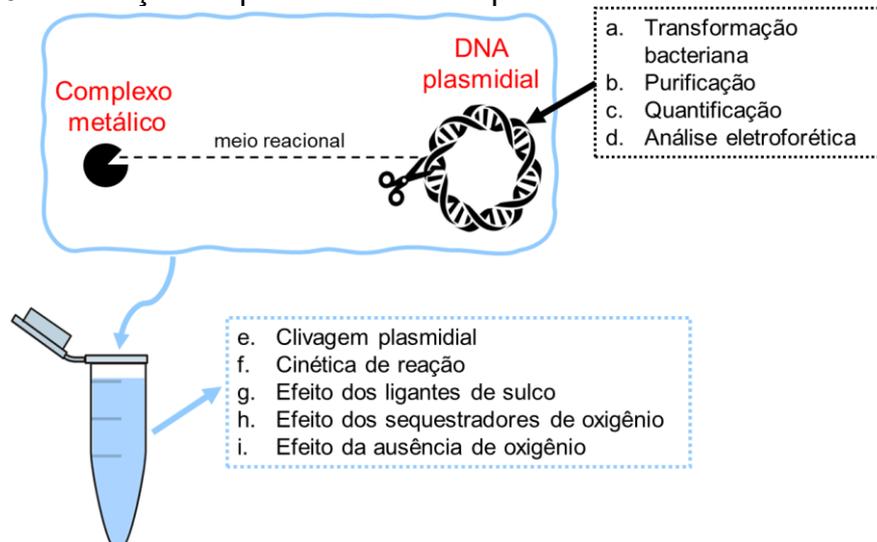
Figura 15 - Complexos **C1-C5**



Fonte: modificado pela autora a partir de dados não publicados (doutorado) da MSc. Bruna Auras e de AURAS, 2017.

Na figura abaixo (figura 16), encontra-se um resumo de todas as etapas que foram executadas, envolvendo os complexos **C1-C5** (figura 15).

Figura 16 - Ilustração esquemática das etapas de todas as técnicas executadas



Ordem alfabética (a-i) indica a sequência de todas as etapas executadas. Fonte: elaborado pela autora.

Todos os reagentes utilizados foram de grau de pureza compatível com análises de biologia molecular. Para evitar possível contaminação microbiana, as soluções utilizadas nos ensaios foram previamente filtradas em membranas Millex de 0,22 μm (Millipore®).

4.1 OBTENÇÃO, PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL

O plasmídeo pBluescript II SK (2961 pb) (figura 13) na forma superenovelada (figura 14) foi obtido através de transformação por choque térmico, metodologia desenvolvida por (MANDEL; HIGA, 1970) relatada por (AUSUBEL, 1995), técnica original foi modificada no LABIME. Alíquotas de bactérias *E. coli* cepa DH5 α cálcio-competentes, armazenadas a -80°C foram descongeladas no gelo e cerca de 1 ou 2 μL do plasmídeo (10-50 ng) foi adicionado a cada tubo, a mistura foi incubada em gelo por 20 minutos, seguida de choque térmico a 42°C por 1 minuto e 30 segundos e banho de gelo por 2 minutos. Após o choque térmico, foram adicionados 500 μL de meio L.B (Luria-Bertani) ou 450 μL de meio S.O.C (meio SOB com 20 mM glicose) e as bactérias foram incubadas a 37°C por 45 minutos sob agitação. Após esta etapa, as células foram plaqueadas em meio LB-ágar (Luria-Bertani: 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura e 10g de cloreto de sódio e 15 g de ágar em 1000 ml de água destilada) com antibiótico ampicilina (concentração final de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubadas a 37°C por 12-16 horas. Para extração do DNA plasmidial, colônias isoladas foram extraídas da placa com auxílio de ponteira estéril e incubadas nas mesmas condições anteriores, em meio L.B líquido, sem conter ágar.

A purificação do DNA seguiu o protocolo descrito pelo fabricante do kit HiSpeed® Plasmid Mid Kit (Qiagen®). O material genético foi quantificado por espectrofotometria UV-Vis na absorvância de 260 nm (A_{260}) e sua pureza foi determinada através das razões $A_{260}/280$ ($\geq 1,8$) e $A_{260}/230$ ($\geq 1,8$), para avaliar, respectivamente, a pureza em relação à proteína e aos contaminantes, conforme (MANCHESTER, 2018) e o livro de protocolos de (AUSUBEL, 1995). Para avaliação da integridade, foram realizadas análises eletroforéticas de gel de agarose.

4.2 CLIVAGEM DO PLASMÍDEO POR **C1-C5**

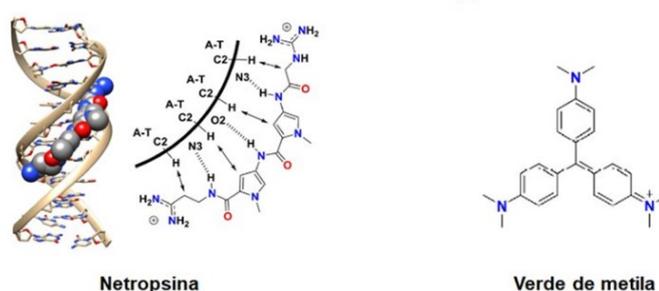
Para as reações de clivagem, amostras contendo 330 ng do plasmídeo ($25 \mu\text{molL}^{-1}$), 10 mmolL^{-1} HEPES pH 8,0 (concentração final) e concentrações crescentes de complexos metálicos **C1-C5** foram testados previamente por alguns períodos de incubação (4h-16h) em temperaturas de 37°C e 45°C . O tempo e temperatura ótimos variaram de acordo com cada complexo. Como controle, o cobre(II) 1,4,7-

triazaciclono-nano-dicloro ($\text{Cu}[9]\text{aneN}_3\text{Cl}_2$), descrito por (DEAL; HENGGE; BURSTYN, 1996; HEGG; BURSTYN, 1996) foi empregado nas mesmas condições do complexo **C1**. As reações de clivagem foram interrompidas pela adição de 5 μL de tampão de parada ($0,25 \text{ molL}^{-1}$ EDTA, pH 8,0, 50% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol), e as amostras foram armazenadas em geladeira (4°C). Em seguida, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1%) com intercalante brometo de etídio ($0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 100 min a 90 V em tampão TBE 0,5X (Tris $44,5 \text{ mmolL}^{-1}$, ácido bórico $44,5 \text{ mmolL}^{-1}$, EDTA 1 mmolL^{-1} , pH 8,0) e os géis foram visualizados e fotografados em sistema DigiDoc-It (UVP, EUA). Os três diferentes topoisômeros de DNA plasmidial (I superenovelado, II circular e III linear) foram quantificados por densitometria óptica via KODAK Molecular Imaging Software 5.0 (Carestream Health, EUA). Devido à capacidade do brometo de etídio de intercalar em menor grau no DNA de forma I, o fator de correção 1,47 foi aplicado neste caso (BERNADOU et al., 1989; SHUBSDA; GOODISMAN; DABROWIAK, 1997).

4.3 INTERAÇÃO DOS COMPLEXOS METÁLICOS NO DNA

Para verificar qual a preferência de **C2-C4** pelo sulco menor e/ou maior do DNA, foram utilizados inibidores netropsina ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$) (VAN DYKE; HERTZBERG; DERVAN, 1982) para sulco menor e verde de metila para sulco maior (GONZALEZ-GARCIA; VILAR, 2017; KIM; NORDÉN, 1993) (figura 17). As concentrações de complexos metálicos utilizadas nesses experimentos foram de $25 \mu\text{molL}^{-1}$ para **C2** e $100 \mu\text{molL}^{-1}$ para **C3** e **C4**. Observação: este experimento não foi realizado para **C1** e **C5** (vide Resultados e Discussão do capítulo 1).

Figura 17 – Estrutura da netropsina e do verde de metila



Inibidores de sulco do DNA : **A.** Netropsina intercalando o DNA no sulco menor. **B.** estrutura do Verde de Metila, intercalante de sulco maior. Fonte: (GONZALEZ-GARCIA; VILAR, 2017), traduzido pela autora.

4.4 CINÉTICA DE CLIVAGEM DO DNA

Os ensaios cinéticos de clivagem foram realizados utilizando-se um volume final de 140 μL , no qual 14 μL de plasmídeo ($165 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), 14 μL de HEPES 100 mmol L^{-1} (pH 8,0), 77 μL de água ultrapura livre de nuclease e 35 μL de complexos metálicos (**C2**: $10 \text{ } \mu\text{molL}^{-1}$; **C3**, **C4** e **C5**: $50 \text{ } \mu\text{molL}^{-1}$) foram adicionados, a 45°C por 4h. Alíquotas de 20 μL foram coletadas em diferentes tempos (0; 0,5; 1; 2; 3 e 4 h), as reações foram interrompidas com tampão de parada e submetidas à eletroforese em gel de agarose. As constantes cinéticas de observação (k_{obs}) foram estimadas considerando condições cinéticas de pseudo-primeira ordem (LIBRETEXTS, 2023; SREEDHARA; FREED; COWAN, 2000). O valor de k_{obs} foi obtido diretamente do coeficiente angular das regressões lineares obtidas a partir do gráfico do logaritmo natural da razão entre a quantidade final e inicial de DNA (forma I) versus o tempo de reação. Observação: este experimento não foi realizado para **C1** (vide Resultados e Discussão do capítulo 1).

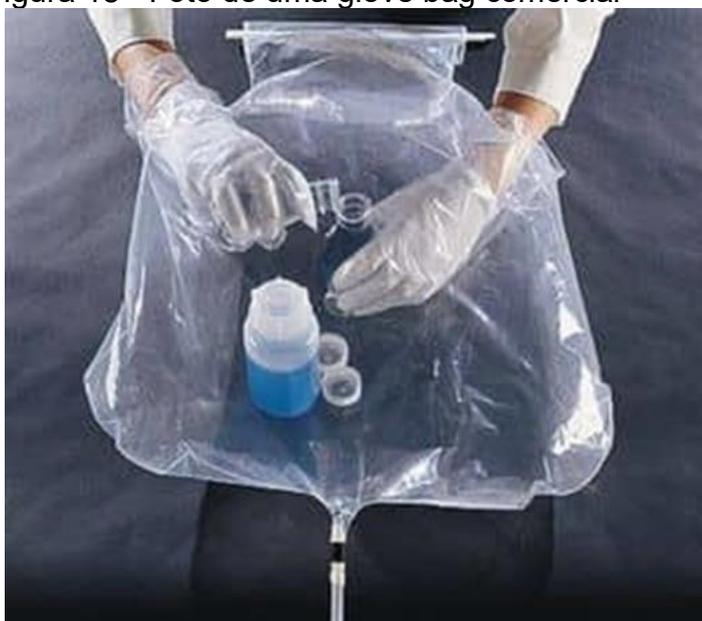
4.5 MECANISMO DE CLIVAGEM

Para avaliar o mecanismo de clivagem do DNA e distinguir entre um mecanismo hidrolítico ou oxidativo, (YU; COWAN, 2018) experimentos foram realizados na presença de: $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ metanol, $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ KI, $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ NaN_3 , que correspondem respectivamente aos sequestradores de espécies reativas de oxigênio dos radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$); do peróxido de hidrogênio e do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$).

Para entender se o oxigênio molecular influencia as reações dos complexos metálicos (**C2**, **C3** e **C4**) com o DNA, os ensaios de clivagem também foram realizados em ambiente livre de oxigênio, nas mesmas condições descritas nos procedimentos anteriores. Para isto, foi então utilizado uma *glove bag*, contendo no seu interior todo material necessário para os experimentos, conforme figura 18. O ar foi retirado completamente do espaço hermético através de bomba à vácuo e substituído por argônio. Para realizar esta etapa, o processo de esvaziar e completar com argônio foi realizado durante três vezes dentro da *glove bag*, para garantir completa remoção do oxigênio. As soluções também foram borbulhadas previamente com argônio, garantindo a remoção de qualquer resquício de oxigênio (SCARPELLINI et al., 2003).

Para esses experimentos, foram necessários dois controles: um negativo contendo apenas 1:1 acetonitrila/água ultrapura livre de nuclease e nenhum complexo metálico, um controle positivo da reação contendo 2 μL de Fe-EDTA (1 mmolL^{-1}) e 2 μL de DTT (10 mmolL^{-1}), que é indicador da presença de oxigênio, uma vez que sob esta atmosfera é capaz de produzir grandes quantidades de radicais hidroxila. Observação: os testes envolvendo atmosfera de argônio não foram realizados para **C1** e **C5** (vide Resultados e Discussão do capítulo 1).

Figura 18 - Foto de uma glove bag comercial



Fonte: FISHER SCIENTIFIC, 2023.

4.6 ANÁLISE DE DADOS

Todos os dados encontrados foram processados no Excel[®] (Microsoft 365) e os gráficos no GraphPad[®] Prism 5 e GraphPad[®] Prism 10 (versão teste). As análises estatísticas seguiram os protocolos apresentados pela literatura de cada técnica, conforme citado anteriormente.

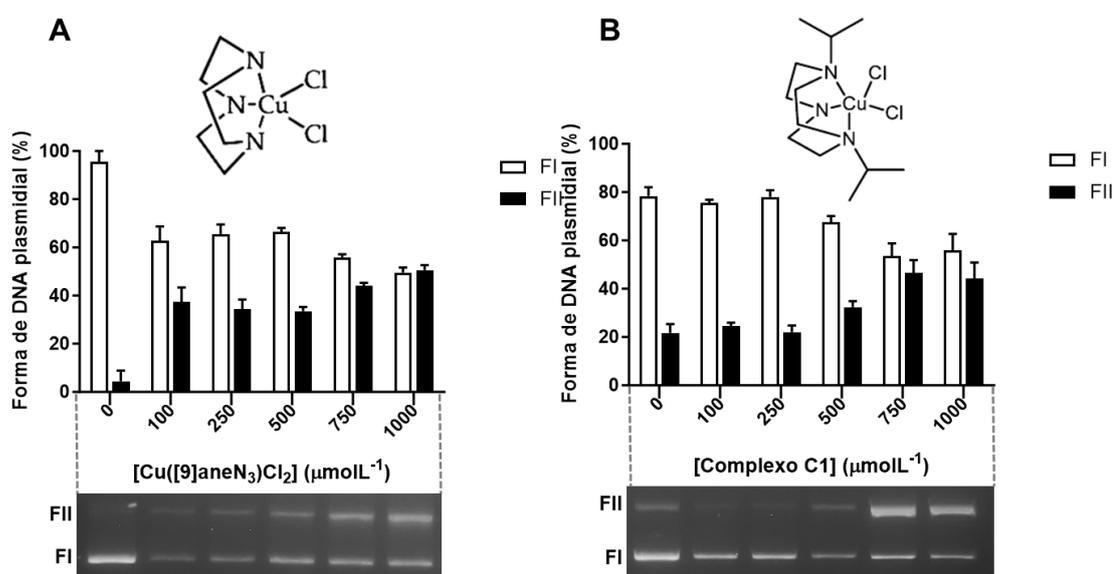
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para fins comparativos, **C1-C4** e **C5** foram agrupados em duas categorias distintas, pois as temperaturas ótimas de reação encontradas para cada um foram diferentes, 45°C e 37 °C, respectivamente.

5.1 COMPLEXOS C1-C4

A capacidade de clivagem do DNA por **C**, que contém grupamentos isopropil, foi comparada ao complexo original (Cu[9]aneN₃)Cl₂ (DEAL; HENGGE; BURSTYN, 1996; HEGG; BURSTYN, 1996) conforme Figura 19. Foi possível verificar que a adição de dois grupos isopropil ao ligante tacn causou um discreto aumento na atividade nucleásica. Conforme figura 19a, o complexo **C1** cliva 50% do DNA plasmidial (forma II) a 750 μmol L⁻¹, enquanto (Cu[9]aneN₃)Cl₂ precisa de uma concentração mais alta de 1000 μmol L⁻¹. Ou seja, um aumento de 1,33 vezes.

Figura 19 - Clivagem do DNA por (Cu[9]aneN₃)Cl₂ e **C1**

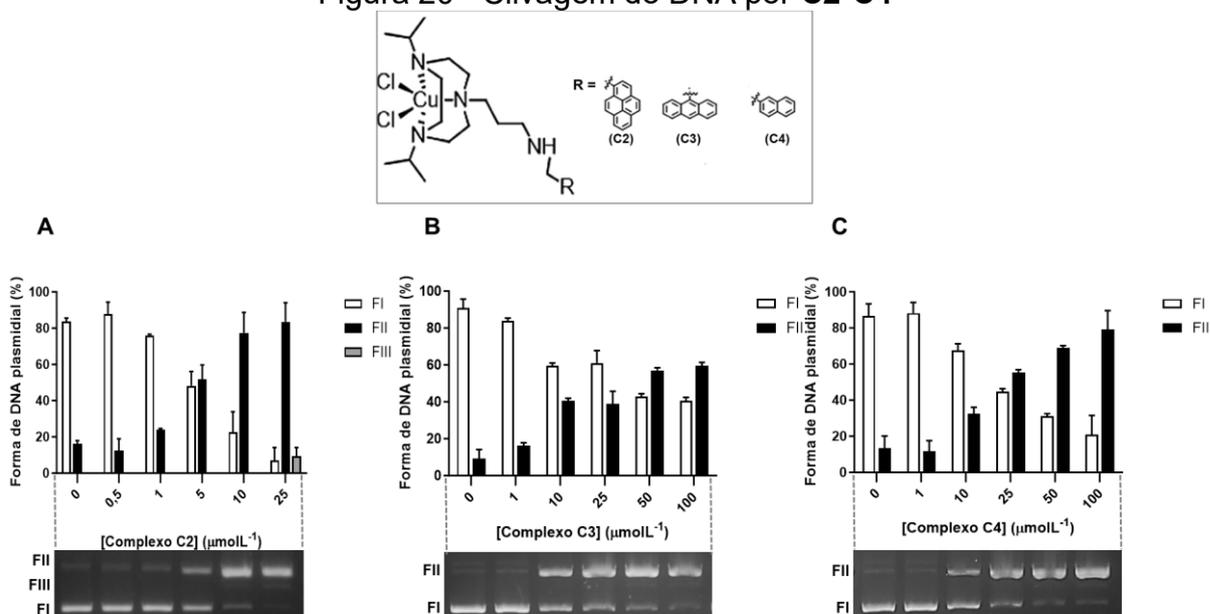


Clivagem do DNA plasmidial superrenovado (forma I) em DNA circular (forma II) por (Cu[9]aneN₃)Cl₂ (**A**) e complexo **C1** (**B**). Condições de reação: concentração: 0–1000 μmol L⁻¹, [DNA]= 330 ng (25 μmol L⁻¹), [Tampão] =HEPES (10 mmol L⁻¹, pH 8,0), T= 45 °C, t= 8 h. A concentração zero corresponde ao controle negativo, composto por solução contendo água ultrapura livre de acetonitrila/nuclease 1:1 sem complexo metálico. Dados representativos de três testes diferentes expressos como média ± DP (desvio padrão). Fonte: autora.

Os grupos isopropila conseguem aumentar a densidade eletrônica sobre o íon cobre, aumentando a capacidade nucleofílica do grupo OH (AURAS, 2017). Um aumento de 2,5 vezes ocorreu no complexo encontrado na literatura [Cu-(*i*-Pr₃[9]aneN₃)(OTf)(OH₂)]OTf sintetizado por Deck e colaboradores (2002) em comparação com (Cu[9]aneN₃)Cl₂ (DECK; TSENG; BURSTYN, 2002). Entretanto, é importante ressaltar que as condições de reação utilizada por este grupo, ou seja, sistema anaeróbico, temperatura a 50 °C, tampão HEPESO 40 mmolL⁻¹, tempo 24h e concentração 1-25 μmolL⁻¹ (DECK; TSENG; BURSTYN, 2002) foram muito diferentes dos aplicados neste estudo.

Em Auras (2017), nas reações envolvendo substrato 2,4- BDNPP, **C1** apresentou ponto de inflexão sigmóidial cinético em pH 8,5, acima do *pKa* cinético do complexo original (*pKa* 7,3) (DEAL; BURSTYN, 1996; HEGG; BURSTYN, 1996). Estas informações corroboram com os testes envolvendo DNA plasmidial, de que não haveria um incremento significativo na atividade de nuclease por **C1** em pH 8,0. Deste modo, foi decidido que os demais experimentos com **C1** não seriam executados, uma vez que sua atividade foi muito semelhante à Cu[9]aneN₃)Cl₂ (HEGG; BURSTYN, 1996).

Figura 20 - Clivagem do DNA por **C2-C4**



Clivagem do DNA plasmidial superenovelado pelos complexos **C2** (a), **C3** (b) e **C4** (c). Condições de reação: [**C2**] = 0–25 μmol L⁻¹, [**C3**] = 0-100 μmol L⁻¹, [**C4**] = 0-100 μmol L⁻¹, [DNA]= 330 ng (25 μmolL⁻¹), [Tampão] = HEPES (10 mmolL⁻¹, pH 8,0), T=45 °C, t=4h. A concentração zero corresponde ao controle negativo composto por 1:1 diluente de água ultrapura livre de acetonitrila/nuclease sem complexo metálico. Dados representativos de três testes diferentes, expressos em média ± DP.

Fonte: autora.

Os complexos metálicos C modificados contendo ligantes de pireno (**C2**), antraceno (**C3**) e naftaleno (**C4**) aumentaram significativamente a atividade de clivagem do DNA (Figura 20). Em comparação com o complexo **C1**, na mesma temperatura de incubação, o tempo de reação para **C2**, **C3** e **C4** foi reduzido pela metade, para 4h. Para a obtenção de 50% de DNA circular clivado foram necessárias as seguintes quantidades de complexo: $5 \mu\text{molL}^{-1}$ de **C2** (figura 20a), $50 \mu\text{molL}^{-1}$ de **C3** (figura 20b), e $25 \mu\text{molL}^{-1}$ de **C4** (figura 20c). Ou seja, comparativamente com **C1**, este valor corresponde 150, 15 e 30 vezes mais atividade, respectivamente. Se considerarmos que essas reações ocorreram em 4h em vez de 8h, o valor dobra para 300 (**C2**), 30 (**C3**) e 60 (**C4**) vezes mais, respectivamente. Portanto, considerando esse mesmo raciocínio, **C2** é 400 vezes mais ativo que $(\text{Cu}[9]\text{aneN}_3)\text{Cl}_2$ (figura 19a e 20a), nas condições deste estudo (concentração final de HEPES 10 mmolL^{-1} ; pH 8,0; $T=45^\circ\text{C}$; $t=8 \text{ h}$). Comparativamente, Hegg e Burstyn (1996) verificaram que $1000 \mu\text{molL}^{-1}$ de $(\text{Cu}[9]\text{aneN}_3)\text{Cl}_2$ clivava 50% do DNA superenovelado a pH 7,8 (tampão HEPES de 40 mM) em 12h, a 50°C . Assim, **C2**, sob nossas condições, é cerca de 600 vezes mais ativo em comparação com o complexo original $(\text{Cu}[9]\text{aneN}_3)\text{Cl}_2$ (HEGG; BURSTYN, 1996).

Figura 21 - Gráfico de k_{obs} de **C2-C4**

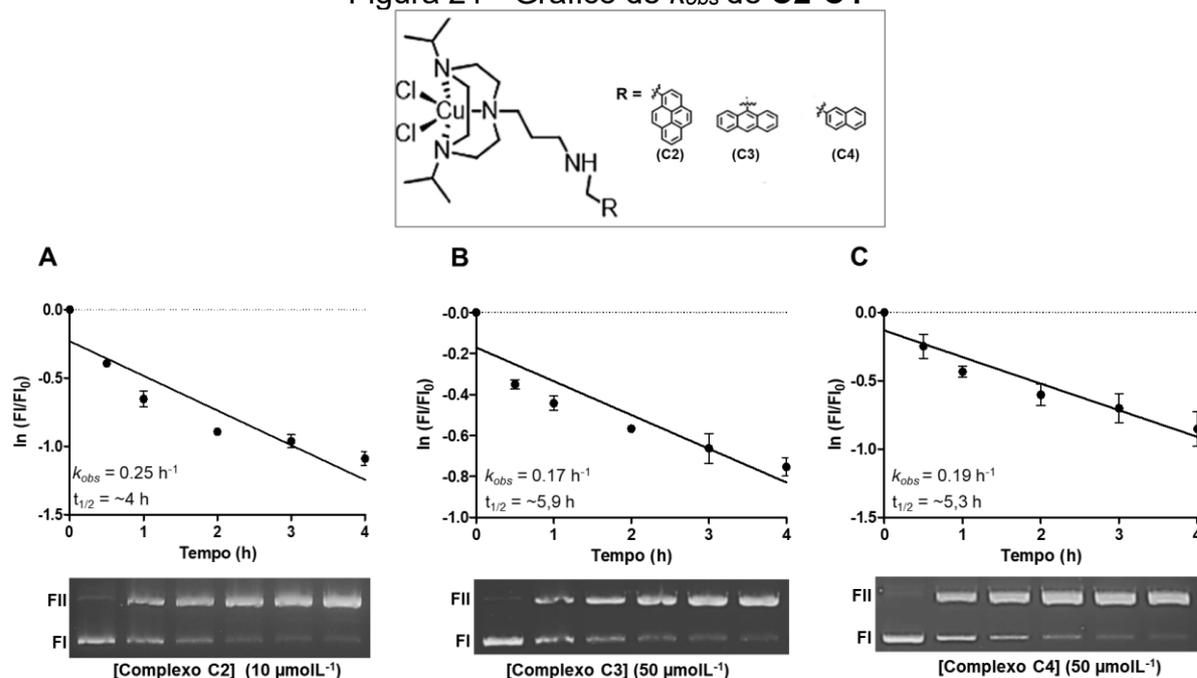


Gráfico do logaritmo natural (FI/FI_0) versus concentração dos complexos **C2** (a), **C3** (b) e **C4** (c). k_{obs} calculados obtidos a partir do coeficiente angular da reta: $0,25 \pm 0,029 \text{ h}^{-1}$ (a), $0,17 \pm 0,018 \text{ h}^{-1}$ (b) e $0,19 \pm 0,019 \text{ h}^{-1}$ (c) para **C2**, **C3** e **C4**, respectivamente. A vida intermediária ($t_{1/2}$) foi de cerca de 4 h,

5,9 h e 5,3 h para **C2**, **C3** e **C4**, respectivamente. Condições de reação: [**C2**] = 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [**C3**] = 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [**C4**] = 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [DNA] = 330 ng (25 $\mu\text{mol L}^{-1}$), [Buffer] = HEPES (10 mmol L^{-1} , pH 8,0), T = 45°C, t = 0-4h. Dados representativos de três testes expressos como média \pm DP. Fonte: autora.

C2 mostrou ser a nuclease mais ativa em relação aos três complexos, com o maior valor de k_{obs} de $0,25 \pm 0,029 \text{ h}^{-1}$ (Figura 21a). **C3** e **C4** apresentaram valores k_{obs} muito semelhantes de $0,17 \pm 0,018 \text{ h}^{-1}$ (Figura 21b) e $0,19 \pm 0,019 \text{ h}^{-1}$ (Figura 21c). É importante ressaltar que a concentração utilizada para este ensaio foi cinco vezes menor para **C2** (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em relação à **C3** e **C4** (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Os valores das constantes observadas foram comparáveis com os encontrados na literatura, como por exemplo o complexo de zinco dinuclear derivado do triazaciclononano denominado de Zn^{II}_2 , que apresentou um valor de k_{obs} de $0,136 \text{ h}^{-1}$ (SHENG et al., 2008).

(LIU et al., 2019) também sintetizaram e caracterizaram complexos mononucleares com derivados tacn 4-benziloxi-benzil-1,4,7-triazaciclononano (btacn): $\text{Cu}(\text{btacn})\text{Cl}_2$, $\text{Zn}(\text{btacn})\text{Cl}_2$ e $[\text{Cu}(\text{btacn})_2](\text{ClO}_4)_2$ foram submetidos à clivagem do DNA com pBR322, em pH 7,4 (Tris-HCl/NaCl), a 37°C por 3h. $\text{Zn}(\text{btacn})\text{Cl}_2$ não apresentou atividade de clivagem, enquanto os complexos com centros de cobre apresentaram bons resultados (LIU et al., 2019a). O melhor resultado cinético obtido para $[\text{Cu}(\text{btacn})_2](\text{ClO}_4)_2$ foi $k_{\text{obs}} = 7,15 \pm 0,3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ com 0,78 mmol L^{-1} de complexo (LIU et al., 2019b). As condições aplicadas neste estudo (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de **C2**, HEPES 10 mmol L^{-1} ; pH 8,0; T=45 °C; t=4 h) diferem dos utilizados por Liu e colaboradores (2019), mas, comparativamente, **C2** mostrou-se muito ativo, com $k_{\text{obs}} = 6,94 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($0,25 \text{ h}^{-1}$; Figura 21a), e muito semelhante a $[\text{Cu}(\text{btacn})_2] \cdot (\text{ClO}_4)_2$.

C2 também apresentou um bom valor de k_{obs} , indicando um aumento na clivagem do DNA plasmidial 964 vezes mais que $(\text{Cu}[\text{9}] \text{aneN}_3)\text{Cl}_2$ ($k_{\text{obs}} = 7,2 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$), estudo feito por Deal e Burstyn (1996). Além disso, embora diferentes substratos tenham sido empregados, este valor representa um aumento significativo na atividade de clivagem do DNA por **C2** em comparação com a referência $(\text{Cu}[\text{9}] \text{aneN}_3)\text{Cl}_2$ (DEAL; BURSTYN, 1996; DEAL; HENGGE; BURSTYN, 1996; HEGG; BURSTYN, 1996).

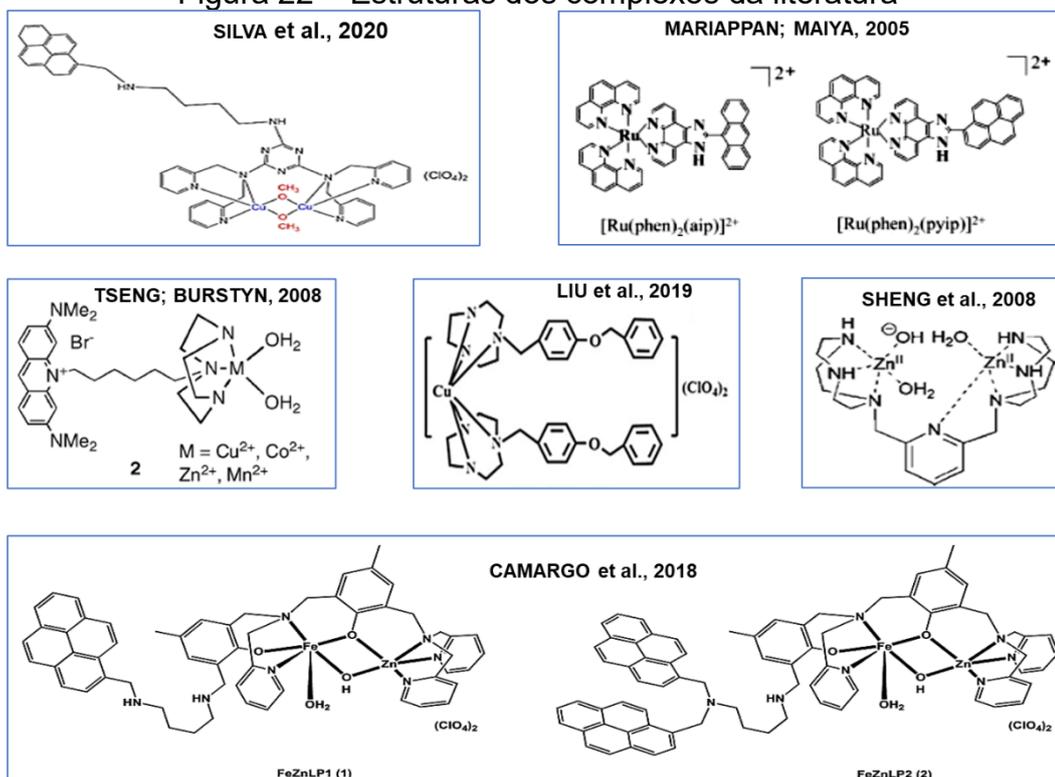
Mariappan e Maiya (2005) (MARIAPPAN; MAIYA, 2005) relataram um aumento na clivagem do DNA com a inserção de unidades de antraceno e pireno em complexos de polipiridilrutênio(II), que eles chamaram de $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{aip})]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pyip})]^{2+}$. Curiosamente, o complexo com pireno (pyip) também apresentou

maior atividade de clivagem do que aquele modificado com antraceno (aip), como observado no estudo aqui relatado.

Um aumento na atividade catalítica empregando pireno como pendente aromático, sem alterar o mecanismo de ação, foi observado para outros complexos metálicos, como Fe^{III}Zn^{II}LP1 e Fe^{III}Zn^{II}LP2 e um cobre dinuclear (II) com triazinas derivadas (CAMARGO et al., 2018; SILVA et al., 2020), onde houve efeito positivo pela intercalação de DNA desses ligantes aromáticos. No entanto, os intercaladores nem sempre melhoram a atividade da nuclease dos complexos metálicos. (TSENG; BURSTYN, 2008) inseriram um brometo de acrídio de macrociclo ligado a intercaladores 3,6-bis(dimetilamino)-10-(6-[1,4,7-triazaciclono-nano] hexilo) em um complexo de cobre(II) e o compararam com o complexo livre de intercaladores (Cu[9]aneN₃)²⁺. Curiosamente, o complexo modificado não foi mais eficaz do que os complexos livres de intercaladores. Os autores sugeriram que dímeros inativos foram formados no meio da reação, inibindo a ancoragem ao DNA e, conseqüentemente, a hidrólise da ligação fosfodiéster (TSENG; BURSTYN, 2008).

Vide abaixo a estrutura de todos os complexos citados anteriormente (figura 22).

Figura 22 – Estruturas dos complexos da literatura

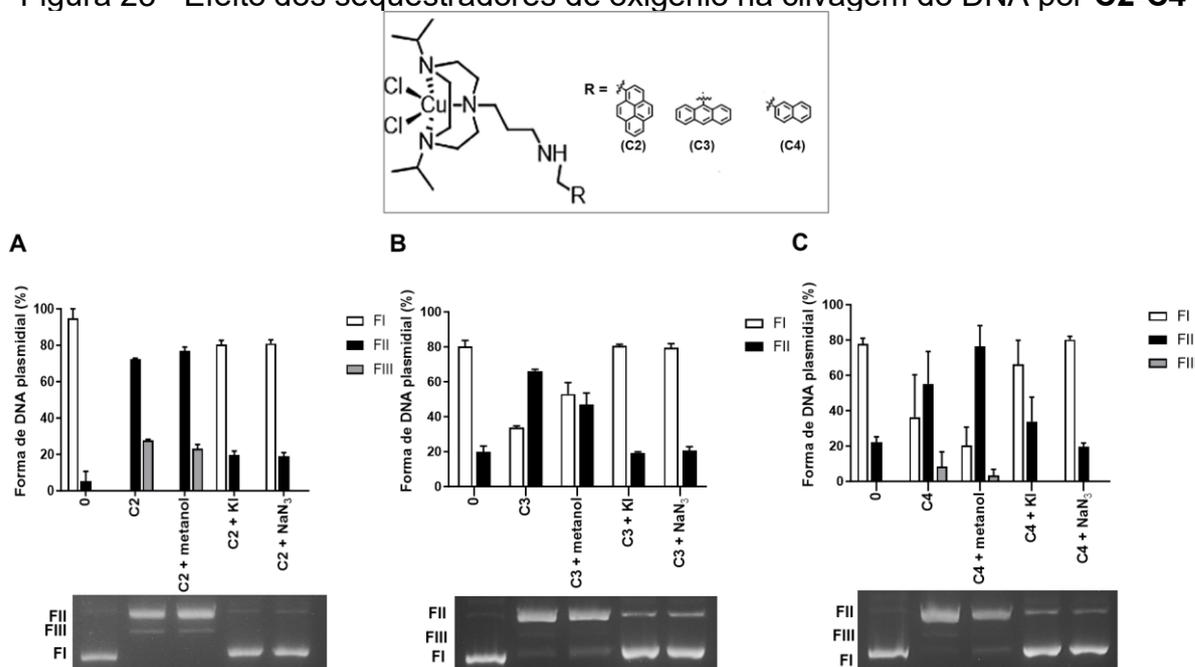


Fonte: nas figuras e no texto, agrupadas pela autora.

(GUCKIAN et al., 1996) analisaram os efeitos do empilhamento (π *stacking*) aromático no contexto do DNA, substituindo a base terminal natural por moléculas apolares como benzeno, naftaleno, fenantreno e pireno. Em unidades substituídas por pireno, observou-se um importante aumento na temperatura de fusão dos oligonucleotídeos, sugerindo um enorme impacto do grupo pireno na interação entre fitas dessas bases de DNA modificadas. No entanto, o fenantreno teve o mesmo efeito que o naftaleno, indicando que o terceiro anel não é afetado por bases adjacentes, mas atua através de efeitos solvofóbicos (GUCKIAN et al., 1996). Um efeito semelhante é observado em nossos complexos modificados e o mesmo raciocínio poderia ser sugerido para explicar por que o complexo **C3** (antraceno), que tem três anéis, se comporta de forma semelhante ao **C4** (naftaleno).

Um aspecto vantajoso a ser considerado ao descrever a ação de complexos metálicos sobre o DNA é o potencial de promover clivagem oxidativa na presença de oxigênio dissolvido em solução. O KI e o NaN_3 inibem a atividade de **C2**, **C3** e **C4** (figura 23), sugerindo que peróxido de hidrogênio e oxigênio singlete estão envolvidos no ataque ao ácido nucleico.

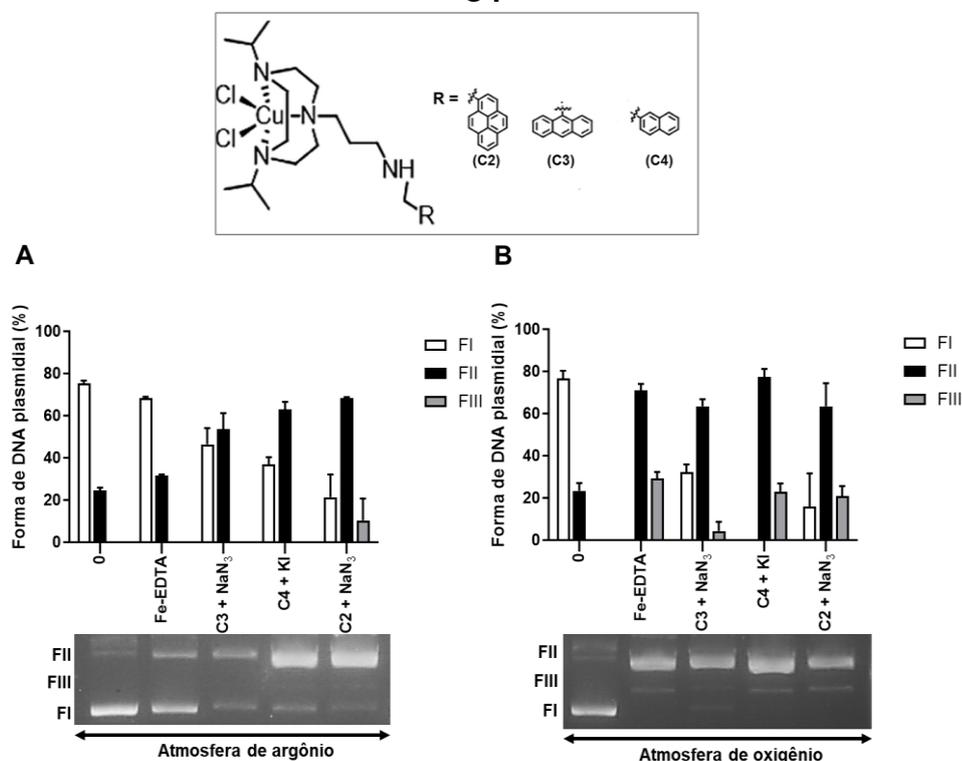
Figura 23 - Efeito dos sequestradores de oxigênio na clivagem do DNA por **C2-C4**



Efeito dos sequestradores de EROs (metanol, KI e NaN_3) na clivagem de DNA superenovelado por **C2** (a), **C3** (b) e **C4** (c). O número zero corresponde ao controle negativo composto por 1:1 acetoneitrila/ água ultrapura livre de nuclease sem complexo metálico e sem sequestradores de EROs. Condições de reação: [**C2**] = 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [**C3**] = 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [**C4**] = 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [metanol] = 2,5 mmol L^{-1} , [KI] = 0,5 mmol L^{-1} , [NaN_3] = 0,5 mM , [DNA] = 330 ng (25 $\mu\text{mol L}^{-1}$), [Tampão] = HEPES (10 mmol L^{-1} , pH 8,0), T = 45°C, t = 4h. Dados representativos de três testes diferentes expressos como média \pm DP.

Conforme relatado no (HEGG; BURSTYN, 1996a), metanol não afetou a taxa de clivagem, indicando que os radicais hidroxila podem ser gerados *em situ* e que não há radicais livres disponíveis para a inibição do metanol. Inicialmente, esses resultados parecem indicar um mecanismo oxidativo para todos os três complexos, embora no ensaio de atmosfera de argônio (figura 24) os complexos tenham promovido a clivagem do DNA razoavelmente bem, indicando vias dependentes de O_2 e independentes de O_2 . Portanto, **C2**, **C3** e **C4** podem atuar por mecanismo oxidativo e hidrolítico.

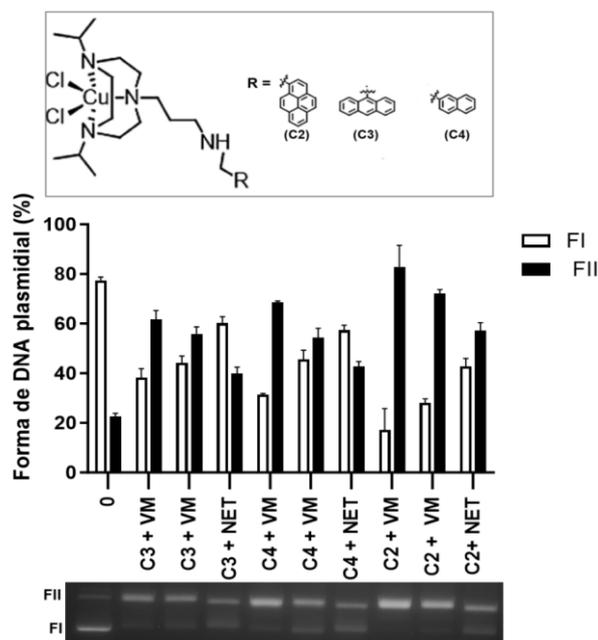
Figura 24 - Efeito da ausência e presença de oxigênio na clivagem de DNA por **C2**-**C4**



Clivagem de DNA superenovelado por **C2**, **C3** e **C4** em condições aeróbias (atmosfera de oxigênio) (a) e anaeróbias (atmosfera de argônio) (b). Condições de reação: $[C2] = 25 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[C3] = 100 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[C4] = 100 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[DNA] = 330 \text{ ng } (25 \mu\text{mol L}^{-1})$, $[\text{Tampão}] = \text{HEPES } (10 \text{ mmol L}^{-1}, \text{pH } 8,0)$, $T = 45^\circ\text{C}$, $t = 4\text{h}$. O número zero corresponde ao controle negativo composto por 1:1 acetonitrila/ água ultrapura livre de nuclease sem complexo metálico. Fe-EDTA ($1 \text{ mmol L}^{-1} / 2 \text{ mmol L}^{-1}$). Dados representativos de três testes diferentes expressos como média \pm DP. Fonte: autora

Todos os três complexos estudados interagem tanto por sulco menor quanto sulco maior, embora **C2** mostrou preferência pelo sulco menor do DNA (figura 25).

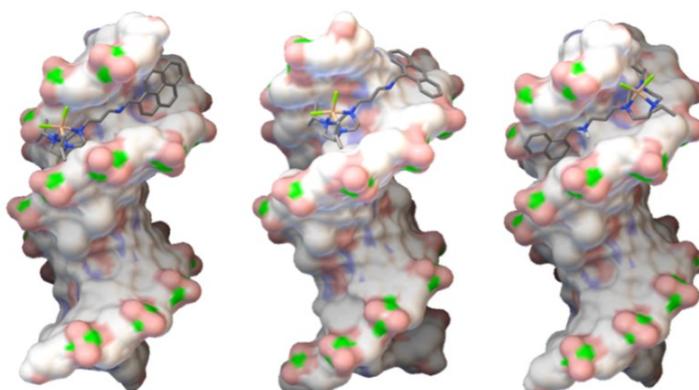
Figura 25 - Avaliação da interação de **C2-C3** pelo sulco menor e/ou maior utilizando inibidores netropsina e verde de metila



Efeito dos ligantes de sulcos de DNA netropsina (NET) e verde de metila (VM) na clivagem de DNA superenovelado por **C2**, **C3** e **C4**. Condições de reação: [NET] = 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [MG] = 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ [**C2**] = 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [**C3**] = 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [**C4**] = 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [DNA] = 330 ng (25 $\mu\text{mol L}^{-1}$), [Tampão] = HEPES (10 mmol L⁻¹, pH 8,0), T = 45 °C, t = 4h. A concentração zero corresponde ao controle negativo composto por 1:1 acetonitrila/ água ultrapura livre de nuclease 1:1, sem complexo metálico e sem inibidores de sulco.

Análises *in silico* (figura 26) realizadas pelo professor Dr. Fernando Xavier da UDESC (Joinville) (dados não publicados), empregando o DNA dodecâmero d(GCGCAATTGCGC)₂ (PDB ID: 1BNA), confirmaram o experimento acima. Foi possível verificar que **C1-C4** se ancora melhor no sulco menor do DNA, principalmente através de interações hidrofóbicas (van der Waals).

Figura 26 - Análises *in silico* de **C2-C4**

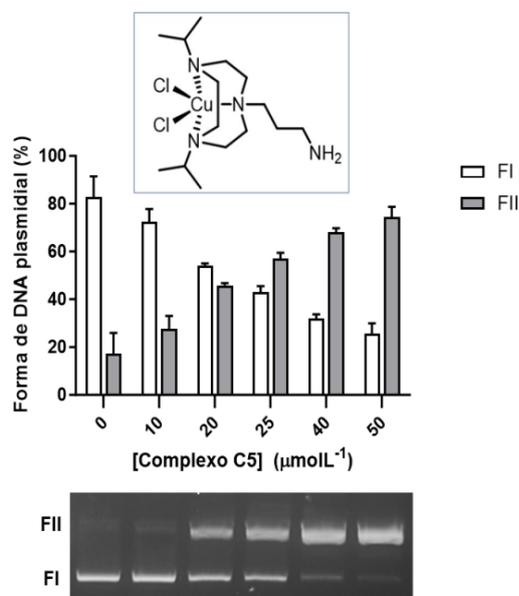


C2 (esquerda), **C3** (meio) e **C4** (direita) com DNA d(GCGCAATTGCGC)₂ dodecâmero (PDB ID: 1BNA). As superfícies do DNA denotam polaridade calculada dos elementos (vermelho, oxigênio; azul, nitrogênio; verde, fósforo; e cinza, carbono/hidrogênio). Fonte: Dr. Fernando Xavier (UDESC).

5.2 COMPLEXO C5

O complexo **C5**, que contém uma propilamina como pendente, se mostrou muito ativo como nuclease nos testes envolvendo DNA plasmidial (figura 27). Para a obtenção de aproximadamente 50% de DNA circular clivado foi necessário 20-25 μmolL^{-1} de **C5**. Comparativamente aos complexos **C2-C4**, este valor é bastante semelhante com **C4** (figura 20). Entretanto, a necessidade de uma temperatura reacional 1,2x menor, de 37°C invés de 45°C, torna **C5** muito ativo.

Figura 27 - Clivagem do DNA por **C5**



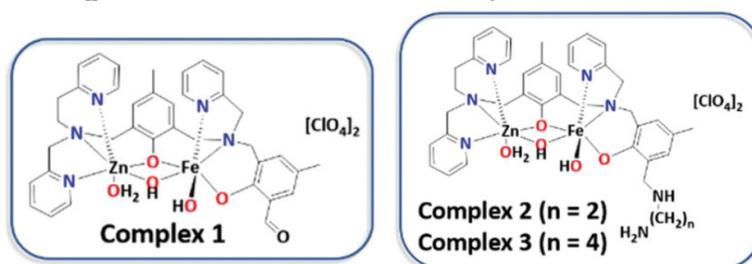
Clivagem do DNA plasmidial superenovelado pelo complexo **C5**. Condições de reação: [**C5**] = 0–50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, [DNA] = 330 ng (25 $\mu\text{mol L}^{-1}$), [Tampão] = HEPES (10 mmol L^{-1} , pH 8,0), T= 37 °C, t= 4h. A concentração zero corresponde ao controle negativo composto por 1:1 diluente de água ultrapura livre de acetonitrila/nuclease sem complexo metálico. Dados representativos de três testes, expressos em média \pm DP. Fonte: autora.

Hegg e Burstyn (1996) (HEGG; BURSTYN, 1996) verificaram que 1000 μmolL^{-1} de (Cu[9]aneN₃)Cl₂ clivava 50% do DNA superenovelado em pH 7,8 (40 mmol L^{-1} tampão HEPES) em 12h, à 50 °C. **C5** clivou o DNA (HEPES 10 mmol L^{-1} ; pH 8,0; T= 37 °C; t= 4 h), em uma concentração, tempo e temperatura respectivamente de: 45x, 3x e 1,35x menores. Deste modo, pode-se afirmar que **C5** é aproximadamente 182 vezes mais ativo que o complexo original (Cu[9]aneN₃)Cl₂ (HEGG; BURSTYN, 1996).

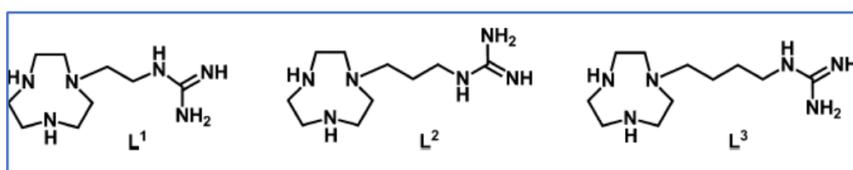
dois pendentos de propilguanidina para apenas um aumentou a atividade catalítica em 7x, o k_{obs} passou de $2,6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ para $18,7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, devido a uma redução do impedimento estérico (TIJOE et al., 2011, 2012).

Estudos envolvendo complexos heterobinuclear de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Zn}^{\text{II}}$ que mimetizam o sítio ativo da fosfatase ácida púrpura (PAP), realizados por Silva e colaboradores (2017) (figura 29), mostraram que a substituição do grupo aldeído por cadeias laterais de 1,2-etanodiamina (complexo 2) e 1,4-butanodiamina (complexo 3) trouxe efeitos positivos na segunda esfera de coordenação, dobrando a atividade nucleásica no DNA em relação ao complexo 1, que não possuía essa cadeia lateral. A protonação do grupo amino terminal tornou o complexo mais catiônico, permitindo uma melhor atração eletrostática entre o complexo e o DNA que é negativo, algo que foi confirmado nos testes de força iônica (SILVA et al., 2017).

Figura 29 – Estrutura dos complexos da literatura



SILVA et al., 2017



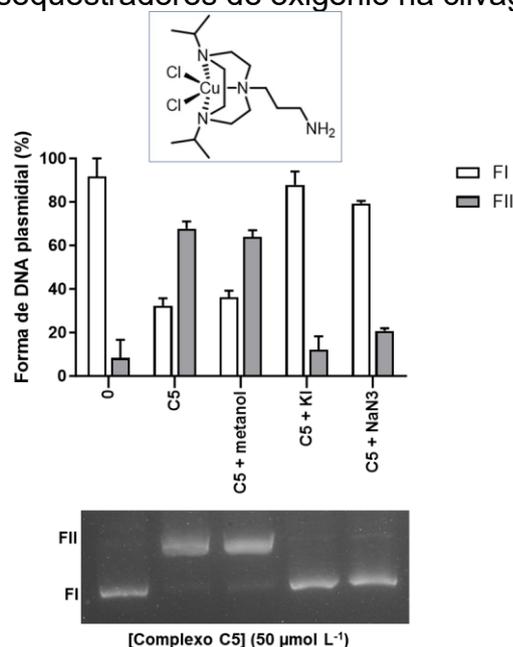
Ligantes (TIJOE et al., 2012)

Fonte: nas figuras, estruturas agrupadas pela autora.

Apesar de não ter sido realizados testes de força iônica, estes exemplos acima sugerem um efeito similar da propilamina no complexo **C5**. Em relação ao mecanismo ser hidrolítico ou oxidativo, nos ensaios com sequestradores de oxigênio KI e o NaN_3 inibiram o complexo **C5** (figura 30) de forma semelhante ao **C2-C4** (capítulo 1) sugerindo que peróxido de hidrogênio e oxigênio singlete estão envolvidos no ataque ao ácido nucleico. Isto inicialmente sugeria um possível mecanismo oxidativo, no entanto, vários exemplos de complexos de Cu(II) -tacn

incluindo **C2-C4** mostram um mecanismo misto (hidrolítico e oxidativo) nos ensaios de clivagem de DNA na presença/ausência de oxigênio. Apesar de não ter sido realizado este teste para **C5**, esta seria também uma sugestão, uma vez que esses complexos já são conhecidos na literatura por atacar o DNA hidroliticamente através da formação de uma ponte hidroxio, a partir de espécies monoméricas (DEAL; BURSTYN, 1993; HEGG; BURSTYN, 1996; HEGG; BURSTYN, 1998; JOSHI; GRAHAM; SPICCIA, 2015).

Figura 30 - Efeito dos sequestradores de oxigênio na clivagem do DNA por **C2-C4**



Efeito dos sequestradores de EROs (metanol, KI e NaN_3) na clivagem de DNA superenovelado por **C5**. O número zero corresponde ao controle negativo composto por 1:1 acetonitrila/ água ultrapura livre de nuclease sem complexo metálico e sem sequestradores de EROs. Condições de reação: $[\text{C5}] = 50 \mu\text{mol L}^{-1}$, $[\text{metanol}] = 2,5 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{KI}] = 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{NaN}_3] = 0,5 \text{ mM}$, $[\text{DNA}] = 330 \text{ ng}$ ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$), $[\text{Tampão}] = \text{HEPES}$ (10 mmol L^{-1} , pH 8,0), $T = 37^\circ\text{C}$, $t = 4 \text{ h}$. Dados representativos de três testes diferentes expressos como média \pm DP. Fonte: autora.

Deste modo, a cauda de propilamina e a temperatura de 37°C favorecem muito na escolha de **C5** como molécula alvo para receber uma proteína modificada quimicamente, como a do repressor *cl* do 434. É importante ressaltar que as proteínas no geral não suportam temperaturas muito elevadas e necessitam de um meio reacional semelhante com a encontrada nas células (ALBERTS et al., 2017; NELSON; COX, 2014).

Os testes em DNA envolvendo inibidores de sulco e atmosfera de argônio não foram executados para **C5**, pois inicialmente o objetivo principal era servi-lo apenas de arcabouço para conjugar com uma biomolécula (capítulo 2), mas não

desvendar todo seu mecanismo de ação. Mas para surpresa, este complexo foi muito mais ativo do que o esperado. Portanto, avaliar com mais detalhes as vias de interação de **C5** seria uma proposta interessante.

6 CONCLUSÃO

A presença de pendentos aromáticos (**C2-C4**) nos ligantes do (1,4,7-triazaciclononano), especialmente o pireno (**C2**), e o pendente propilamino (**C5**) foi significativa no aumento da capacidade de clivar DNA plasmidial através das vias oxidativa e hidrolítica. Infelizmente, o mesmo efeito não foi observado para **C1** (isopropila).

Em 45°C, **C2** apresentou o maior valor de k_{obs} de 0,25 h⁻¹ com apenas 10 μmolL⁻¹, cerca de 1000 vezes mais ativo do que o complexo clássico (Cu[9]aneN₃)Cl₂ para a reação de clivagem do DNA (DEAL; BURSTYN, 1996). **C5** se mostrou muito mais ativo do que o esperado, pois foi capaz de clivar o DNA plasmidial em temperatura fisiológica (50 μmolL⁻¹; tampão HEPES 10 mmolL⁻¹ pH 8,0; T= 37°C), obtendo um k_{obs} 0,22 ± 0,015 h⁻¹.

Portanto, a inserção de grupos químicos simples (aromáticos e amino) em nucleases artificiais conhecidas, podem ser uma excelente forma de melhorar a clivagem do DNA e incrementar a segunda a esfera de coordenação.

CAPÍTULO 2

7 INTRODUÇÃO

7.1 METALONUCLEASES ARTIFICIAIS SÍTIO-ESPECÍFICAS

Os progressos no conhecimento de como os fármacos atuam no organismo (mecanismos de ação, interações droga-alvo), levou a uma preocupação em se reduzir as doses e buscar novas substâncias que atuem em alvos específicos e possuam mecanismo de ação conhecido, melhorando assim a resposta do paciente ao tratamento e diminuindo os efeitos adversos. Portanto, a impressionante evolução da compreensão das vias bioquímicas e da sua interação com substâncias químicas tem causado avanços significativos na área da medicina. Novos fármacos que atuam em receptores específicos da célula ou em sequências específicas de DNA estão sendo desenvolvidos e testados para tratar diversas doenças, inclusive, o câncer (IMMING, SINNING, MEYER, 2006).

No entanto, nem todas as metalonucleases são específicas. Em alguns casos, existe uma promiscuidade do cofator em relação ao substrato. Isto acontece, por exemplo, com a colicina, uma proteína com atividade nucleásica e antibacteriana utilizada pela bactéria *Escherichia coli* para matar bactérias vizinhas durante o período de estresse e competição devido escassez de recursos e fontes de alimento (DUPUREUR, 2008; PAPADAKOS; WOJDYLA; KLEANTHOUS, 2012). Da mesma forma que as metalonucleases naturais, os complexos metálicos também podem ser promíscuos, como é o exemplo de um complexo de cobre (II) não simétrico, que atuou como hidrolase e catecol oxidase (OSÓRIO et al., 2012).

É importante ressaltar que as características ideais para uma nuclease artificial ser promissora são: alta eficácia de clivagem, alta afinidade e uma grande seletividade a uma sequência específica de DNA (MANCIN et al., 2005).

7.2 PEPTÍDEOS, MINIPROTEÍNAS E FATORES DE TRANSCRIÇÃO

Os peptídeos têm sido utilizados como agente terapêutico desde a descoberta do peptídeo da insulina, há um século. As grandes vantagens dos peptídeos estão relacionadas com a boa especificidade, segurança, eficácia, além

de baixo custo e baixa imunogenicidade, se comparado com moléculas biológicas, que são maiores (proteínas e anticorpos). Na terapêutica, estas moléculas de baixo peso molecular (500-5000 Da) representam uma porção bilionária do mercado farmacêutico, onde mais de 80 peptídeos são aprovados para uso clínico, sendo os principais: peptídeos para tratamento do diabetes tipo 2, vasopressina, oxitocina, hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), além da insulina (ADAMS et al., 1969; WANG et al., 2022).

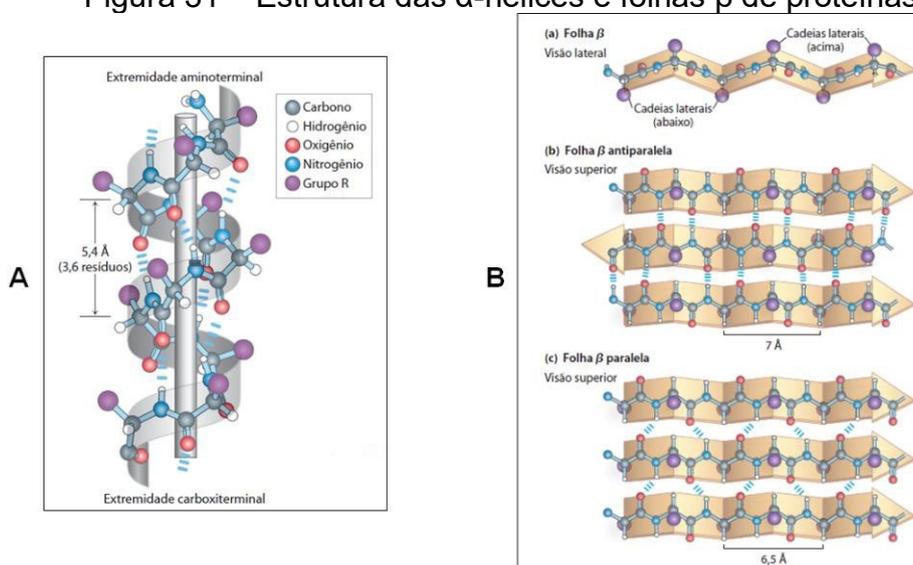
Uma das soluções para melhorar a especificidade dos complexos metálicos é acoplar moléculas que atuem em sítios específicos, trazendo especificidade na localização e internalização das nucleases artificiais dentro da célula. Nesse caso, é comum o uso de peptídeos derivados de fatores de transcrição como arcabouço para interagir com sequências específicas de DNA. Entretanto, a síntese de metalopeptídeos é um desafio, devido à complexidade para manter a estabilidade, a funcionalidade peptídica e a labilidade dos complexos metálicos (BENFIELD et al., 2008; SOLER et al., 2016).

A síntese peptídica envolve principalmente uma fase sólida de resina (SPPS) (MERRIFIELD, 1963), nos quais as cadeias laterais dos aminoácidos são protegidas por moléculas químicas. Infelizmente, em alguns casos difíceis pode ocorrer muita agregação, principalmente em cadeias β devido à insolubilidade em meios aquosos. Em relação à expressão de peptídeos recombinantes em *Escherichia coli*, é necessária a fusão com carreadores e peptídeos sinais para que ocorra solubilização no citoplasma, a proteção contra proteases e facilidade na purificação. Além disso, é necessária após a purificação a remoção da cauda através de proteases sítio-específicas, para obter peptídeos puros. No entanto, todas estas estratégias nem sempre são garantidas, principalmente quando o peptídeo é antimicrobiano. Nos ensaios clínicos, é comum que estas moléculas pequenas apresentem baixa permeabilidade à membrana celular e baixa estabilidade (*in vivo*), tornando-se um desafio. Deste modo, é comum que haja algumas etapas de modificações na estrutura natural dos peptídeos, com o objetivo de impedir o ataque proteolítico celular, melhorar a permeabilidade e facilitar tanto a síntese química quanto biológica deles. (BENFIELD et al., 2008; LI, 2011; SOLER et al., 2016; WANG et al., 2022).

Neste contexto, as miniproteínas ou proteínas em miniatura com um baixo peso molecular (1-10 kDa) são uma vantagem. Além da alta especificidade, conferem

rigidez, estabilidade, maior resistência à proteólise e à desnaturação, ou seja, uma grande vantagem destas moléculas perante os peptídeos. Apesar de pequenas, as miniproteínas se comportam como proteínas maiores, com estruturas tridimensionais bem dobradas (e.g α -hélices e folhas β) (figura 31), apresentando forças intramoleculares, como as hidrofóbicas, além de ter capacidade de interagir com metais e realizar ligações covalentes. Além disso, podem ser sintetizadas tanto quimicamente quanto biologicamente (BAKER et al., 2017; CROOK; NAIRN; OLSON, 2020; HOLUB, 2017).

Figura 31 – Estrutura das α -hélices e folhas β de proteínas



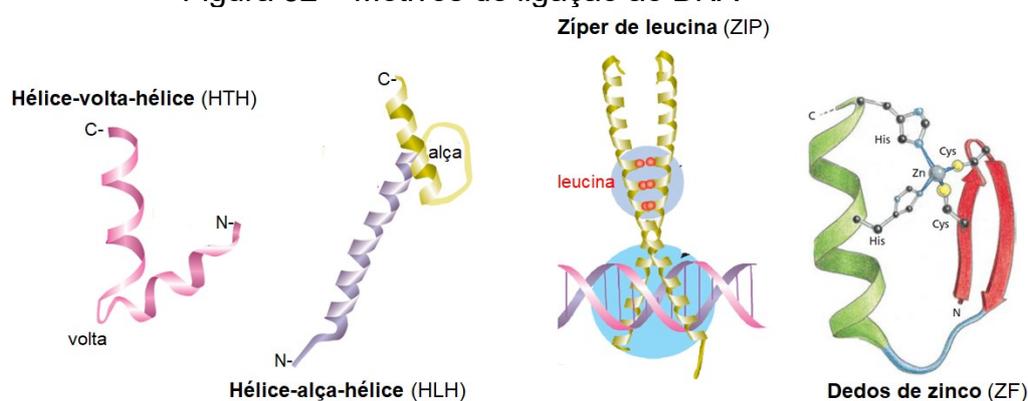
Estrutura α -hélices (A) e folhas β de proteínas (B). Fonte: (NELSON; COX, 2014) modificado pela autora.

Os fatores ou reguladores da transcrição são proteínas que controlam a expressão gênica em procariotos e eucariotos, seja ativando (ativadores), reprimindo (repressores) ou modulando genes. De forma ampla, podem atuar se ligando às proteínas (exemplo: eucariotos), às sequências específicas de DNA e/ou à RNA-polimerase. Neste contexto, o destaque principal são os reguladores que se ligam ao DNA, reconhecendo sítios específicos próximos de promotores, que marcam o início da transcrição pela RNA polimerase (ALBERTS et al., 2017; CLARK; PAZDERNIK; MCGEHEE, 2018; NELSON; COX, 2014; ZAHA; BUNSELMEYER; PASSAGLIA, 2014).

Estas proteínas regulatórias possuem uma alta afinidade por sequências específicas de DNA, cerca de 10^4 - 10^6 vezes mais que outras sequências quaisquer. Ademais, apresentam pequenos domínios de ligação (60 a 90 resíduos de

aminoácidos) que se ligam em sítios de DNA, geralmente com sequência palindrômica específica. A atuação destes reguladores é cooperativa, geralmente são necessários mais de um monômero que se ligam à 6 ou 8 pares de nucleotídeos, aumentando a superfície de contato e a afinidade com o DNA. Os principais motivos de ligação ao DNA são: a hélice-volta-hélice (HTH), hélice-volta-hélice (HLH), os dedos de zinco (ZF) e os zíperes de leucina (ZIP) (figura 32) (ALBERTS et al., 2017; CLARK; PAZDERNIK; MCGEHEE, 2018).

Figura 32 – Motivos de ligação ao DNA



Fonte: (ALBERTS et al., 2017; CLARK; PAZDERNIK; MCGEHEE, 2018). Modificado pela autora.

Motivos HTH possuem duas alfa-hélices com aproximadamente 20 aminoácidos que são unidas por uma volta de folha β , sendo uma delas de reconhecimento ao DNA. O nome volta se refere justamente por interagir com uma volta de DNA, sendo assim mais curta que uma alça de uma hélice-alça-hélice. A alça longa do HLH permite que duas α -hélices de tamanhos diferentes se sobrepõem primeiro, dimerizando-se antes de se ligar ao DNA. Na hélice-volta-hélice não há sobreposição das hélices e por isso são necessários dois monômeros, que atuam cooperativamente, se ligando à sequência específica do DNA. HTH ocorrem em procaríotos e eucariotos, enquanto HLH é mais presente em eucariotos (ALBERTS et al., 2017; CLARK; PAZDERNIK; MCGEHEE, 2018; NELSON; COX, 2014).

Os dedos de zinco possuem cerca de 30 resíduos de aminoácidos com ou mais átomos de Zn^{2+} coordenados no centro com quatro resíduos de aminoácidos, geralmente cisteínas e histidinas que ligam cadeias, geralmente uma α -hélice à uma folha β . O zinco neste caso não liga o DNA diretamente, mas estabiliza a estrutura terciária da proteína. O zíper de leucina consiste em duas α -hélices que se

sobrepõem, mas diferentemente do HLH, isto não se deve à uma alça, mas às leucinas que se repetem a cada sete aminoácidos formando uma região hidrofóbica central. Tanto dedos de zinco quanto zíper de leucina são encontrados em eucariotos (ALBERTS et al., 2017; CLARK; PAZDERNIK; MCGEHEE, 2018; NELSON; COX, 2014). Todos esses motivos podem ser empregados em nucleases artificiais sítio-específicos e muitos exemplos já existem na literatura (BOGA et al., 2018; FRANKLIN; WELCH; 2005; NEGI et al., 2023).

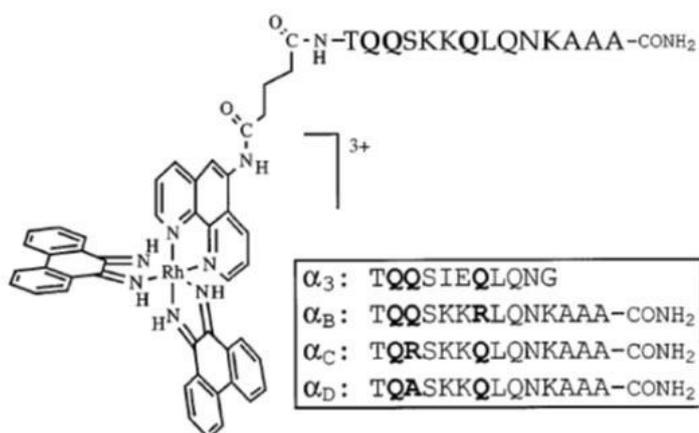
Portanto, já se sabe que muitas proteínas que se ligam ao DNA possuem uma pequena α -hélice como elemento primário de reconhecimento ao ácido nucleico. Com base nesta informação, Zondlo & Schepartz (1999) foram um dos primeiros a conseguir desenvolver miniaturas de proteínas que pudessem expor ao solvente as estruturas α -hélice com elevada afinidade e especificidade ao DNA. A estratégia foi buscar resíduos α -helicoidais a partir de uma proteína nativa e enxertá-los em um núcleo de proteína estável, em miniatura. Para isto, foram utilizadas diversas combinações de treze resíduos do fator de transcrição GCN4, uma proteína bZIP (*basic leucine zipper*) de grande especificidade ao DNA, inseridos em um esqueleto formado pelo polipeptídeo pancreático aviário (aPP), uma proteína bem dobrada de estrutura conhecida que consiste em uma única α -hélice estabilizada por interações hidrofóbicas com uma hélice de poliprolina tipo II (PPII). O objetivo era que esta nova proteína pudesse reconhecer com alta afinidade a sequência 5'-ATGAC-3' (CRE *half site*, hsCRE). O resultado foi a obtenção de diversas proteínas denominadas PPBR (*polyproline helix-basic region*), incluindo a PPBR4. No entanto, PPBR4 exibiu helicidade a temperatura de 4°C e nenhuma evidência de ligação ao DNA em temperatura ambiente (ZONDLO; SCHEPARTZ, 1999).

Em outro estudo complementar desenvolvido pelo mesmo grupo de pesquisa, Chin & Schepartz (2001) utilizaram duas bibliotecas (A e B) de fagos contendo sequências de PPBR4, no entanto, com modificações em alguns resíduos de aminoácidos em posições específicas. Os fagos foram classificados de acordo com a sua capacidade em se ligar a uma cadeia dupla de oligonucleotídeos contendo a mesma sequência ATGAC (hsCRE). A partir da biblioteca B, a qual alcançou melhores resultados, foram obtidos 12 clones. Estes clones foram sequenciados e seis peptídeos foram sintetizados (p007, p009, p011, p012, p013, p016) e analisados. O peptídeo p007 obteve resultados muito satisfatórios, pois foi capaz de se ligar 100 vezes melhor do que PPBR4 (CHIN; SCHEPARTZ, 2001).

7.3 EXEMPLOS DE NUCLEASES ARTIFICIAIS SÍTIO-ESPECÍFICAS E PROPOSTA INICIAL DA TESE

Em um dos exemplos de nuclease artificial sítio-específico foi empregado o peptídeo 434R- α A, derivado da hélice de reconhecimento de DNA do repressor do bacteriófago 434, constituído de um domínio hélice-volta-hélice com afinidade pela sequência 5'-ACAA-3'. Sardesai & Barton (1997) testaram este e alguns variantes deste oligopeptídeo pequeno e ancoraram a um complexo de rutênio [Rh(phi)₂(phenb)]₃c, conforme figura 33. Através de ensaios de *footprinting* eles mostraram que os mesmos se ligaram preferencialmente em sítios 5'-ACAA-3', a concentrações de 50 nM, protegendo de 7-10pb de DNA ao redor do sítio específico. Estudos de clivagem em oligonucleotídeos sintéticos também foram realizados, mostrando uma preferência na clivagem de forma semelhante a proteína nativa (434R ou repressor cl do bacteriófago 434) (SARDESAI et al., 1997).

Figura 33 – Complexo de rutênio [Rh(phi)₂(phenb)]₃c contendo peptídeos derivados do repressor *cl* do fago 434

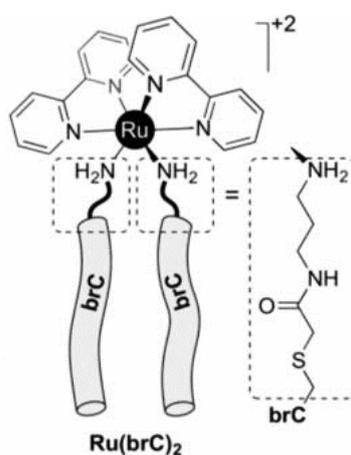


O peptídeo 434R- α A é o que se encontra ligado ao complexo de rutênio. Fonte: (SARDESAI et al., 1997).

Outro exemplo de trabalho envolvendo peptídeos e complexos metálicos, foi desenvolvido por Mosquera e colaboradores (2014). Os elementos-chaves por trás deste projeto foram: obter um estado dimérico para uma ligação eficiente dos peptídeos bZIP (derivados de GCN4) ao DNA, unido aos complexos de bipyridil Ru (II) que pudessem atuar tanto como dímeros, quanto como unidades foto-cliváveis.

Desta forma, a ligação dos peptídeos bZIP ao DNA poderia ser desativada na presença de luz visível e portanto a clivagem do material genético seria interrompida (figura 34). Um dos dímeros foto lábeis formados, denominado Ru(brC)₂ que contém o nucleófilo Cys (cisteína) da região C- terminal da região básica de GCN4 (brC), demonstrou nos ensaios de EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) uma alta seletividade ao DNA na ausência de luz visível e uma perda na ligação do DNA na sua presença (MOSQUERA et al., 2014).

Figura 34 - Estrutura química do complexo Ru(brC)₂.



Fonte: (MOSQUERA et al., 2014).

Inicialmente, a ideia desta tese era trabalhar com o peptídeo p007 e 434R-αA modificados e conjugá-los em um complexo metálico, de forma semelhante ao (MOSQUERA et al., 2014), formando uma quimera. No entanto, houve muita dificuldade técnica em se trabalhar com peptídeos, devido à baixa ou inexistente expressão recombinante em procaríoto, síntese química (terceirizada) ser onerosa, resultando em pouca quantidade de peptídeo e em baixa concentração. Além disso, houve a necessidade de trabalhar com um espectrômetro de massas específico para massas pequenas como o MALDI-TOF. Nesta técnica de espectrometria de massas, a amostra é misturada com uma matriz, fixada em uma fase sólida (placa metálica), seguida por ionização (laser) via dessorção e análise pelo tempo de voo (TOF) que os íons percorrem no tubo detector. Diferentemente do ESI-MS, não ocorre decomposição das espécies do analito, sendo de grande vantagem para identificação de peptídeos e sais (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009).

Infelizmente, no caso dos peptídeos empregados (p007 e 434R- α A), a modificação química trazia mudança de coloração na mistura matriz-peptídeo (de branco para amarelo) e, conseqüentemente baixa resolução dos espectros de MALDI-TOF. Ademais, no caso do p007, após a expressão e purificação do peptídeo recombinante, a protease (PreScission protease - Cytiva) clivou não apenas a cauda (GST), mas também uma parte importante da estrutura desta molécula. Outra questão foi a posterior interrupção do funcionamento do MALDI-TOF, devido queima do *laser*. Ao trabalhar com 434R- α A, verificou também que era difícil reproduzir fielmente os dados de ligação do DNA, devido condições laboratoriais diferentes e que a inserção de um resíduo de cisteína em uma molécula pequena, tinha diminuído a ligação ao DNA. Estes dados parciais poderiam ser tópico de uma ou duas seções extras, no entanto não constam nesta tese.

Deste modo, percebeu-se que o ideal seria trabalhar com uma proteína pequena ou seja uma miniproteína, invés de peptídeo. Ao verificar a sequência de aminoácidos no banco de dados foi notado que a proteína original que deu origem ao 434R- α A, a proteína repressora *cI* do bacteriófago 434 não continha nenhum resíduo de cisteína (BATEMAN et al., 2023; KUZIEL; TUCKER, 1987). Ou seja, a substituição estratégica de um resíduo de aminoácido por cisteína seria uma vantagem para a modificação química desta miniproteína. Assim seria possível ligar covalentemente o complexo metálico à ao *cI* mutante, produzindo uma quimera de nuclease artificial sítio-específica. Nas seções a seguir encontram-se informações necessárias baseadas na literatura para compreender este parágrafo.

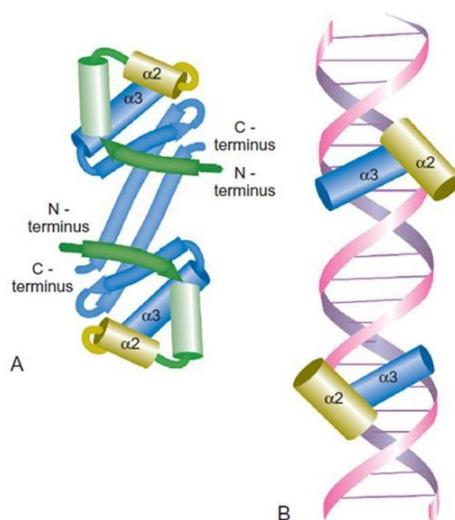
7.4 REPRESSOR *CI* DO BACTERIÓFAGO 434

O repressor *cI* do bacteriófago 434 possui ao todo 209 resíduos de aminoácidos e se liga como dímero ao DNA. O domínio N-terminal deste repressor se liga à 14 pb de DNA, com uma sequência específica conservada: 5`-ACAA-`3. De acordo com a classificação SCOP2, este domínio pertence à família das proteínas regulatórias xenobióticas XRE, superfamília HTH *cro/cI*. Ao todo são 95 resíduos de aminoácidos do domínio N-terminal (1-95; Uniprot P16117), sendo que 69 resíduos (2-70; 434_{R69}), foram caracterizados por cristalografia de raio X (PDB: 1R69), juntamente com o DNA (PDB: 1PER; 1RPE; 2OR1), além de estudos de RMN. Em relação à estrutura tridimensional, o domínio N-terminal de *cI* de 434 é formada por 5

hélices curtas interligadas por voltas compactas, com interior hidrofóbico, sendo que duas delas (segunda e terceira) possuem domínios HTH responsáveis por se ligar ao DNA (AGGARWAL et al., 1988; ANDERSON; PTASHNE; HARRISON, 1984; BATEMAN et al., 2023; IWAI; WIDER; WÜTHRICH, 2004; MONDRAGÓN et al., 1989; NERI; BILLETER; WÜTHRICH, 1992; PERVUSHIN et al., 1996; RODGERS; HARRISON, 1993; SHIMON; HARRISON, 1993).

Os últimos 115 resíduos de aminoácidos desta proteína compreendem o *linker* e o domínio C-terminal composto por folhas β . O *linker* é uma região flexível que conecta com o domínio C-terminal, peptidase_S24_S25, pertencente à superfamília de peptidase sinal S24/S26/LexA, com similaridade estrutural com proteínas de respostas emergenciais do hospedeiro (SPARCLE ID: 10537110). Deste modo, esta porção carboxi-terminal é responsável pela regulação e oligomerização, orientando o domínio N-terminal a se ligar ao DNA (CARLSON; KOUDELKA, 1994; DONNER; PAA; KOUDELKA, 1998).

Figura 35 – HTH e ligação ao DNA



A. Estrutura de uma proteína HTH. **B.** Ligação ao DNA. Fonte:(ALBERTS et al., 2017; CLARK; PAZDERNIK; MCGEHEE, 2018). Modificado pela autora.

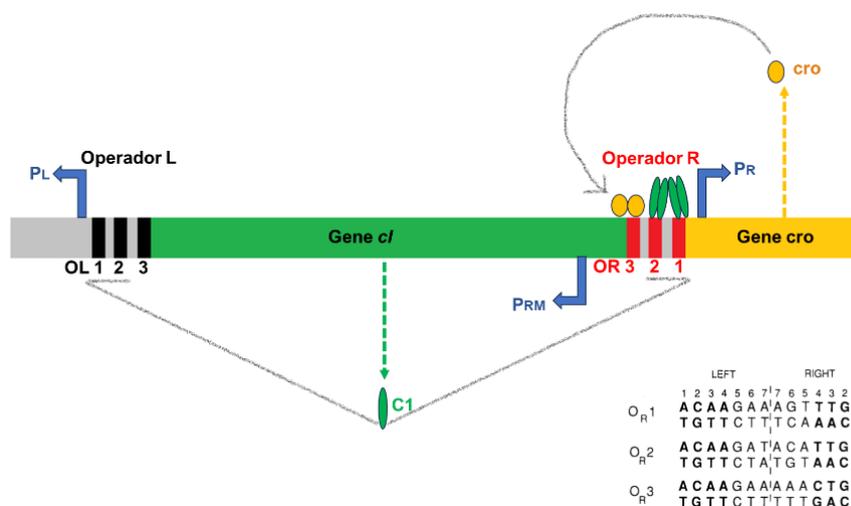
A primeira hélice (3-13) do repressor *cl* (PDB: 1R69, domínio N-terminal) é mais longa e se conecta com a segunda através de uma pequena volta. A segunda (18-25; QAELAQKV) interage com a estrutura do DNA em resíduos vizinhos, se conectando à uma volta sem forma, onde a presença da glicina 25 é bastante comum. Gly25 ajuda a orientar a terceira hélice (29-36; QQSIEQLE), que faz o contato com sítio específico no sulco maior do DNA. Entre a hélice 3 e 4 ocorre uma volta longa (37-39;

NGK). A hélice 4 (46-52) está associada com a dimerização e a 5ª (57-62) conecta-se com a primeira. Os últimos resíduos após o 63 não são considerados muito importantes para o contato direto dos aminoácidos com o DNA. Como na bactéria há remoção da primeira metionina (LIAO et al., 2004), alguns bancos de dados consideram glicina 25 (sem metionina), como o PDB ou 26 (com metionina), como é o caso do banco de dados UniProtKB (Swiss-Prot) (BATEMAN et al., 2023; IWAI; WIDER; WÜTHRICH, 2004; MONDRAGÓN et al., 1989; NERI; BILLETER; WÜTHRICH, 1992; PERVUSHIN et al., 1996; RODGERS; HARRISON, 1993; SHIMON; HARRISON, 1993).

A função de *cl* de 434 juntamente com a proteína *cro* é fazer o controle viral do ciclo lítico e lisogênico dentro da célula hospedeira bacteriana, de forma semelhante como ocorre com o vírus do fago lambda λ (HARRISON, 1992). Estas duas proteínas apresentam estruturas bastante semelhantes e atuam de forma competitiva se ligando a promotores, mediando a transcrição. No entanto, a interação destes dois reguladores varia de acordo com a afinidade ao DNA. Dois operadores estão envolvidos na ligação com *cl*, o da direita (OR) e da esquerda (OL), com três sítios cada, respectivamente OR₁-OR₃ e OL₁-OL₃. Todos estes sítios possuem extremidades simétricas 5'ACAA'3 conservadas (sequência consenso), com 6 pb centrais de sequência variável (sequência não consenso). O foco é OR que regula tanto *cl* quanto *cro*. (ANDERSON; PTASHNE; HARRISON, 1984; BUSHMAN, 1993; HALL; LEFEVRE; CORDES, 2005; MONDRAGÓN et al., 1989; RODGERS; HARRISON, 1993; SHIMON; HARRISON, 1993).

OR controla os promotores PR e PR_M que estão envolvidos com regulação da expressão do gene *cro*. Quando a proteína *cl* está presente, ela se liga como dímero de forma cooperativa em dois sítios OR₁ e OR₂. Esta ação bloqueia a RNA-polimerase de ligar em PR e deste modo, ocorre a repressão do gene *cro*. Assim, na ausência da proteína *cro* o ciclo lisogênico acontece. OR₁ e OR₂ são mais ricos em nucleotídeos AT, sendo a ligação de *cl* em OR₁ mais forte e OR₂ mais fraca (figura 36) (RODGERS; HARRISON, 1993; SHIMON; HARRISON, 1993; ZAHA; BUNSELMAYER; PASSAGLIA, 2014).

Figura 36 – Regulação gênica do ciclo lítico/ lisogênico do bacteriófago 434



Fonte: Desenhado pela autora, com base em (HALL; LEFEVRE; CORDES, 2005; RODGERS; HARRISON, 1993). Sítios OR1-OR3, meios sítios direita e esquerda.

Quando *cI* está em excesso, a sua própria expressão gênica é controlada, se ligando também ao OR₃ de afinidade intermediária, que é mais rico em nucleotídeos GC na extremidade direita do meio-sítio. Deste modo, a expressão do gene *cI* pode ser inibida em PR_M. Portanto, o gene *cro* é ativado. A proteína *cro* atuante bloqueia mais fortemente OR₃, ativando o ciclo lítico. Resumindo, quando o repressor *cI* atua, há o bloqueio da expressão gênica de *cro* e o ciclo lisogênico ocorre. Quando *cro* atua, há o bloqueio da expressão gênica de *cI* e o ciclo lítico acontece. O excesso de ambos promove sua autoregulação negativa. (figura 36) (RODGERS; HARRISON, 1993; SHIMON; HARRISON, 1993; ZAHA; BUNSELMAYER; PASSAGLIA, 2014).

O mecanismo de cooperação foi muito bem estudado no bacteriófago lambda, onde dois pares de dímeros do repressor atuam e desta forma dois tetrâmeros atuam (octâmero), conectando sítios operadores da direita (OR1 e OR2) e esquerda (OL1 e OL2). Esta cooperação forma curvaturas e torções no DNA. Deste modo, esta fina regulação é modulada por diversos genes, sítios e proteínas de acordo com as condições ambientais, permitindo que o fago 434, assim como sua família de vírus lambdoides consigam sobreviver em situações diversas (AGGARWAL et al., 1988; BELL et al., 2000; CIUBOTARU et al., 1999; KOUDELKA; DONNER; CIUBOTARU, 2000; MCCABE; PAWLOWSKI; KOUDELKA, 2005; OPPENHEIM et al., 2005; RODGERS; HARRISON, 1993).

Mecanismos de autoproteólise também são ativados e inibidos, respectivamente, por exemplo por proteínas RecA e LexA em situações de

respostas SOS (emergenciais) do hospedeiro, como por exemplo dano ao DNA. (MCCABE; PAWLOWSKI; KOUDELKA, 2005; OPPENHEIM et al., 2005). Em situação de estresse do hospedeiro, a autoproteólise do repressor *cl* é ativada por RecA, ocorrendo separação dos domínios N e C-terminal, favorecendo o ciclo lítico invés do lisogênico. Desta forma, estes vírus se aproveitam dos próprios mecanismos de resposta SOS do hospedeiro para garantir sua sobrevivência (BELL et al., 2000).

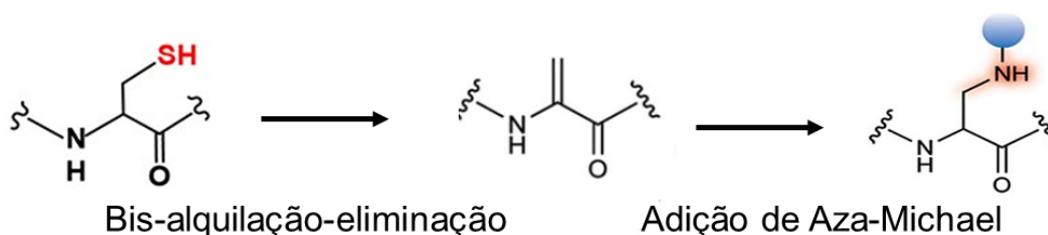
7.5 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA CADEIA LATERAL DA CISTEÍNA (-SH)

Técnicas de modificação sítio-seletiva de proteínas têm sido promissoras para o desenvolvimento de fármacos, principalmente para doenças oncológicas, devido ao seu potencial de gerar bioconjugados específicos com melhor eficiência e menores efeitos colaterais (KRALL et al., 2016). Uma maneira de melhorar a bioconjugação é explorar a modificação direta de proteínas semelhante à modificação pós-traducional natural (PTM). A modificação pós-traducional (PTM) é um processo que ocorre naturalmente em vários grupos funcionais de proteínas após a tradução ribossomal. Este mecanismo é importante para gerar proteomas diversificados e principalmente modular a estrutura e função em células eucarióticas. Nos últimos anos, os estudos de PTMs permitiram desenvolver metodologias modernas para modificação química de proteínas, essenciais para a compreensão de papéis biológicos, desenvolvimento de fármacos e aplicações diagnósticas. (BERNARDES et al., 2008; BOUTUREIRA; BERNARDES, 2015; CHALKER et al., 2009, 2011; CHALKER; BERNARDES; DAVIS, 2011; FREEDY et al., 2017; KRALL et al., 2016; WALSH; GARNEAU-TSODIKOVA; GATTO, 2005; WRIGHT et al., 2016).

Esse tipo de modificação química tem vantagens de ser quimio seletivo para um resíduo de aminoácido, em vez de todos os outros e ocorrer em condições brandas (tampão fosfato de sódio pH 8,0; T= 25-37°C) compatíveis com as moléculas biológicas. Para estes critérios de reação, a cisteína (Cys) é o aminoácido canônico mais importante escolhido, devido à sua alta nucleofilia e proporcionalmente baixa abundância na natureza (CHALKER et al., 2009). Chalker e colaboradores (2011) descreveram uma nova maneira de modificar a cisteína, conhecida como “inserir a cauda e modificar” (CHALKER; BERNARDES; DAVIS, 2011). Esta técnica foi aprimorada ao longo do tempo por este grupo de pesquisa. Na reação,

primeiramente cistinas, que contém pontes dissulfeto, são reduzidas por agentes redutores (TCEP, DTT) em cisteína, ou seja, contendo uma sulfidril livre na cadeia lateral (-SH). Em seguida, há formação da dehidroalanina (cadeia lateral -CH₂) através de uma técnica chamada de bis-alkilação-eliminação, onde reagentes contendo dois brometos (α,α' -dibromo-adipil(bis)amida e metil-2,5-dibromopentanoato) são utilizados no ataque nucleofílico. Posteriormente, ocorre a adição de aza-Michael, onde por exemplo um grupo amino livre de uma outra molécula consegue fazer ligação covalente com Dha (dehidroalanina). Isto permite que duas moléculas distintas sejam ligadas de forma estável através de uma amina secundária, um análogo truncado da lisina, conforme figura 37 (CHALKER et al., 2011; FREEDY et al., 2017; KRALL et al., 2016).

Figura 37 – Modificação de proteína via dehidroalanina e adição de Aza-Michael

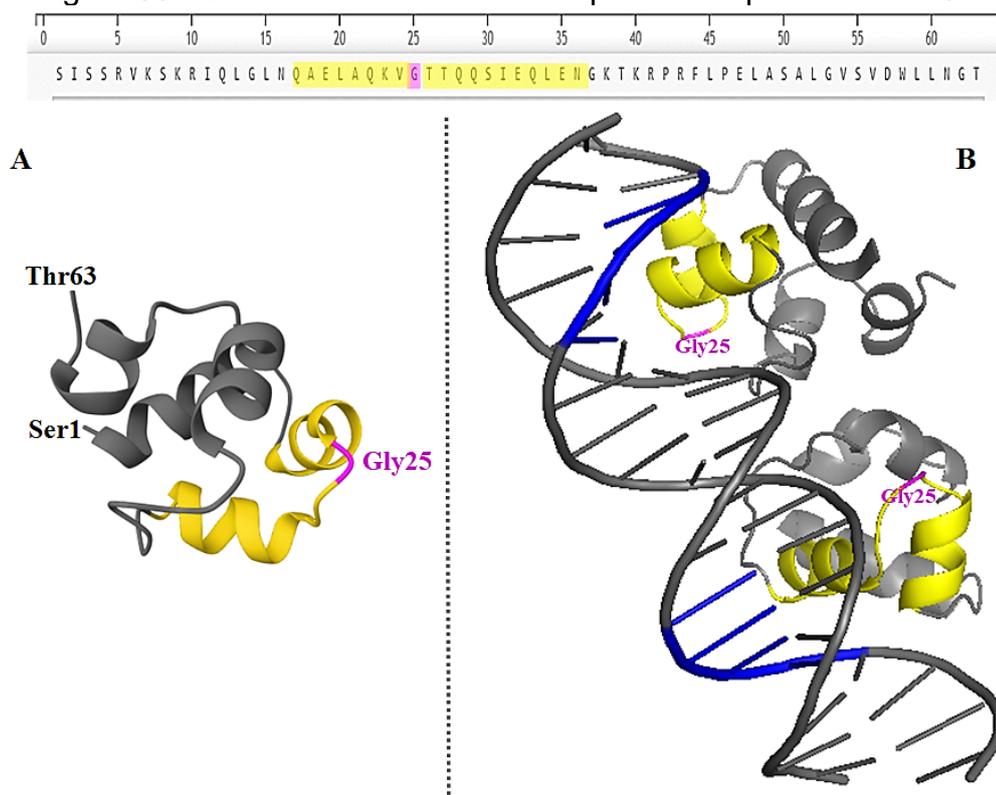


Fonte: (FREEDY et al., 2017); modificado pela autora.

7.6 NOVO MODELO QUIMÉRICO DE NUCLEASE ARTIFICIAL SÍTIO ESPECÍFICA: COMPLEXO DE CU(II) TACN COM PENDENTE AMINO + REPRESSOR *cl* DO FAGO 434

Aqui, foi escolhido o domínio amino-terminal (R1-69) do repressor *cl* do fago repressor (434_{R1-69}), uma miniproteína com 70 aminoácidos que se liga como dímero à sequência específica de DNA 5'-ACAA-3'. Essa proteína tem uma estrutura bem descrita e não tem resíduo de cisteína em sua sequência (BATEMAN et al., 2023; KUZIEL; TUCKER, 1987; MONDRAGÓN et al., 1989; RODGERS; HARRISON, 1993; SHIMON; HARRISON, 1993).

Figura 38 - Estrutura tridimensional da proteína repressora do 434



Estruturas 3D do repressor *cl* do 434 (domínio N-terminal), estrutura de hélice volta hélice.

A. Monômero da proteína (1R63 – PDB). **B.** Dímero (1PER – Pymol/PDB) ligado ao DNA, no sítio OR3 contendo os sítios 5´ACAA´3 (azul - acima) e 5´ACAG´3 (azul - abaixo). Em amarelo: a região de domínio de ligação ao DNA, em violeta: indicação do resíduo de glicina na posição 25. Fonte: PDB, Pymol, modificado pela autora. (RCSB PDB, [s.d.]; SCHRÖDINGER, 2010)

O resíduo de glicina na posição 25 (figura 38) da proteína 434_{R1-69} (repressor C2 resíduos 1-69, domínio amino-terminal; PDB: 1R69) foi escolhido para ser substituído por cisteína. Gly25 encontra-se na volta entre as duas alfa-hélices (segunda e terceira) que se ligam ao DNA, na qual uma se liga especificamente ao DNA (5´ACAA´3). Esta mutação permite que a cisteína, que possui o grupamento tiol (-SH) possa ser modificada quimicamente e se ligar ao grupo amino do complexo metálico, através de reações de bis-alkilação-eliminação e Aza-Michael, conforme descrito na Introdução do capítulo 2 (CHALKER et al., 2011; FREEDY et al., 2017). O novo recombinante de 434_{R1-69} contendo cauda de histidina foi nomeado para 434wt (*wild-type*) e 434cys para o mutante, e expressos em bactéria.

Para ancorar à proteína mutante, foi escolhido o modelo clássico derivado do cobre (II) triazaciclonoano (HEGG and BURSTYN, 1996), contendo pendente amino (propilamina), o **C5** do capítulo 1. A síntese do ligante e do complexo, assim

como a caracterização e a atividade catalítica usando o substrato modelo de fosfodiéster 2,4-BDNPP foram realizadas previamente pela mestra Bruna Auras (dados não publicados), como parte de seu doutorado (não concluído) pelo programa de Química da UFSC.

O objetivo foi ancorar dois modelos clássicos e bem descritos, a proteína repressora de 434 ao complexo de cobre (II) triazaciclonoano, utilizando uma técnica moderna e recente de modificação de proteína, com o intuito de desenvolver um modelo inovador de nuclease artificial-sítio específica. Testes de clivagem em DNA foram realizados, para avaliar os bioconjugados.

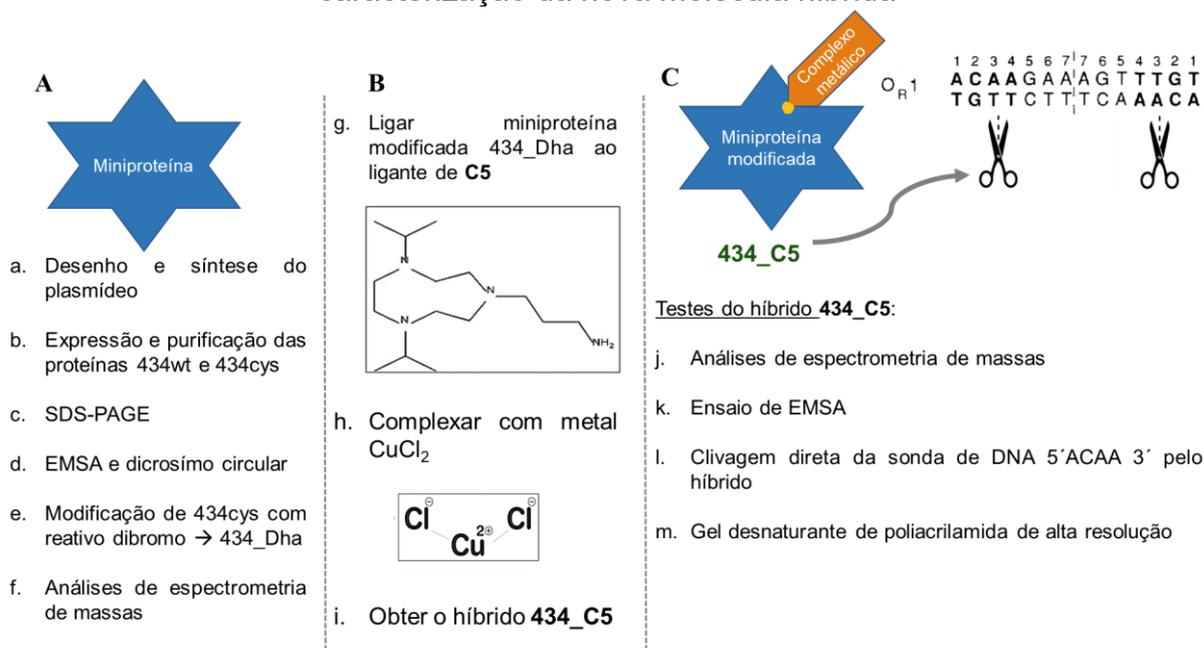
8 OBJETIVOS

- a. Construir plasmídeos recombinantes para expressão em bactéria *E. coli* das miniproteínas de interesse (434wt 434cys), assim os oligonucleotídeos sítio-específicos;
- b. Expressar, purificar e verificar a capacidade de ligação de 434wt e 434cys em oligonucleotídeo sítio-específico;
- c. Modificar quimicamente 434cys, ancorar ao ligante de **C5** e complexar o novo conjugado com metal, formando uma quimera ou híbrido complexo metálico-miniproteína;
- d. Avaliar atividade sítio-específica de clivagem de DNA pelo novo híbrido.

9 MATERIAIS E MÉTODOS

Na figura 39, encontram-se descritas todas as etapas de execução do Capítulo 2.

Figura 39 - Desenho esquemático das etapas necessárias para a montagem e caracterização da nova molécula híbrida



Fonte: Elaborado pelo autor. Desenho do sítio OR1 retirado do artigo (RODGERS; HARRISON, 1993).

Conforme descrito no capítulo 1, a síntese e a caracterização química do ligante tacnⁱPr₂-NH₂ e do complexo [Cu(TacnⁱPr₂-NH₃)Cl₂ (**C5**), foram realizadas pela MSc. Bruna Auras no laboratório LABINC, do departamento de Química da UFSC, como parte do trabalho do seu doutorado.

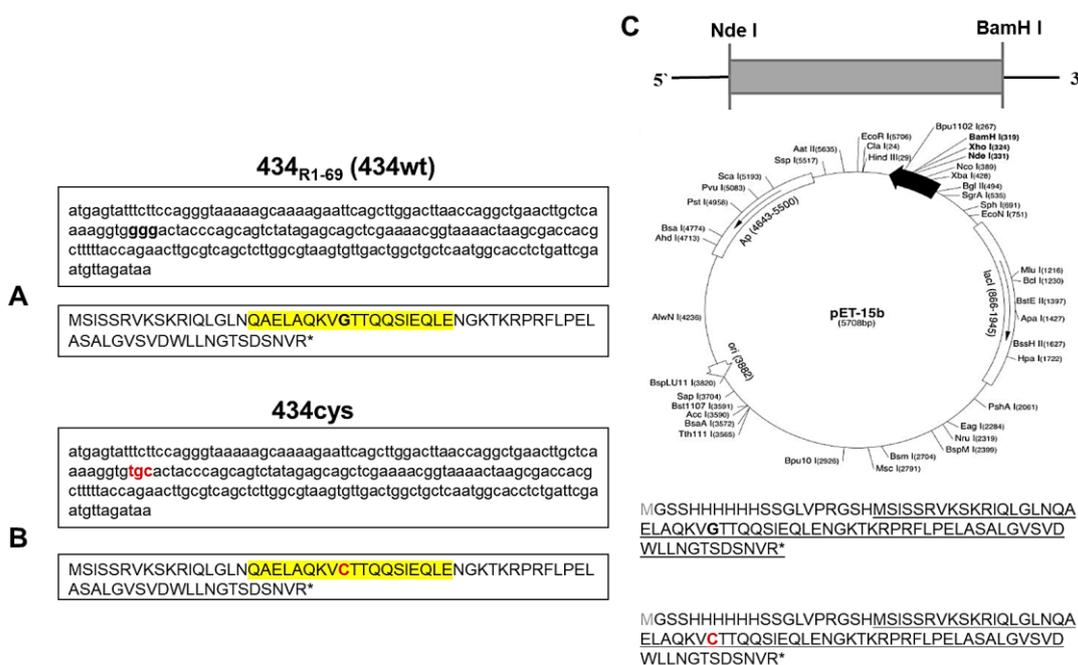
A expressão, purificação da proteína repressora do bacteriófago 434 e a montagem da nova molécula híbrida **434_C5**, assim como os estudos de DNA encontram-se descritos abaixo, como a segunda parte deste doutorado. Os ensaios foram realizados no LABIME, do departamento de bioquímica da UFSC.

9.1 PROTEÍNA REPRESSORA DO 434

As sequências dos nucleotídeos e da proteína 434_{R1-69} foram analisadas pelo banco de dados (Uniprot P16117 e Genbank: Y00118 e CAA68301) (KUZIEL;

TUCKER, 1987) e os plasmídeos foram desenhados. Em seguida, as construções foram sintetizadas e confirmadas por sequenciamento pela empresa GenOne® e analisadas no programa SnapGene® Viewer 4.1.9 (versão gratuita) e no Chromas. Na figura 40 encontra-se o mapa do plasmídeos pET-15b, contendo os fragmentos codificantes para a proteínas do repressor que chamaremos aqui como 434wt ou 434_wt (434 *wild type*), ou seja, proteína original descrita por (MONDRAGÓN et al., 1989) composta por 69 resíduos de aminoácidos, 434cys ou 434_cys com a mutação do resíduo gly25 para cys25 (gly25→cys25).

Figura 40 – Mapa da construção do plasmídeos



Mapa do plasmídeo da empresa Addgene e sequências Uniprot P16117 e Genbank: Y00118 e CAA68301 (KUZIEL; TUCKER, 1987). Fonte: elaborado pela autora.

Os retângulos representam a sequência de DNA (A e B acima) e a sequência de proteínas (A e B abaixo). **A:** glicina 26 (negrito) de 434 e alfa hélice 2 posição de aminoácidos 28-38 (azul). **B:** cisteína 26 (vermelha) de 434G26C e alfa hélice 2 posição de aminoácidos 28-38 (azul). **C:** Sítios de múltipla clonagem (MCS) destacando 434% em peso e região de clonagem 434G26C (cinza) (entre sítios NdeI e BamHI) no vetor pET-15b, mapa completo pET-15b (Addgene), sequências de proteína completa 434wt e 434cys, respectivamente, após expressão na cepa *E. coli* BL21 (DE3).

9.2 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS 434WT E 434CYS EM E. COLI

Os plasmídeos liofilizados foram ressuspensos em água ultrapura livre de nuclease, conforme indicação da empresa GenOne® e transformados por choque térmico em bactérias *E. coli* cepa BL21(DE3), conforme capítulo 1.

A partir das placas de cultivo, provenientes da transformação, uma colônia isolada com ponteira estéril foi inserida em tubo de 50 ml contendo 10 ml de meio L.B (caldo nutriente) e antibiótico ampicilina (concentração final de 100 µg/mL) e os tubos foram incubados a 37°C *overnight* a 150 rpm.

No dia seguinte, 5 ml do pré-cultivo foi inserido em oito garrafas de 1 litro contendo 250 ml L.B caldo e incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente. Quando a densidade óptica (DO 600 nm) atingiu 0,6-0,8, foi adicionado 1mM (concentração final) de isopropil-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Para a expressão, o cultivo foi realizado a 18-20 °C durante a noite (~ 16h-20h) a 150 rpm.

Para manutenção do estoque do plasmídeo, o DNA foi extraído a partir de kit *Pureyield Plasmid Miniprep System Promega*® e mantido à -20°C, além disso cultivo com 20% de glicerol foi armazenado à -80 °C.

9.2.1 Purificação das proteínas 434wt e 434cys por cromatografia de afinidade (IMAC)

Os cultivos foram centrifugados 2x em centrífuga refrigerada Eppendorf a 4.000 rpm/30min/4 °C e os pellets obtidos foram armazenados a 20°C. No dia seguinte, cada *pellet* proveniente de 1 litro de cultivo foi ressuspensado em 10 ml de tampão A (20 mmolL⁻¹ Tris; 0.5 molL⁻¹; NaCl e 10% glicerol, pH 8.0) suplementada com inibidor de protease (PMSF – 1 mmolL⁻¹ concentração final) e sonificado em gelo por 10 vezes (30 segundos com intervalo de 30s). Em seguida, o conteúdo foi centrifugado 2X (4.000 rpm/30min/4 °C) e o sobrenadante contendo a fração solúvel foi coletada.

As soluções empregadas para purificação foram: água ultrapura, etanol 20% (para conservação da coluna) e o tampão A (20 mmolL⁻¹ Tris; 0.5 molL⁻¹; NaCl e 10% glicerol, pH 8.0) e tampão B (20 mmolL⁻¹ Tris; 0,5 molL⁻¹; NaCl; 500 mmolL⁻¹ imidazol, 10% glicerol e 1 mmolL⁻¹ DTT), pH 8.0, todos filtrados em membrana 0,22 µm e degaseificados (30 minutos banho ultrassom/ bomba a vácuo).

As proteínas 434wt e 434cys foram purificadas por cromatografia de afinidade em colunas contendo níquel HisTrap HP 1 mL (GE Healthcare®) de forma manual, com auxílio de uma seringa. Para purificação, essas colunas foram previamente equilibradas com o tampão A contendo 2% do tampão B por 5 volumes de coluna (5 CV – *column volume*) e rampa contendo concentrações crescentes de tampão B, até atingir 100%. As frações correspondentes a cada uma das proteínas foram juntadas e substituídas por tampão fosfato de sódio 50 mmolL⁻¹ pH 8,0 com 1 mmolL⁻¹ DTT, através de filtros Amicon-Ultra 15 de 10 kDa (Millipore), conforme protocolo do fabricante. Foram realizadas pelo menos 3 trocas de tampão em centrífuga refrigerada à 3500 rpm/10 min/4 °C (completando até 15ml) e cada proteína foi posteriormente concentrada até 2 ml (20-30 minutos de centrifugação).

A proteína 434cys foi purificada uma vez também por AKTA Fla II, fluxo 1ml/min, os dados constam na figura dos resultados e discussão. As proteínas foram fracionadas em microtubos contendo 50-200µL e foram armazenadas a -80 °C.

9.2.2 SDS-PAGE e quantificação das proteínas

Para verificação das proteínas obtidas, géis de poliacrilamida em condição desnaturante Tris-Tricina SDS-PAGE, de 16% (separador) e 4% (concentrador) de 1 mm de espessura em sistema Mini-Protean Biorad, foram realizados. A técnica seguiu conforme adaptação do manual da (SCHÄGGGER, 2006). O marcador de peso molecular empregado foram o *Kaleidoscope polypeptide standard* e *Prestained Standards SDS-PAGE Low Range*, ambos da Biorad. Os géis foram corados por 2h sob agitação (ou *overnight*) com solução de Coomassie Blue G250 0,25% e descorados com solução descorante: ácido acético, metanol e água (4:5:1).

Concomitantemente ao SDS-PAGE, foi realizada a quantificação das proteínas obtidas através da curva de Bradford utilizando gradiente de BSA (*Bovine Serum Albumin*), conforme adaptação do manual Bio-rad Protein assay (*Microassay procedure*), leitura da absorbância em 595 nm em espectrofotômetro e gráfico de regressão linear, com $R^2 \geq 0,95$.

9.3 FINGERPRINTING DAS MASSAS DOS PEPTÍDEOS DE 434WT

Para confirmar a sequência da proteína 434wt foi realizado o ensaio de *fingerprinting* em identificação de peptídeos por digestão enzimática *in-gel*, seguindo o protocolo de (SHEVCHENKO et al., 1996), com algumas modificações. A banda contendo a proteína foi retirada do gel de SDS-PAGE, descorada com 500 μL de uma solução de 50% de acetonitrila (ACN) em 25 mmolL^{-1} de bicarbonato de amônio pH 7,4 e mantida sob agitação até a completa descoloração. Em seguida, a banda foi desidratada com 50 μL de ACN até ficar branco. Posteriormente, a ACN foi removida e os fragmentos remanescentes foram desidratados completamente em sistema à vácuo (Speed Vac/Eppendorf) por 15 minutos. Os mesmos foram reidratados com 10 μL de tripsina (Promega) na concentração final de 10 $\mu\text{g/mL}$, em tampão 25 mM de bicarbonato de amônio pH 8,0, e incubada durante 30 minutos no gelo. Subsequentemente, a amostra foi submetida à 37 °C, *overnight* (≥ 12 horas), no escuro.

Após a digestão enzimática, ocorreu a eluição dos peptídeos do conteúdo remanescente, utilizando 30 μL de solução extração: 50% de ACN e 5% de ácido trifluoroacético (TFA). Nesta etapa, foram feitas três extrações subsequentes, cada uma durante 30 minutos com agitação em vórtex, onde em cada etapa o sobrenadante foi coletado e armazenado separadamente. Todas as alíquotas, total de aproximadamente 90 μL , foram reunidas em um único microtubo e concentradas em sistema à vácuo até secagem completa.

Após essa etapa foi realizada espectrometria de massas MALDI-TOF/ TOF modelo Autoflex III Smartbean (Bruker Daltonics). Os peptídeos, provenientes das etapas anteriores, foram solubilizados em 10 μL 0,1 % de TFA. 1 μL de cada amostra foi misturada com 1 μL de matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (5 mg/mL em 50% ACN, 0,1% TFA). Em seguida, 1 μL de cada mistura foi aplicada nos *spots* da placa do espectrômetro e submetida à cristalização em temperatura ambiente. Após a cristalização, as análises espectrométricas foram realizadas em modo positivo. Para a calibração externa foi empregado o kit *Peptide Standard* (Bruker Daltonics). Os espectros gerados foram analisados através do programa FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics) e comparados com a lista de peptídeos da digestão teórica (ProteinProspector MS-Digest www.prospector.ucsf.edu), com o perfil de *peptide mass fingerprinting* (PMF) obtido por MS.

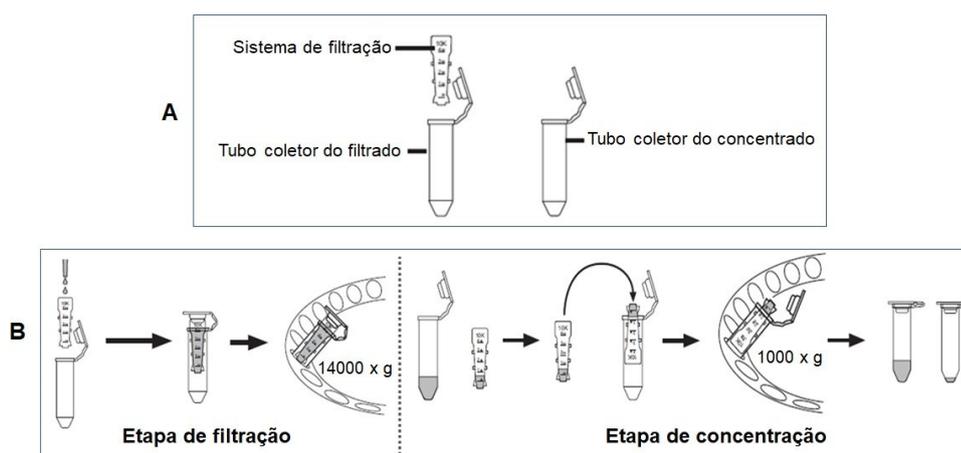
Esta técnica completa de identificação de proteína é chamada de *fingerprinting* (ou impressão digital) das massas dos peptídeos.

9.4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR ELETROSPRAY (ESI-MS)

Para confirmação das massas das proteínas 434wt e 434cys, modificadas ou não quimicamente, foi utilizado o equipamento de espectrometria de massas do tipo ESI-MS Amazon X Ion Trap da Bruker, no modo de ionização positivo; capilaridade 4500V, *end plate offset* -500 V, nebulizador 0.4 bar, gás seco 4.0 L/min e temperatura seca 200 °C. Dados obtidos e deconvoluídos pelo Bruker DataAnalysis software.

Para todas as análises, foi necessário substituir o tampão fosfato de sódio 50 mmolL⁻¹ pH 8,0 por tampão bicarbonato de amônio 25 mmolL⁻¹, pH 7,4. Para isto, foi utilizado filtro Amicon 3 kDa de 0,5ml (Millipore®) em quatro ciclos repetidos de centrifugação: 1x5 min e 3x10 min (4°C, 14.000g), preenchendo o sistema de filtração com tampão até o máximo (500 µL) em cada etapa de filtração. Para concentração do conteúdo contido no filtro, o sistema foi invertido e recuperado por spin por 1000g/4 °C por 2 minutos, conforme recomendação do fabricante (figura 41).

Figura 41 - Desenho ilustrativo do filtro Amicon 3 kDa de 0,5 ml (Millipore®)



A. Componentes do filtro. **B.** Etapas de filtração e concentração. Fonte: Manual do fabricante filtro Amicon Ultra 0,5 ml 3kDa, modificado e traduzido pela autora.

9.5 DICROÍSMO CIRCULAR

Para verificar a estrutura secundária das proteínas selvagem e mutante, não modificadas quimicamente, foi realizado ensaio de Dicroísmo Circular (CD).

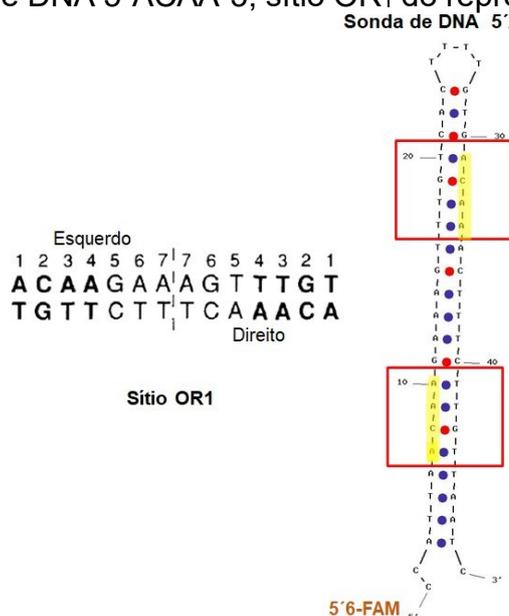
Os espectros de CD foram obtidos no espectropolarímetro de Dicroísmo Circular da marca Jasco J-815 (com acessório de termostato Peltier PFD-425S) utilizando uma cubeta de quartzo de 0,5 mm de caminho óptico, célula de 10 mm. (equipamento). A temperatura utilizada foi de 20 °C. As concentrações das proteínas foram: 2,5; 5 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em tampão fosfato de sódio 50 mmolL^{-1} pH 8,0. Para 434cys foi adicionado 1 mmolL^{-1} DTT ao tampão. As leituras foram realizadas entre 260-200 nm, 3 acumulações, 121 pontos. Para o branco foi empregado apenas tampão, sem amostra (GREENFIELD, 2006). Para as análises, o branco foi descontado e depois foram submetidos ao programa online CAPITO (WIEDEMANN; BELLSTEDT; GÖRLACH, 2013) , onde as curvas passaram por *smoothing* e normalização, de acordo com a concentração e os parâmetros utilizados. Além deste, o PDBMD2CD (DREW; JANES, 2020) e BeStSel (MICSONAI; BULYÁKI; KARDOS, 2021) também foram utilizados, apenas como comparativo.

9.6 ENSAIO DE EMSA (ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY)

Esta técnica emprega a utilização de um gel não desnaturante de poliacrilamida (PAGE), com o objetivo de detectar interações, ou seja, formação de complexos com o DNA, principalmente DNA-proteína. Quando ocorre interação, a migração do DNA no gel fica reduzida e então as bandas migram de forma lenta (HELLMAN, FRIED, 2007).

Neste teste, foi empregada a sonda de DNA marcado com fluoróforo e em formato de *harpin* (alça), contendo o sítio OR₁, que se encontra sublinhado e contém a sequência específica 5´ACAA´3 adaptada de (BUSHMAN, 1993; MONDRAGÓN et al., 1989; RODGERS; HARRISON, 1993), de 49 mer: 5´FAM-56-CCATTAACAAGAAAGTTTGTCACTTTTGTGACAAACTTTCTTGTTAATC´3 sintetizado pela empresa IDT[®], conforme desenho da figura 42. O oligonucleotídeo foi ressuspendido em água ultrapura livre de nuclease (Millipore[®]), conforme indicação do fabricante IDT[®], e armazenado em -20°C na concentração de 250 μmolL^{-1} .

Figura 42- Sonda de DNA 5'ACAA'3, sítio OR₁ do repressor *cI* do bacteriófago 434



A parte em amarelo, dentro da caixa vermelha, indica a sequência específica 5'ACAA'3 do sítio OR₁ (fonte). Fonte: IDT e (RODGERS; HARRISON, 1993), modificado pela autora.

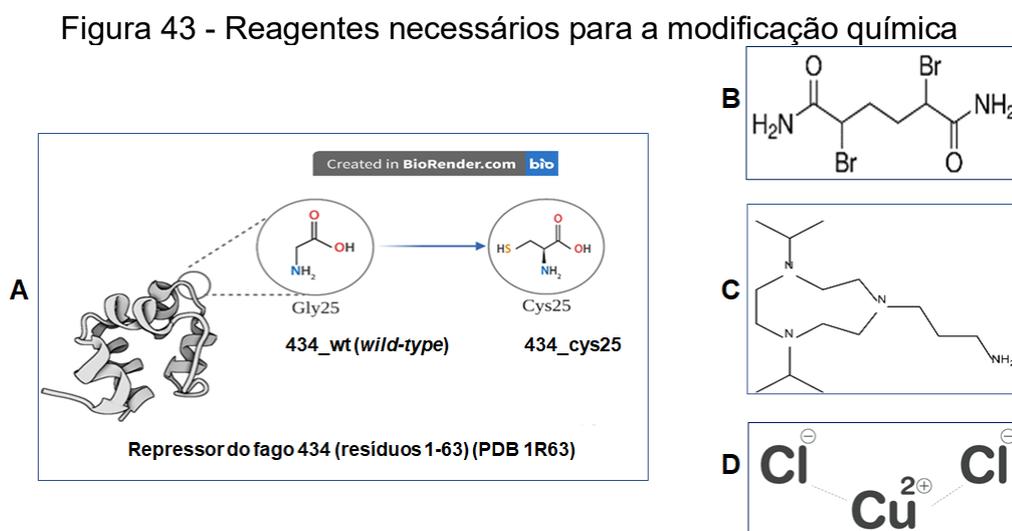
25 μmolL^{-1} de sonda fluorescente 5'ACAA'3 (figura 42) foi previamente submetida à 95°C por 5 minutos, seguida de anelamento em temperatura ambiente durante 1h. As reações foram realizadas em tampão fosfato de sódio 50 mmolL^{-1} pH 8,0, posterior ligação com as proteínas 434wt e 434cys, nas concentrações crescentes, respectivamente, 0-16 μmolL^{-1} e 0-32 μmolL^{-1} , sob temperatura de 4°C (Termociclador) e incubação por 30 minutos. Em seguida, foi acrescentado 8 μL de tampão 0,25 molL^{-1} EDTA, pH 8,0, 50% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol. As reações foram imediatamente submetidas à eletroforese, utilizando gel nativo 10% de poliacrilamida (PAGE) de 1mm em sistema tampão tris-borato EDTA (TBE) e para a cuba foi empregado tampão Tris-glicina 1x (referência), corrida de aproximadamente 70 minutos a 4-8°C. Para cada poço foi aplicado 10 μL de amostra.

A constante de dissociação (K_D) calcula a concentração de proteína necessária para interagir com 50% do DNA. Para os cálculos, foi empregado hipérbole para um sítio específico (HEFFLER; WALTERS; KUGEL, 2012).

Toda esta etapa foi empregada para as proteínas 434wt e 434cys, modificadas ou não quimicamente.

9.7 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DAS MINIPROTEÍNAS

A proteína 434wt, que não contém resíduo de cisteína, foi utilizada como controle negativo, assim como 434cys não modificado (sem utilizar reagente brominado). 434cys foi usado como amostra ao receber modificação química. Todos os reagentes necessários, para esta etapa e as próximas duas subseções a seguir, encontram-se na figura 43.



9.7.1 Modificação de proteína por bis-alkilação-eliminação

As proteínas 434wt e 434cys (figura 43a), na concentração de $350 \mu\text{molL}^{-1}$ foram incubados com DTT (ditiotreitól) na concentração final de 10mmolL^{-1} , incubados por 30 minutos em gelo.

Após a redução das pontes de dissulfeto, o DTT foi removido através de filtração em filtros Amicon 3kDa de 0,5ml (Millipore®), conforme descrito anteriormente (figura 41). Posteriormente, foi realizada a conversão do resíduo de cisteína para dehidroalanina (DHA) através da adição de $15\text{-}20 \text{mmolL}^{-1}$ (concentração final) do reativo α,α' -dibromo-adipil(bis)amida (figura 43b), previamente dissolvido em 5% de dimetilformamida (DMF), incubado à 37°C por 2h, sob agitação (600-700 rpm/ Bioer Thermoblock).

O reativo foi removido através de filtração (3kDa 0,5ml Amicon, Millipore®), em três ciclos repetidos de centrifugação (2x10min e 1x final 15min; 4°C ,

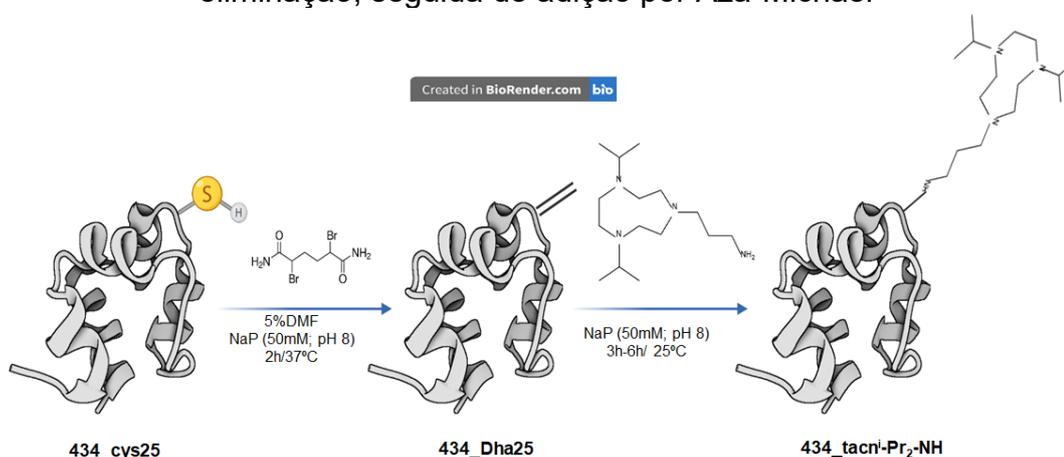
14000g), completando com tampão fosfato de sódio 50 mmolL⁻¹ (pH 8,0) em cada etapa. O conteúdo concentrado foi recuperado por spin à 1000g/4 °C por 2 minutos, conforme descrito na figura 41. Alíquotas foram separadas para adição de Aza-Michael, ensaio de Bradford e MS.

9.7.2 Adição de Aza-Michael do ligante tacnⁱ-Pr₂-NH₂ à proteína com DHA

Aproximadamente 35-50 mmolL⁻¹ do ligante tacnⁱ-Pr₂-NH₂ foi adicionado à uma alíquota de 434_Dha25 e incubado por 3h-6h à 25°C sob agitação (600-700 rpm/ Bioer Thermoblock). Os híbridos 434-tacn-Prⁱ-NH₂ foram filtrados em 0,5ml de Amicon (3kDa) em três ciclos repetidos de centrifugação de 15 min (4°C, 14000g), para remoção do tacn. As amostras foram mantidas em tampão fosfato de sódio 50 mmolL⁻¹ e armazenadas a -20°C. Alíquotas foram separadas para ensaio de Bradford, MS e EMSA.

As reações desta etapa e a anterior estão resumidas na figura 44.

Figura 44 - Etapas de modificação química de 434_cys25 por bis-alquilação eliminação, seguida de adição por Aza-Michael



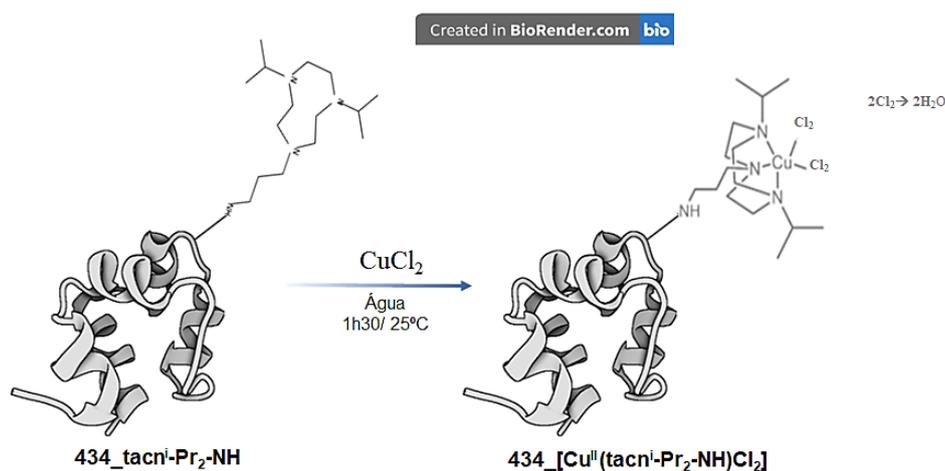
Conversão do resíduo de cisteína da posição 25 de 434cys para dehidroalanina, através de bis-alquilação-eliminação, seguida de adição de Aza-Michael do ligante tacn-Prⁱ-NH₂. Fonte: elaborado pela autora, com auxílio do PDB 1R63 e do programa Biorender.

9.7.3 Complexação do híbrido com CuCl₂

Para diminuir a concentração do tampão fosfato de sódio 50 mmolL⁻¹, foi realizada troca em 2 etapas com água ultrapura. O cloreto de cobre (II) desidratado (CuCl₂, 2H₂O) na concentração de 50 mmolL⁻¹, foi previamente diluído em água

ultrapura (Milli Q, Millipore) e incubado com 434-tacn-Prⁱ-NH₂ em água milli Q durante 1h30min, à 25°C sob agitação (600-700 rpm/ Bioer Thermoblock), conforme figura 45. Após a coordenação do metal, o conteúdo foi centrifugado por 2x10 min (4°C, 14.000g), recuperando o sobrenadante. Posteriormente, o conteúdo foi filtrado em Amicon 10 kDa 50ml (Millipore®) (4°C, 3500 rpm), trocando para tampão fosfato de sódio 50 mmolL⁻¹ (pH 8,0), para ensaio de Bradford, MS e EMSA e clivagem direta. As alíquotas foram mantidas em -20 °C. Para concentrar a amostra foi utilizado Amicon 3 kDa 0,5ml (Millipore®), conforme descrito nas etapas anteriores. Em todas as análises de ESI-MS foi utilizado tampão bicarbonato de amônio 25 mmolL⁻¹ pH 7,4 e aproximadamente 10-20 μmolL⁻¹ de proteína modificada (BERTOLDO et al., 2017; CHALKER et al., 2011).

Figura 45 - Complexação do 434_tacn-Prⁱ-NH ao CuCl₂



Fonte: elaborado pela autora, com auxílio do PDB 1R63 e do programa Biorender.

9.8 CLIVAGEM DIRETA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS

Uma amostra contendo 50 μmolL⁻¹ de sonda fluorescente 5'ACAA'3, previamente diluída em água, foi submetida à 95°C por 5 minutos, seguida de anelamento à temperatura ambiente durante 1h. Posteriormente, foi adicionado híbrido 434_[Cu^{II}(tacn-Pr₂-NH)Cl₂] na concentração de 6 μmolL⁻¹ e na metade dos tubos também foi adicionado ascorbato de sódio 50 μmolL⁻¹. Dois controles negativos foram usados, um sem híbrido e sem ascorbato, o outro apenas sem o híbrido. As reações foram realizadas em volume de 10 μL, no tempo de 2h e 5h, à 37°C, ao abrigo da luz.

Imediatamente após o tempo de incubação, foi adicionado 1 μL de acetato de sódio (3 molL^{-1} pH 5,2) e 1 μL de glicogênio (20 mg/mL). Em seguida, foram adicionados 3x o volume do conteúdo ($3 \times 12 \mu\text{L} = 36 \mu\text{L}$) de etanol 100% para finalizar a reação e iniciar a precipitação. As amostras foram mantidas à 20 °C por no mínimo 16 h. Em seguida o conteúdo foi centrifugado (4 °C, 16000 x g por 40 min), obtendo-se um *pellet* (precipitado). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 50 μL de etanol 70% e centrifugado novamente (4 °C, 16000 x g por 10 min). O etanol 70% foi removido através de secagem em SpeedVac por ~1h30 e o DNA precipitado foi ressuscitado em 5 μL de tampão de amostra desnaturante (80% de formamida, 10 mM de NaOH, 1 mM de EDTA e 0,05% de azul de bromofenol).

9.9 ELETROFORESE EM GEL DESNATURANTE DE POLIACRILAMIDA 16%

As amostras ressuscitadas de DNA, obtidas a partir da etapa anterior de clivagem direta, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante de alta resolução, conforme descrito nos parágrafos abaixo.

Duas placas de vidro (42 cm x 33 cm) foram previamente lavadas e limpas com etanol. Em seguida, Repel-Silane ES e clorofórmio (1:1 v/v) foram aplicados e espalhados na parte interna das placas. Após a secagem, espaçadores de 1 mm foram inseridos e as placas foram seladas nas laterais com fita adesiva.

Para o preparo do gel foi utilizado uma solução de 16% acrilamida:bis-acrilamida 40% 19:1, TBE 1x e 7 molL^{-1} de ureia, em um volume total de 120 mL. Para polimerização, foi adicionado 0,55 mL de persulfato de amônio (APS, 10% m/v) e 55 μL de TEMED (tetrametiletilenodiamina). Em seguida, esta solução foi aplicada nas placas e o pente para poços foi inserido. Logo após a completa polimerização do gel nas placas, foi necessário realizar uma pré-corrida eletroforética durante pelo menos 1 h, sob potência constante de 50 W (~1600- 1700 V) em TBE 1x até que a temperatura do gel atingisse ~45-50 °C. Esta etapa é importante para evitar a renaturação do DNA e possíveis pareamentos inespecíficos.

As amostras de DNA, obtidas a partir da etapa anterior de clivagem direta, foram desnaturadas completamente à 95 °C durante 3 minutos. Em seguida, 4 μL de amostra foram aplicados em cada poço. Previamente, antes da etapa de clivagem direta, foi necessário preparar quimicamente um marcador Maxam-Gilbert A + G (MAXAM; GILBERT, 1977) da sonda 5'ACAA'3, que permite identificação

oligonucleotídeos terminados em purinas (adenina e guanina). Esta marcação foi importante para orientar o sequenciamento das bandas do gel.

A corrida eletroforética aconteceu nas mesmas condições da pré-corrída, no entanto o tempo de duração foi maior, de aproximadamente 2h20min. O gel foi revelado pelo equipamento Typhoon™ FLA 9000 (Fuji Film), usando laser de fluorescência específico para leitura do fluoróforo FAM, e posteriormente foi analisado no software MultiGauge (Fuji Film).

9.10 ANÁLISE DE DADOS

Todos os dados encontrados foram processados no Excel® (Microsoft 365) e os gráficos no GraphPad® Prism 5 e GraphPad® Prism 10 (versão teste). As análises estatísticas seguiram os protocolos apresentados pela literatura de cada técnica, conforme citado anteriormente.

10 RESULTADOS E DISCUSSÃO

10.1 NUCLEASE ARTIFICIAL HÍBRIDA: COMPLEXO C5 + REPRESSOR *CI* DE 434 MODIFICADO

10.1.1 Obtenção das miniproteínas 434wt e 434cys recombinantes

As massas teóricas das proteínas derivadas do repressor *ci* de 434 (domínio amino-terminal, Uniprot P16117) encontram-se na tabela 1, abaixo. O último resíduo de alanina é indicado como não-terminal (Uniprot P16117), por não estar presente o domínio C-terminal.

Tabela 1 – Dados teóricos de MS esperados para o repressor *ci* do bacteriófago 434

Nome da proteína	Fonte:	Número de aminoácidos	Sequência da proteína	Massa molecular teórica
Repressor <i>ci</i> do fago 434	Uniprot P16117	95	<u>MSISSRVKSKRIQLGLN</u> <u>QAELAQKVGTTQQSIE</u> <u>QLENGKTKRPRFLPEL</u> <u>ASALGVSVDWLLNGTS</u> <u>DSNVRFVGHVEPKGKY</u> PLISMVRAGSWCEA (não- terminal)	10426 Da
repressor (434 _{R1-69})	PDB 1R69/ Protparam/ Expasy	69	<u>SISSRVKSKRIQLGLNQ</u> <u>AELAQKVGTTQQSIEQL</u> <u>ENGKTKRPRFLPELAS</u> <u>ALGVSVDWLLNGTSDS</u> NVR*	7550,56
434wt	PDB 1R69/ modificado (tese*)	89	GSSHHHHHHSSGLVPR <u>GSHMSISSRVKSKRIQL</u> <u>GLNQAELAQKVGTTQQ</u> <u>SIEQLENGKTKRPRFLP</u> <u>ELASALGVSVDWLLNG</u> TSDSNVR*	9713,88 Da

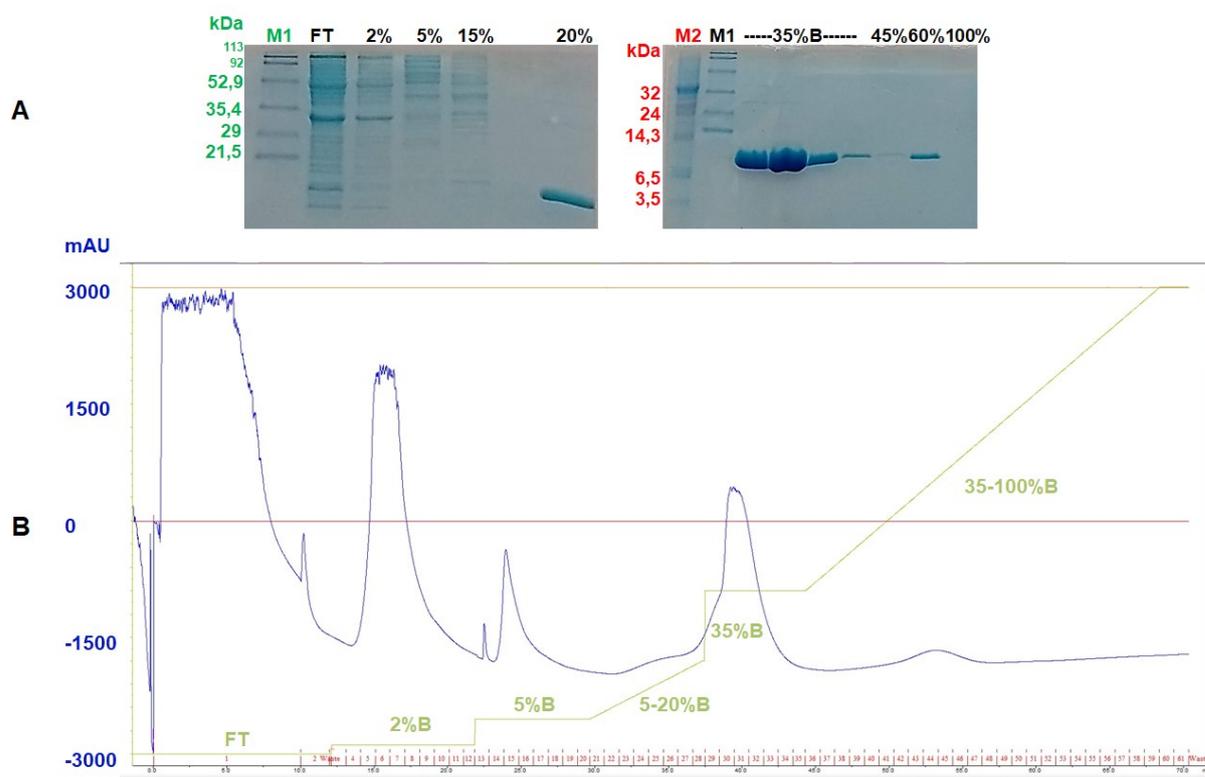
Nome da proteína	Fonte:	Número de aminoácidos	Sequência da proteína	Massa molecular teórica
434cys	PDB 1R69/ modificado (tese*) Protparam/ Expasy	89	<u>GSSHHHHHHSSGLVPR</u> <u>GSHMSISSRVKSKRIQL</u> <u>GLNQAELAQKVC</u> <u>TTQQ</u> <u>SIEQLENGKTKRPRFLP</u> <u>ELASALGVSVDWLLNG</u> <u>TSDSNVR*</u>	9759,97 Da

Sublinhado: sequência de aminoácidos 2-69 do repressor *ci* de 434. O asterisco indica o aminoácido terminal das miniproteínas, relacionado ao códon de parada. Amarelo: a mutação da Gly25 à Cys25. Fonte: indicados na tabela, elaborado pela autora.

Os dados obtidos de SDS-PAGE (figura 45) e de espectrometria de massas (ESI-MS) (figura 46) mostram que as massas moleculares de 434wt e 434cys, obtidos na prática, estão de acordo com as massas teóricas da tabela 1. Ademais, a sequência proteica está de acordo com a fase de leitura aberta (ORF) dos plasmídeos pET-15b/434wt e pET-15b/434cys, conforme planejamento da construção e os dados de sequenciamento (não mostrados), enviados pela empresa GenOne.

A figura 45, mostra que nas etapas de purificação as miniproteínas começaram a se desligar da coluna His-Trap HP em 25%, com pico à 35% de tampão B (imidazol final a 175 mmolL⁻¹). As concentrações obtidas para as duas proteínas foram aproximadamente 350 µmolL⁻¹ e um rendimento ~2-6 mg/L. 434wt seguiu perfil semelhante, com pico iniciando à 25% (dado não mostrado). Os picos em 2% e 7,5% (tampão B) indicam a co-expressão de algumas proteínas endógenas que também contém histidina e são conhecidas na literatura (BOLANOS-GARCIA; DAVIES, 2006), mas que neste caso se ligaram fracamente à coluna em relação à 434cys e saíram antes da rampa de imidazol.

Figura 45 – Gel de Tris-Tricina SDS-PAGE e dados cromatográficos da purificação de 434cys

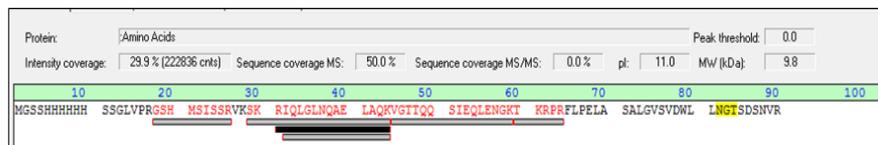


A. SDS-PAGE e a marcadores moleculares Kaleidoscope Polypeptide Standards (Bio-rad) (M2) e Prestained SDS-PAGE (M1) **B.** Dados cromatográficos obtidos por AKTA Fla II. A porcentagem indica a quantidade de tampão B.

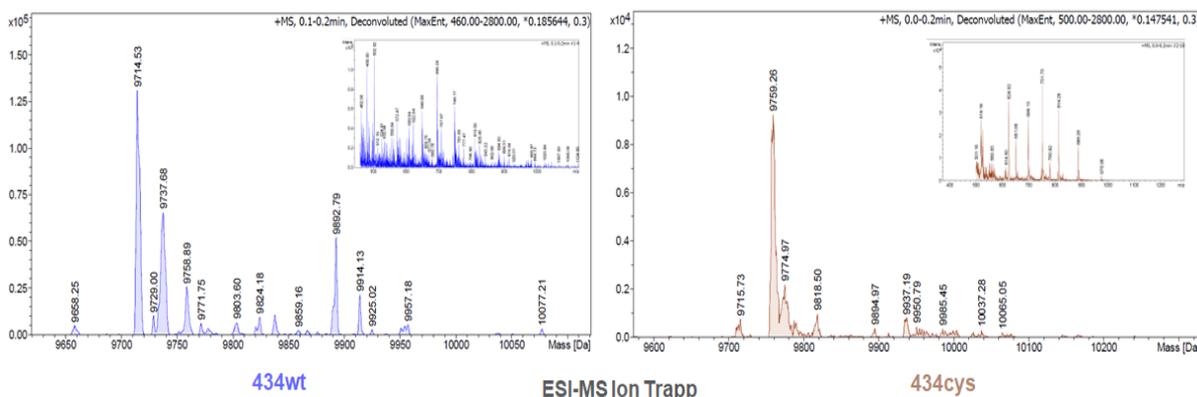
Apesar de nos ensaios *fingerprinting* (MALDI-TOF/TOF) de 434wt haver uma baixa cobertura, de apenas 50%, foi possível verificar a glicina na posição 25 de 434wt, ou seja, sem a mutação. Os espectros de massa (ESI-MS) indicam 434wt e 434cys puros, com massas moleculares de 9714 e 9759 Da (figura 46), respectivamente. Houve uma remoção esperada da metionina N-terminal, previsto para proteínas recombinantes expressas em *E. coli* (LIAO et al., 2004). Em 434wt é possível observar também um pico menor, com massa de 9892 Da, o que corresponde à um aumento de 178 Da, devido uma modificação pós-traducional em *E. coli*, onde caudas de histidina N-terminal passam por uma glicosilação (GEOGHEGAN et al., 1999). Alguns íons como Na^+ também aparecem no espectro, provavelmente devido à um resquício de tampão fosfato de sódio, que pode ter sobrado mesmo após a troca para tampão bicarbonato de amônio.

Figura 46 -Dados de MS de 434wt e 434cys

A

Footprinting 434wt
(MALDI-TOF/TOF)

B



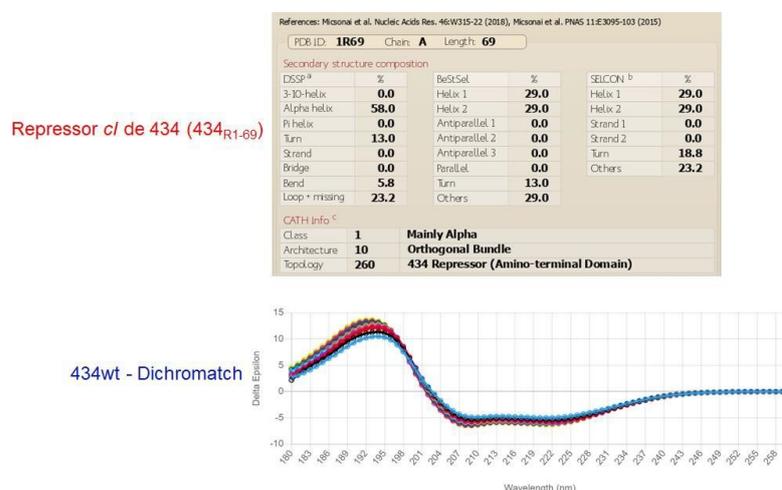
Fonte: Autora.

10.1.2 Estrutura secundária das miniproteínas 434wt e 434cys

Os espectros de CD (figuras 47-49) indicaram duas miniproteínas α -helicoidais com bandas negativas em 222 nm e 208 nm, indicando um perfil majoritariamente de alfa-hélice, segundo programa BestSel e CAPITO. O perfil das bandas se manteve nos dois espectros (434wt e 434cys), comparável ao encontrado pelo Dichromatch, que faz uma análise preliminar da sequência proteica, gerando um perfil de espectro Far UV CD. Entretanto, nos espectros obtidos é possível observar um “aumento” da alfa-hélice, possivelmente devido a formação de multímeros e espécies mistas monômero-dímero, monômero principalmente em 434wt à medida que a concentração aumentava ($2,5 \rightarrow 5 \rightarrow 10 \mu\text{molL}^{-1}$). Em 434cys, é provável que na sua concentração mais baixa ($2,5 \mu\text{molL}^{-1}$), a espécie presente seja a monomérica e por isso não houve muita helicidade. O mesmo ocorreu por exemplo, no trabalho de Nomura e colaboradores (2013), onde a presença de multímeros (dímeros e trímeros) aumentaram a helicidade de alguns peptídeos derivados de CHR, que atuam como inibidores da fusão de HIV-1 com a membrana celular do hospedeiro. O ensaio foi realizado sob tampão fosfato de sódio (50 mmolL^{-1} , pH 7.2) com 150 mmolL^{-1} de NaCl (NOMURA et al., 2013). Nos ensaios de CD desta tese, também foi usado o tampão

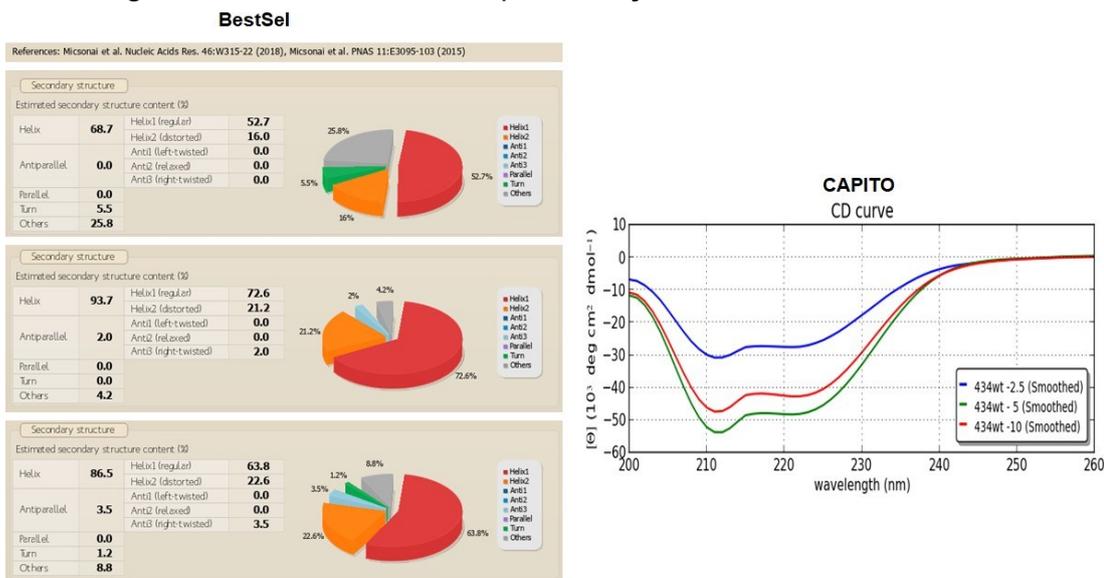
fosfato de sódio (50 mmolL⁻¹, pH 8,0), no entanto sem cloreto de sódio. Miles e colaboradores (2021) sugerem alguns parâmetros para evitar erros nas análises de CD. Em algumas condições, é interessante utilizar a menor concentração possível de tampão, desde que não haja interferência na estabilidade da proteína em análise (MILES; JANES; WALLACE, 2021).

Figura 47 – Perfil da estrutura secundária do repressor *cI* de 434 através do BestSel e do espectro de CD do 434wt através do Dichromatch

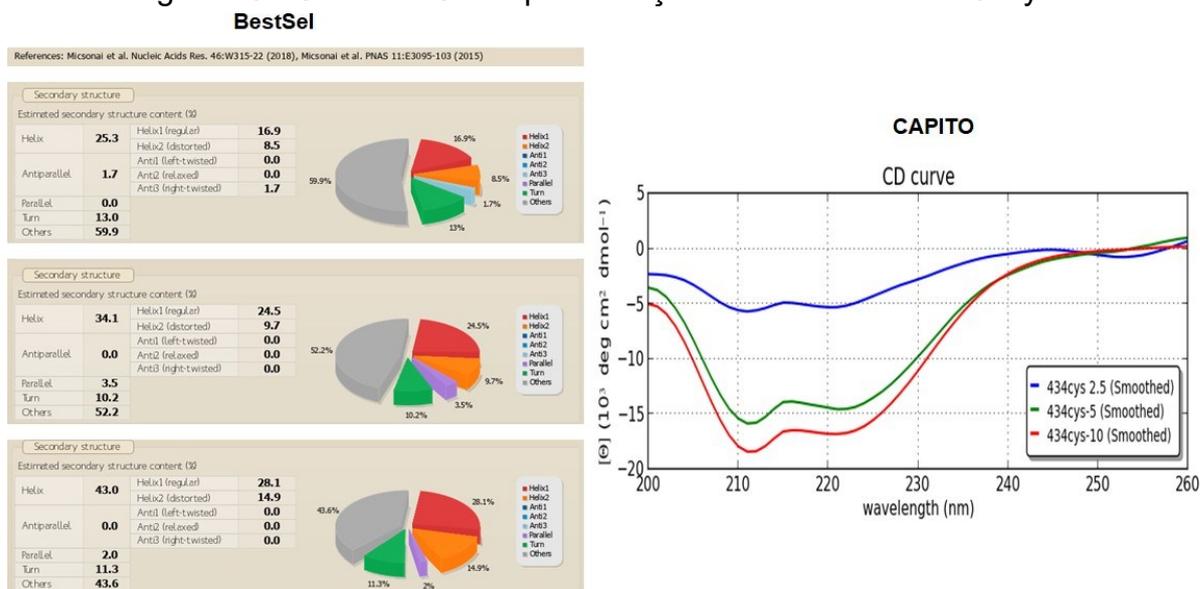


Fonte: elaborado pela autora, a partir do PDB 1R69 e sequência da tabela 1 (434wt) e inseridos nos programas *online* BestSel e Dichromatch.

Figura 48 – Curva de CD e quantificação das α -hélices de 434wt



Curva de CD de 434wt obtida pelo programa CAPITO após normalização e *smooth* (direita), nas concentrações de 2,5 (azul); 5 (vermelha) e 10 μmolL^{-1} (verde), e sua respectiva quantificação pelo programa BestSel (esquerda). Fonte: autora, análises de dados nos programas *online* BestSel e CAPITO.

Figura 49 - Curva de CD e quantificação das α -hélices de 434cys

Curva de CD de 434cys obtida pelo programa CAPITO após normalização e *smooth* (direita), nas concentrações de 2,5 (azul); 5 (vermelha) e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (verde), e sua respectiva quantificação pelo programa BestSel (esquerda). Fonte: autora, análises de dados nos programas online BestSel e CAPITO.

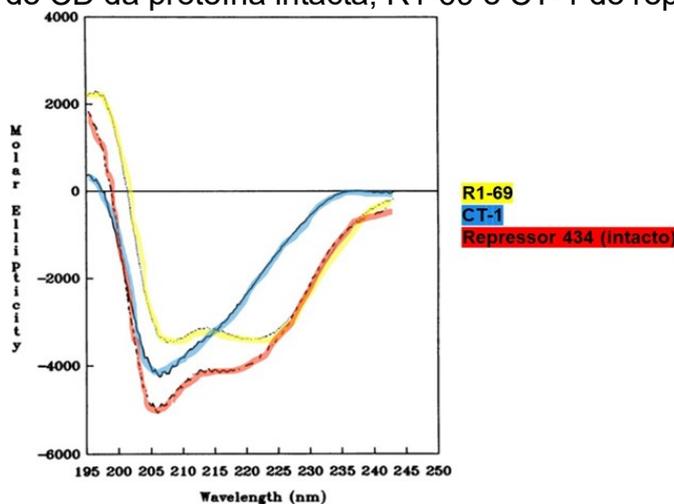
É importante ressaltar que o domínio C-terminal do repressor *cl* de 434, que faz a oligomerização da proteína (CARLSON; KOUDELKA, 1994; DONNER; PAA; KOUDELKA, 1998) não está presente. Portanto, em solução, teoricamente as miniproteínas deveriam estar na forma monomérica. Em estudos envolvendo um heptapeptídeo alfa-hélice capaz de formar super hélice, o aumento da força iônica aumentou o estado de oligomerização, através da formação de pontes salinas inter e intra-hélices. Um dos vários pré-requisitos neste caso é o ácido glutâmico e a arginina estarem em posições específicas em relação ao núcleo hidrofóbico da proteína, formando pontes salinas (BURKHARD et al., 2000; BURKHARD; IVANINSKII; LUSTIG, 2002).

No repressor *cl* do 434 (434_{R1-63}), há uma importância da ponte salina entre arginina-10 com o ácido glutâmico-35, na qual uma mutação de Arg10 \rightarrow Met10 causou uma alteração na interação proteína-proteína, podendo afetar a ligação ao DNA (PERVUSHIN et al., 1996). Naturalmente, a dimerização mediada por interações hidrofóbicas, eletrostáticas e pontes de hidrogênio ocorre em 434_{R1-69} quando em contato com o DNA, mas este efeito de oligomerização é mais fraco na ausência do domínio C-terminal (CARLSON; KOUDELKA, 1994; KOUDELKA, 1998; KOUDELKA; DONNER; CIUBOTARU, 2000; MONDRAGÓN et al., 1989). No desenvolvimento de moléculas pequenas como novos fármacos, inibir as interações proteína-proteína

mediada por alfa-hélices é considerado um enorme desafio (AZZARITO et al., 2013). Provavelmente, a multimerização de 434wt e 434cys em solução foi potencializada pela força iônica, ou seja, interações miniproteína-miniproteína mediadas pela estrutura alfa-hélice.

Não é possível afirmar com exatidão a porcentagem de alfa-hélice de 434wt e 434cys, devido à presença da cauda de histidina, de DTT (em 434cys) e oligômeros, o que não são recomendados para uma correta avaliação da estrutura secundária de proteínas, inclusive indicado pelo BestSel (GREENFIELD, 2006; MICSONAI; BULYÁKI; KARDOS, 2021; MILES; JANES; WALLACE, 2021). Nos espectros de CD de (CARLSON; KOUDELKA, 1994) da figura 50, predominam, respectivamente, no domínio amino (R1-69) e carboxi terminal (CT-1) do repressor de 434, α -hélices e folhas β , enquanto a proteína repressora intacta do fago 434, por ser completa, é uma combinação de R1-69 e CT-1, apresentando uma distorção negativa na helicidade próximo de 205 nm. Uma discreta distorção também ocorre nos espectros de CD de 434wt e 434cys, no entanto próximo de 212 nm. Nas análises do BestSel, é possível verificar que a hélice 2 encontra-se distorcida nas miniproteínas, com discreto aumento na volta em 434cys, devido a mutação (Gly25→Cys25).

Figura 50 – Espectro de CD da proteína intacta, R1-69 e CT-1 do repressor de 434



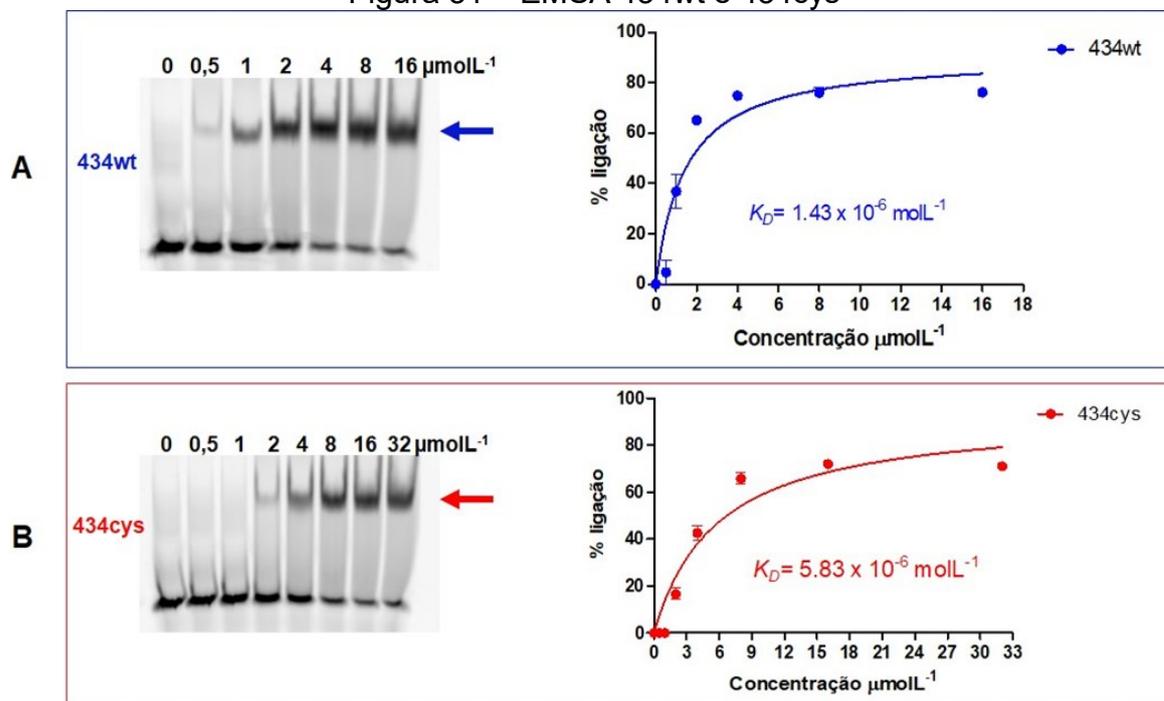
Fonte: (CARLSON; KOUDELKA, 1994) com modificação da autora, através de inserção de cores no espectro, para melhor visualização.

10.1.3 Ligação de 434wt e 434cys ao DNA

A mutação em 434cys não foi capaz de afetar drasticamente a ligação ao DNA, se comparado com 434wt, conforme mostrado nos ensaios de EMSA (figura

51). O aumento do K_D foi discreto, de 4x ($1,43 \rightarrow 5,83 \mu\text{molL}^{-1}$), indicando que a função de ligação ao DNA foi mantida. Este aumento no K_D é comparável com o trabalho de McGinnis e colaboradores (2022), onde uma mutação na posição 104 (Asp \rightarrow Ala) do domínio Stoperator (parada de operador), que contém variações de motivos HTH, do repressor do bacteriófago TopsytheTRex de *Mycobacterium*, diminuiu apenas 3,5x a ligação ao DNA. Este estudo foi realizado de forma semelhante ao repressor *cI* dos fagos 434 e λ (MCGINNIS et al., 2022).

Figura 51 – EMSA 434wt e 434cys

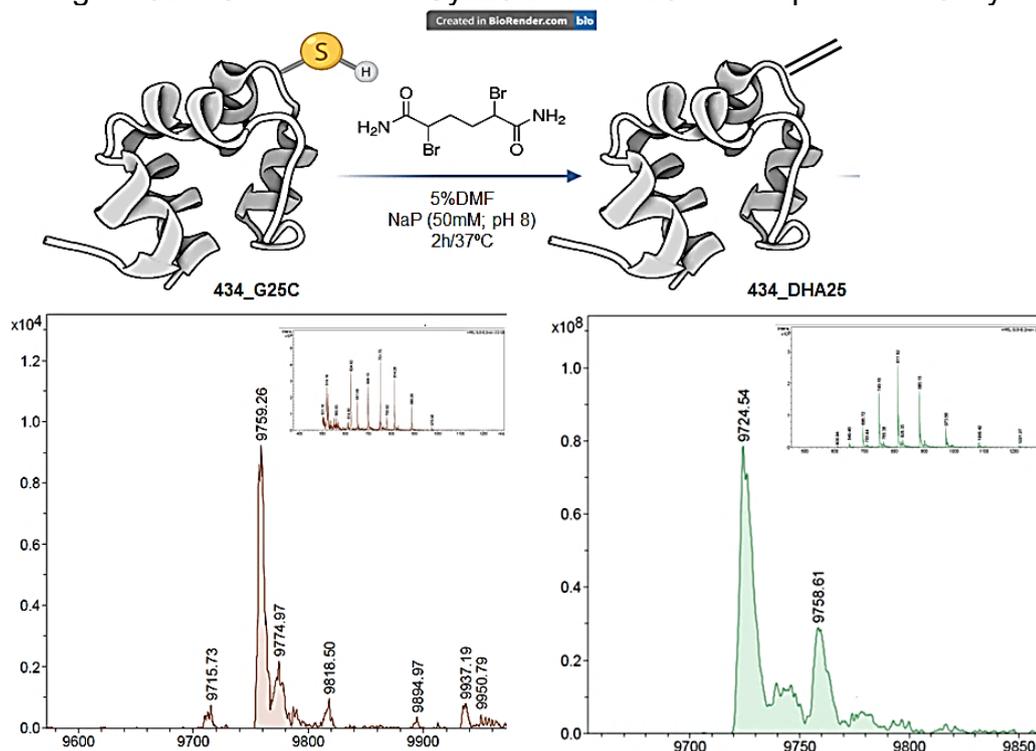


As setas: azul e vermelha indicam, respectivamente, a ligação de 434wt (**A**) e 434cys (**B**) ao DNA, ou seja, formação complexo proteína-DNA com mobilidade reduzida no gel de poliacrilamida. Dados representativos de três testes, expressos em média \pm DP. Fonte: autora.

10.1.4 Modificação química das miniproteínas

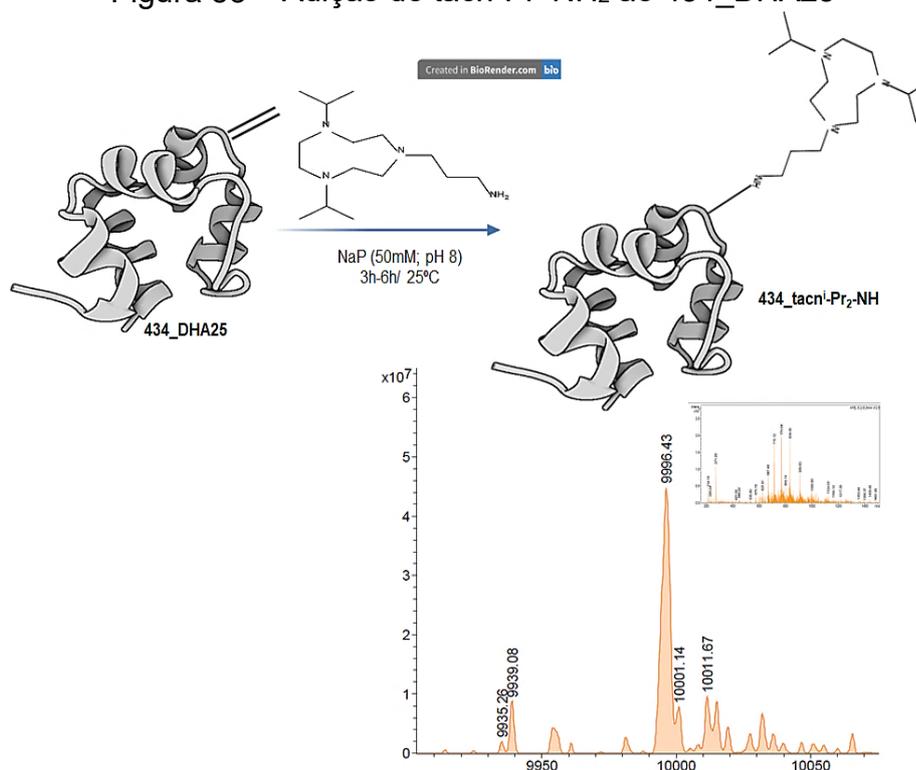
434cys, que aqui chamaremos de 434_G25C (9759,26 Da), foi convertido 434_DHA25 (9724,54 Da), uma perda de 34,52 Da de massa (figura 52). A massa molar da cisteína é de 121,16 g/mol e da dehidroalanina 87,08 g/mol, o que corresponde uma diferença de 34,08 g/mol. Portanto, a cisteína da posição 25 de 434cys foi convertida em dehidroalanina.

Figura 52 – Conversão da Cys25 em DHA25 na miniproteína 434cys



Eixo x se refere à massa (deconvoluída) em número de Daltons. Dados de ESI-MS Amazon X Ion Trap (Bruker). Fonte: autora.

Ao 434_DHA25 foi adicionada uma massa de 271 g/mol do ligante tacn-Pr-NH₂, levando à massa de 9724Da para 9996 Da (figura 53). Nos controles negativos de 434wt e 434cys, este último sem adição de reativo dibromo, a massa permaneceu a mesma, sem alteração (dados não mostrados). Chalker e colaboradores utilizaram SBLS156C proteína (subtilisina de *Bacillus lentus*), Np276 de *Nostoc punctiforme* e mutante de anticorpos de camelo cAb-Lys3-A104C como substratos para converter Cys em DHA, seguido pela adição de *N*-acetil-glucosamina (BERTOLDO et al., 2017; CHALKER et al., 2011) usaram essa estratégia de modificação de cisteína para identificar com precisão um motivo mediado por água presente na bolsa catalítica, importante para modificações pós-traducionais da proteína tirosina fosfatase A (PtpA) do patógeno *Mycobacterium tuberculosis*. Um conjugado anticorpo-fármaco (ADC) foi construído diretamente através de uma ligação da amina presente no fármaco crizotinib (inibidor da quinase) com o anticorpo Thiomab modificado com DHA (FREEDY et al., 2017). Em ambos os casos, um reagente dibromo foi empregado com sucesso para reações de bis-alkilação-eliminação, seguida por adições de aza-Michael, provando que esta estratégia é uma excelente alternativa para construir moléculas híbridas e estudar PTMs.

Figura 53 – Adição do tacn-Prⁱ-NH₂ ao 434_DHA25

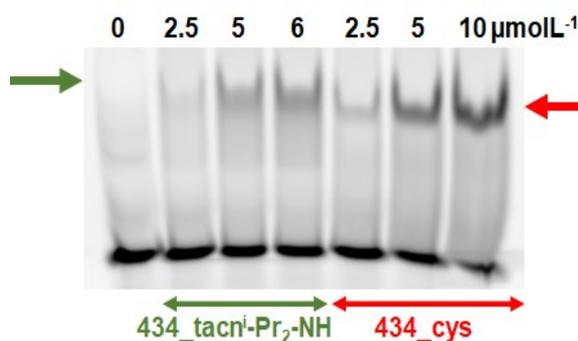
Eixo x se refere à massa (deconvoluída) em número de Daltons. Dados de ESI-MS Amazon X Ion Trap (Bruker). PDB 1R63 e Biorender. Fonte: autora.

No ensaio preliminar de EMSA, a miniproteína ligada ao ligante, renomeada de 434_tacn-Prⁱ-NH₂ apresentou uma discreta redução na migração eletroforética em relação à proteína 434cys não modificada, devido ao incremento da massa do ligante. O mesmo ocorreu após a coordenação de 434_tacn-Prⁱ-NH₂ com o metal (dados não mostrados). Houve ligação do híbrido em 5 e 6 μmolL^{-1} (figura 54). É necessário que estes ensaios (triplicata) sejam repetidos, com uma concentração crescente acima de 6 μmolL^{-1} . Somente com mais pontos é possível realizar a curva e o cálculo de K_D .

Infelizmente, para a modificação desta miniproteína é necessária uma alta concentração molar, para que todas as etapas sejam realizadas de forma sequencial. Os filtros Amicon de 3 kDa 0,5 ml não suportam uma alta concentração de proteína de uma vez, pois pode haver precipitação (AMICON; Millipore), sendo necessário trabalhar com no máximo 350 μL de proteína, para que a diluição seja feita de forma correta, assim como a troca de tampão. Além disso, para cada ponto do EMSA são necessários 5 μL da miniproteína em uma concentração molar 4x maior, para que seja realizada a diluição correta com o tampão e a sonda de DNA. Por não ter sido usado LC-MS, por indisponibilidade da coluna específica e do equipamento, são necessárias várias alíquotas separadas para posterior conferência em ESI-MS, Bradford, EMSA e

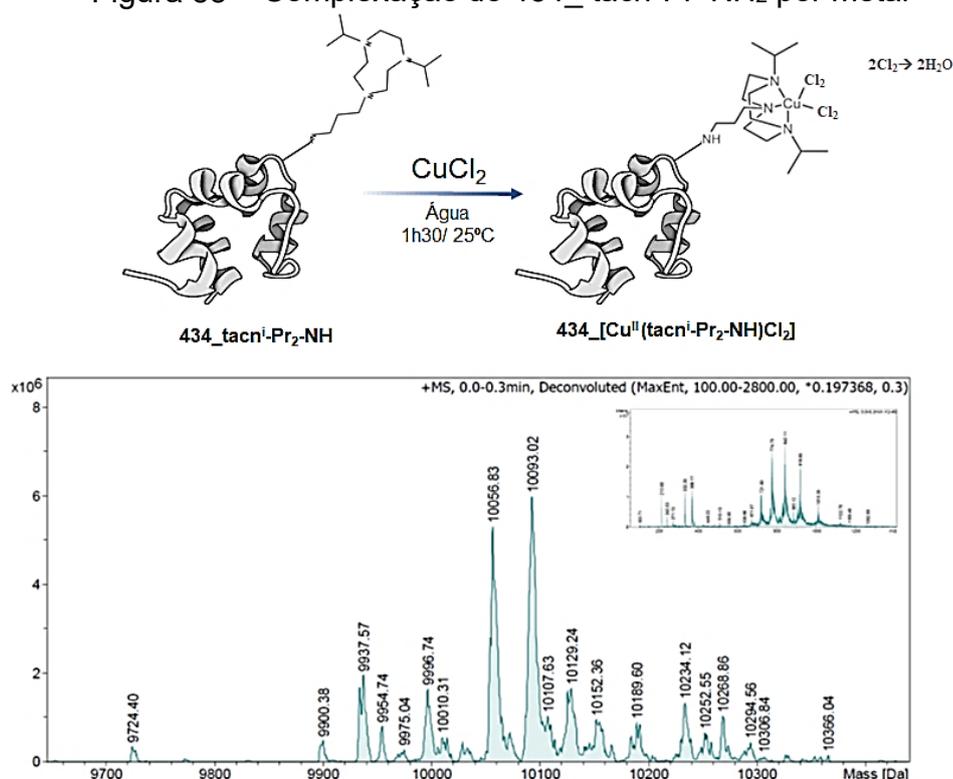
clivagem direta. Por exemplo, para uma correta análise da concentração proteica, é feita uma re-quantificação por Bradford, exigindo um volume de $\sim 40\mu\text{L}$, pois durante cada filtração pode haver uma perda de 5%, conforme manual do fabricante (AMICON; Millipore).

Figura 54- Ensaio de EMSA de $434_ \text{tacn-Pr}^i\text{-NH}_2$



As setas indicam formação $434_ \text{tacn-Pr}^i\text{-NH}_2\text{-DNA}$ com mobilidade reduzida Fonte: autora.

Após a coordenação com cloreto de cobre(II), houve um incremento de aproximadamente 61 Da, referente à massa de Cu^{2+} (pico de 10056 Da) (figura 55). O aumento de ~ 36 Da de 10093 Da, possivelmente indica uma troca dos cloretos por duas águas, algo que ocorre nestes complexos com tacn (DEAL; HENGGE; BURSTYN, 1996; HEGG; BURSTYN, 1998; JOSHI; GRAHAM; SPICCIA, 2015). Esta troca também foi vista pela MSc. Bruna Auras, no complexo metálico **C5** (dados não publicados). Esta concentração usada foi de aproximadamente 25 mmolL^{-1} de CuCl_2 . As etapas de modificação química foram reprodutíveis, sendo realizado mais de 3 vezes, inclusive foram repetidos 1x por pesquisadores da Universidade de Cambridge, orientados pelo professor Dr. Gonçalo Bernardes. O novo híbrido coordenado ao cobre(II) foi chamado de **434_C5**, conforme figura da próxima página.

Figura 55 – Complexação do 434_tacn-Prⁱ-NH₂ por metal

Eixo x se refere à massa (deconvoluída) em número de Daltons. Dados de ESI-MS Amazon X Ion Trap (Bruker). PDB 1R63 e Biorender. Fonte: autora.

A sugestão de não ligar a miniproteína diretamente no complexo metálico, mas primeiro no ligante tacn-Prⁱ-NH₂ e, em seguida, coordenar com o metal veio do professor Dr. Ademir Neves (*in memoriam*) e de toda sua experiência como referência nacional e internacional na área de bioinorgânica. Ele disse diretamente à autora desta tese que haveria uma preferência do metal pelo macrociclo e que explorar esta característica seria interessante, e ligar o complexo metálico diretamente poderia ser mais complicado. Em uma busca por esta informação, foi possível chegar nas constantes de estabilidade (k_1) e (k_2) 15,2 e 12, respectivamente, de tacn ser coordenado por Cu(II), apud (BERNHARDT; LAWRENCE, 1990) enquanto os valores encontrados para histidina ser coordenado por Cu(II) foram de 10,1 e 8, respectivamente apud (SUNDBERG, 1974).

Além disto, é bastante conhecido na literatura a importância do efeito macrocíclico de ligantes tacn no desenvolvimento de miméticos, como biosítios, nucleases artificiais (complexos metálicos) e sensores para biomoléculas (JOSHI; GRAHAM; SPICCIA, 2015). Soler e colaboradores (2015) utilizaram uma estratégia parecida à desta tese, exploraram essa característica macrocíclica e utilizaram o

próprio conjugado peptídico ligante de metal (3 e 4) contendo os tetrapeptídeos LKKL e fizeram a metalação com $\text{Cu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ obtendo 2 complexos, 1_{Cu} e 2_{Cu} (SOLER et al., 2015).

Para o híbrido, testes de espectrofotometria de UV-Vis seriam importantes para a avaliação da coordenação do cobre (II) (PFENNIG, 2015; ZENKOVA, 2004) no macrociclo de 434_tacn-Prⁱ-NH₂, diferenciando da coordenação com a cauda de histidina. A formação do complexo Cu(II)-L-histidina e de suas espécies depende de vários fatores, interagindo em soluções aquosas próximo de pH fisiológico na relação molar 1:2, além de interagir com aminoácidos como os tripeptídeos Asp-Ala-His-*N*-metil amida (DESCHAMPS et al., 2005). Cu(II)-L-histidina livre é capaz de clivar DNA plasmidial em temperatura de 37°C (forma I → forma II) preferencialmente 5'GT'3 em uma taxa de 0,76 h⁻¹, entretanto é necessária uma concentração de 1 mmolL⁻¹ (5 mM Tris-HCl, 5 mM NaCl; pH 6,0), pH 6,0; temperatura de 37°C (REN et al., 2000). De qualquer forma, o ideal seria remover a cauda de histidina das miniproteínas 434wt e 434cys. Análises *in silico* em programa GOLD também poderiam auxiliar a entender a coordenação (SCIORTINO et al., 2018; VERDONK et al., 2003).

Inicialmente, houve uma preocupação do Cu (II) não coordenar com sais do tampão fosfato de sódio e por isso a troca para água, no entanto, é notado visualmente presença de um pouco de precipitado branco no fundo do tubo, que pode ocorrer também na presença de excesso de metal (LOVRIEN; MATULIS, 2001) e isto provavelmente leva à uma perda de concentração do híbrido (dados não mostrados). Uma alternativa poderia ser, empregar o tampão HEPES pH 8,0 em baixa concentração (FERREIRA et al., 2015; MASH et al., 2003), usado para complexos metálicos, como **C1-C5**. Outra estratégia seria ligar de forma direta o complexo metálico **C5** ao 434_DHA25 por Aza-Michael e comparar o híbrido com o controle negativo 434wt. Este último por não conter resíduo de cisteína, não pode ser modificado quimicamente pela estratégia de bis-alquilação-eliminação.

Ademais, é importante citar que 434cys foi expressa em bactéria utilizando meio de cultivo em frascos de 250 ml, em um total de 1L por vez e não em um biorreator. A proteína foi purificada manualmente, por indisponibilidade do FPLC que consta no laboratório. Ou seja, é necessário pelo menos mais que o dobro de reação (600 µL) para as etapas de modificações proteica, sendo que a purificação de 1L de rende 2, no máximo 3 ensaios de modificações químicas das miniproteínas por vez. Além disso, é necessário verificar se não há excedente de ligante e do metal, para

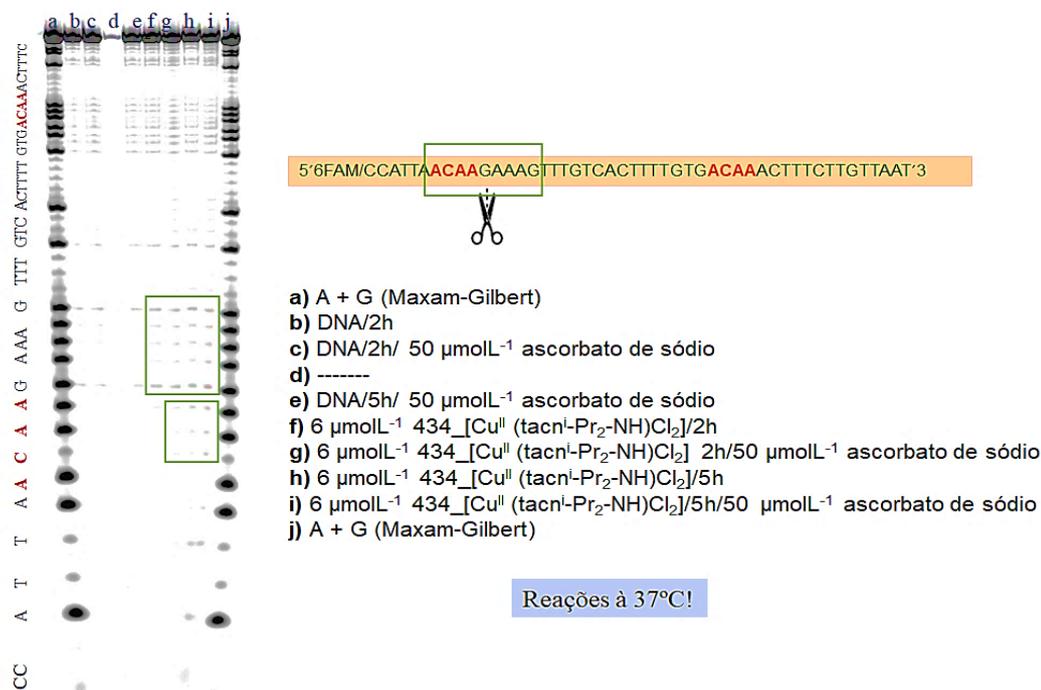
que não ocorra formação do complexo metálico **C5** não ligado à proteína. Ou seja, isto torna o processo sequencial bastante oneroso, exigindo muito cuidado em cada etapa. Portanto, é necessária a otimização de algumas etapas finais do processo de obtenção do híbrido e escalonamento.

10.1.5 Clivagem direta do oligonucleotídeo 5'ACAA'3 pelo híbrido 434_C5

Apesar dos ensaios de clivagem direta de **434_C5**, vide 434_[Cull (tacn¹-Pr₂-NH)Cl₂] (figura 56), não terem sido finalizados em triplicata, os dados preliminares indicam clivagem na concentração de 6 μmolL⁻¹ (t= 2h, T= 37°C), próximo ao meio sítio da esquerda (região específica 5'ACAAGAAG'3), que se refere ao sítio operador OR₁ do repressor *cI* do fago 434. À medida que o tempo aumenta para 5h e há adição de ascorbato de sódio, potencializando o mecanismo oxidativo de clivagem, a clivagem passa a ser mais específica, exatamente no sítio específico 5'ACAA'3. A clivagem inespecífica no meio sítio da direita, muito próximo do *hairpin* pode ser indicativo da coordenação do cobre com a cauda de histidina (clivagem próximo de 5'GT'3), conforme citado anteriormente, além de presença de resquício de **C5** na solução (dados não mostrados). A utilização de controles negativos dos ensaios de modificação química (434wt), assim como emprego de mais uma sonda de DNA, inespecífica ao **434_C5**, podem auxiliar na comprovação destas informações citadas.

Figura 56 encontra-se na próxima página.

Figura 56 - Clivagem direta do oligonucleotídeo 5'ACAA'3 por **434_C5**



Fonte: autora.

Recentemente, Roelfes (2019) desenvolveu uma nova plataforma baseada na proteína LmrR, um fator de transcrição regulador de resistências multidroga (MDR) em *Lactococcus lactis*, homodímero, que possui um domínio N-terminal HTH β -winged, e C-terminal envolvido na oligomerização. Esta proteína possui um grande bolsão hidrofóbico para ligação e reconhecimento de agentes externos, como fármacos. Nesta proteína, alguns resíduos de aminoácidos foram trocados por cisteínas com o intuito de alquilar alguns ligantes bromoacetamida-substituídos coordenados a metais com o intuito de verificar possível atividade de metaloenzima artificial, neste caso catecol-dioxigenase (ROELFES, 2019).

Mikutis e colaboradores (2020) desenvolveram uma ferramenta inovadora de edição de RNA, através do sequestro da atividade de RNAs metiltransferases naturais, degradando sequências de RNA metilado através de reações click, ou seja, uma estratégia totalmente original que vai auxiliar, principalmente, em estudos sobre translação seja em *in vitro* ou em células (MIKUTIS et al., 2020).

Diante da formação dos biofilmes de bactérias patogênicas com multi-resistência aos antibióticos, nas quais as nucleases naturais são um fator de virulência, torna cada vez mais necessário contornar a regulação e o mecanismo SOS

bacteriano, seja através de inibidores, enzimas artificiais ou vacinas (RONCARATI; SCARLATO; VANNINI, 2022; SHARMA et al., 2019). Diante disto, este novo modelo de bioconjugado como proposta de nuclease artificial sítio-específico enfatiza a necessidade de novos biomiméticos atuarem especificamente na regulação de bactérias e vírus, atuando como antimicrobianos e antivirais. Portanto, a avaliação de possível efeito antimicrobiano de **434_C5** em *E. coli*, através de cura (TREVORS, 1986) de plasmídeo recombinante contendo sítios operadores específicos para repressor *cI* seria uma proposta futura.

E por último, vale enfatizar que em 2020 duas pesquisadoras Emmanuelle Charpentier e Jennifer Doud receberam o prêmio Nobel de Química por desenvolver uma técnica de edição gênica, denominada de CRISPR-Cas9, onde se é utilizado um RNA-guia (CRISPR) e uma endonuclease Cas9. Ou seja, uma técnica inovadora para clivar ácido nucleico e editar genomas de forma específica (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014; JINEK et al., 2012; NOBEL PRIZE, 2023). Portanto, isto indica a relevância para a sociedade de estudar nucleases no cenário atual.

11 CONCLUSÃO

O segundo capítulo desta tese mostrou que proteínas ligadoras de DNA motivos HTH com estrutura alfa-hélice que não contém resíduos de cisteína, poderiam ser mutadas, bioconjugadas e empregadas no estudo de enzimas artificiais. A mutação de Gly25 para Cys25 das miniproteínas recombinantes (434wt → 434cys) não alterou drasticamente a ligação ao sítio específico OR₁ da sonda de DNA 5'ACAA'3 construída, nos ensaios de EMSA. Isto permitiu seguir adiante no desenvolvimento de uma nuclease artificial química. Modificações químicas de 434cys foram reprodutíveis, permitindo a formação de um novo híbrido **434_C5**. Apesar da necessidade de repetição (em triplicata) de alguns testes como EMSA e clivagem direta do **434_C5**, foi possível verificar em ensaios preliminares atividade específica de clivagem próximo da sequência 5'ACAA'3 do sítio OR₁ da sonda construída. Entretanto, escalonamento e otimização de algumas etapas anteriores, importantes para a síntese do **434_C5**, são necessárias. Deste modo, será possível a publicação em revistas de química inorgânica biológica.

Até o momento não existe nenhum trabalho semelhante a este, em relação aos três parâmetros escolhidos: miniproteína x técnica de bioconjugação x complexo metálico escolhido. O nível de pesquisa deste segundo capítulo começa a convergir aos poucos com o caminho inicial percorrido pelos maiores grupos de pesquisa na área de miniproteínas, nucleases artificiais sítio-específicos e bioconjugados, liderados respectivamente, por Alanna Schepartz (Universidade da Califórnia – EUA), José L. Mascareñas (Universidade de Santiago de Compostela - ES) e Gonçalo Bernardes (Universidade de Cambridge/ Lisboa – EN/PT). No entanto, é necessário que no futuro o desenvolvimento de novas moléculas seja racional e com melhor planejamento prévio.

Deste modo, a inovação deste segundo capítulo da tese trouxe à autora o prêmio de melhor poster no VII Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry (LABIC 2021). O certificado encontra-se no anexo A.

REFERÊNCIAS

- AAIJ, C.; BORST, P. The gel electrophoresis of DNA. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis**, v. 269, n. 2, p. 192–200, 10 maio 1972.
- ADAMS, M. J. et al. Structure of Rhombohedral 2 Zinc Insulin Crystals, **Nature**, 1969.
- AGGARWAL, A. K. et al. Recognition of a DNA Operator by the Repressor of Phage 434: A View at High Resolution. **Science**, v. 242, n. 4880, p. 899–907, 11 nov. 1988.
- ANDREZÁLOVÁ, L.; ORSZÁGHOVÁ, Z. Covalent and noncovalent interactions of coordination compounds with DNA: An overview. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 1 dez. 2021.
- ALBERTS, B. et al. Biologia molecular da célula. **Biologia Molecular da Célula**, 2017.
- ANDERSON, J.; PTASHNE, M.; HARRISON, S. C. Cocrystals of the DNA-binding domain of phage 434 repressor and a synthetic phage 434 operator. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 5, p. 1307–1311, mar. 1984.
- ANJOMSHOA, M.; AMIRHEIDARI, B. Nuclease-like metalloscissors: Biomimetic candidates for cancer and bacterial and viral infections therapy. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 458, p. 214417, 1 maio 2022.
- AURAS, B. L. et al. Meso-Mono-[4-(1,4,7-triazacyclononyl)]-tri(phenyl)porphyrin and the respective zinc(ii)-complex: Complete characterization and biomolecules binding abilities. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 15, n. 4, p. 564–579, 2016.
- AURAS, B. L. **Novas hidrolases sintéticas derivadas de 1,4,7-triazaciclononano: efeitos de segunda esfera de coordenação**. Dissertação—Florianópolis-SC: Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.
- AUSUBEL, F. M. **Short protocols in molecular biology : a compendium of methods from Current protocols in molecular biology**. 3rd ed. ed. New York: Wiley, 1995.
- AZZARITO, V. et al. Inhibition of α -helix-mediated protein–protein interactions using designed molecules. **Nature Chemistry** **2013 5:3**, v. 5, n. 3, p. 161–173, 20 fev. 2013.
- BAKER, E. G. et al. Miniprotein Design: Past, Present, and Prospects. **Accounts of Chemical Research**, v. 50, n. 9, p. 2085–2092, 19 set. 2017.
- BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G. Antitumour Complexes and DNA Interactions and their Tools of Analysis: an Approach to Metalintercalators. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 1998–2016, 2015.

BATEMAN, A. et al. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. D1, p. D523–D531, 6 jan. 2023.

BELL, C. E. et al. Crystal Structure of the λ Repressor C-Terminal Domain Provides a Model for Cooperative Operator Binding. **Cell**, v. 101, n. 7, p. 801–811, jun. 2000.

BENFIELD, A. P. et al. Targeted generation of DNA strand breaks using pyrene-conjugated triplex-forming oligonucleotides. **Biochemistry**, v. 47, n. 23, p. 6279–6288, 10 jun. 2008.

BERNADOU, J. et al. Potassium monopersulfate and a water-soluble manganese porphyrin complex, [Mn(TMPyP)](OAc)₅, as an efficient reagent for the oxidative cleavage of DNA. **Biochemistry**, v. 28, n. 18, p. 7268–7275, 1 set. 1989.

BERNARDES, G. J. L. et al. Facile Conversion of Cysteine and Alkyl Cysteines to Dehydroalanine on Protein Surfaces: Versatile and Switchable Access to Functionalized Proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 15, p. 5052–5053, 1 abr. 2008.

BERNHARDT, P. V.; LAWRENCE, G. A. Complexes of polyaza macrocycles bearing pendent coordinating groups. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 104, n. 2, p. 297–343, ago. 1990.

BERTOLDO, J. B. et al. A Water-Bridged Cysteine-Cysteine Redox Regulation Mechanism in Bacterial Protein Tyrosine Phosphatases. **Chem**, v. 3, n. 4, p. 665–677, 12 out. 2017.

BIORENDER. **Scientific Image and Illustration Software | BioRender**. Disponível em: <<https://www.biorender.com/>>. Acesso em: 9 set. 2023.

BLACKMAN, A. G.; GAHAN, L. R. **Metal-coordinated Hydroxide as a Nucleophile: a Brief History**. **Zeitschrift für Anorganische und Allgemeine Chemie**Wiley-VCH Verlag, , 2 ago. 2018.

BOGA, S. et al. Sequence-Specific DNA Recognition with Designed Peptides. **European Journal of Organic Chemistry**, 23 jan. 2018.

BOLANOS-GARCIA, V. M.; DAVIES, O. R. Structural analysis and classification of native proteins from E. coli commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1760, n. 9, p. 1304–1313, 1 set. 2006.

BORST, P. Ethidium DNA agarose gel electrophoresis: how it started. **IUBMB life**, v. 57, n. 11, p. 745–747, nov. 2005.

BOUTUREIRA, O.; BERNARDES, G. J. L. **Advances in chemical protein modification**. **Chemical Reviews**American Chemical Society, , 11 mar. 2015.

BURKHARD, P. et al. Design of a minimal protein oligomerization domain by a structural approach. **Protein Science**, v. 9, n. 12, p. 2294–2301, 1 jan. 2000.

BURKHARD, P.; IVANINSKII, S.; LUSTIG, A. Improving Coiled-coil Stability by Optimizing Ionic Interactions. **Journal of Molecular Biology**, v. 318, n. 3, p. 901–910, 3 maio 2002.

BUSHMAN, F. D. The Bacteriophage 434 Right Operator Roles of OR1, OR2 and OR3. **Journal of Molecular Biology**, v. 230, n. 1, p. 28–40, mar. 1993.

CAMARGO, T. P. et al. Second-Sphere Effects in Dinuclear FeII/ZnII Hydrolase Biomimetics: Tuning Binding and Reactivity Properties. **Inorganic Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 187–203, 2 jan. 2018.

CAMPBELL, M.; FARREL, S. **Bioquímica**, 8 ed, 2015.

CARLSON, P. A.; KOUDELKA, G. B. Expression, purification, and functional characterization of the carboxyl-terminal domain fragment of bacteriophage 434 repressor. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 22, p. 6907–6914, nov. 1994.

CARVALHO, C.; RICCI, G.; AFFONSO, R. **Guia de Práticas em Biologia Molecular**, 2010.

CHALKER, J. M. et al. **Chemical modification of proteins at cysteine: Opportunities in chemistry and biology**. **Chemistry - An Asian Journal**, 4 maio 2009.

CHALKER, J. M. et al. Methods for converting cysteine to dehydroalanine on peptides and proteins. **Chemical Science**, v. 2, n. 9, p. 1666–1676, set. 2011.

CHALKER, J. M.; BERNARDES, G. J. L.; DAVIS, B. G. A “tag-and-modify” approach to site-selective protein modification. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 9, p. 730–741, 20 set. 2011.

CHARGAFF, E. Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. **Experientia**, v. 6, n. 6, p. 201–209, jun. 1950.

CHIN, J. W.; SCHEPARTZ, A. **Concerted evolution of structure and function in a miniature protein**. **Journal of the American Chemical Society**, 2001.

CIUBOTARU, M. et al. DNA-induced conformational changes in bacteriophage 434 repressor. **Journal of molecular biology**, v. 294, n. 4, p. 859–873, 10 dez. 1999.

CLARK, D.; PAZDERNIK, N.; MCGEHEE, M. **Molecular Biology**. v. Third edition, 2018.

COHEN, S. N. et al. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 11, p. 3240, 1973.

CROOK, Z. R.; NAIRN, N. W.; OLSON, J. M. Miniproteins as a Powerful Modality in Drug Development. **Trends in biochemical sciences**, v. 45, n. 4, p. 332–346, 1 abr. 2020.

DALECKI, A. G.; CRAWFORD, C. L.; WOLSCHENDORF, F. Copper and Antibiotics: Discovery, Modes of Action, and Opportunities for Medicinal Applications. **Advances in Microbial Physiology**, v. 70p. 193–260, 2017.

DAVIES, C. L.; DUX, E. L.; DUHME-KLAIR, A. K. Supramolecular interactions between functional metal complexes and proteins. **Dalton Transactions**, n. 46, p. 10141–10154, 2009.

DE ALMEIDA, V. R. et al. In vitro and in vivo activity of a new unsymmetrical dinuclear copper complex containing a derivative ligand of 1,4,7-triazacyclononane: Catalytic promiscuity of $[\text{Cu}_2(\text{L})\text{Cl}_3]$. **Dalton Transactions**, v. 42, n. 19, p. 7059–7073, 2013.

DEAL, K. A.; BURSTYN, J. N. Mechanistic Studies of Dichloro(1,4,7-triazacyclononane)copper(II)-Catalyzed Phosphate Diester Hydrolysis. **Inorganic Chemistry**, v. 35, n. 10, p. 2792–2798, 1 jan. 1996.

DEAL, K. A.; HENGGE, A. C.; BURSTYN, J. N. Characterization of transition states in dichloro(1,4,7-triazacyclononane)copper(II)-catalyzed activated phosphate diester hydrolysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 7, p. 1713–1718, 21 fev. 1996.

DECK, K. M.; TSENG, T. A.; BURSTYN, J. N. Triisopropyltriazacyclononane Copper(II): An Efficient Phosphodiester Hydrolysis Catalyst and DNA Cleavage Agent. **Inorganic Chemistry**, v. 41, n. 4, p. 669–677, 1 fev. 2002.

DESCHAMPS, P. et al. The saga of copper(II)–l-histidine. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 249, n. 9–10, p. 895–909, 1 maio 2005.

DONNER, A. L.; PAA, K.; KOUDELKA, G. B. Carboxyl-terminal domain dimer interface mutant 434 repressors have altered dimerization and DNA binding specificities. **Journal of Molecular Biology**, v. 283, n. 5, p. 931–946, 13 nov. 1998.

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, 28 nov. 2014.

DREW, E. D.; JANES, R. W. PDBMD2CD: providing predicted protein circular dichroism spectra from multiple molecular dynamics-generated protein structures. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. W1, p. W17–W24, 2 jul. 2020.

DUPUREUR, C. M. Roles of metal ions in nucleases. **Current opinion in chemical biology**, v. 12, n. 2, p. 250–255, abr. 2008.

EL-ANEED, A.; COHEN, A.; BANOUB, J. Mass spectrometry, review of the basics: Electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. **Applied Spectroscopy Reviews**, 2009.

ERXLEBEN, A. Interactions of copper complexes with nucleic acids. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 360, p. 92-121, 1 abr. 2018.

FANTONI, N. Z.; BROWN, T.; KELLETT, A. DNA-Targeted Metallodrugs: An Untapped Source of Artificial Gene Editing Technology. **ChemBioChem**, p. 2184-2205, 1 jul. 2021.

FENTON, H. J. H. LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 65, n. 0, p. 899–910, 1894.

FERREIRA, C. M. H. et al. (Un)suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions – a review. **RSC Advances**, v. 5, n. 39, p. 30989–31003, 30 mar. 2015.

FISHER SCIENTIFIC. **Thermo Scientific Chemicals Polyethylene Glove Bag 17 x 17 x 11 in., 1 Ea. Thermo Scientific Chemicals Polyethylene Glove Bag**. Disponível em: <https://www.fishersci.fi/shop/products/alfa-aesar-polyethylene-glove-bags/11443880>. Acesso em: 10 set. 2023.

FRANKLIN, R. E.; GOSLING, R. G. Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 740–741, 25 abr. 1953.

FRANKLIN, S. J.; WELCH, J. T. THE HELIX-TURN-HELIX AS A SCAFFOLD FOR CHIMERIC NUCLEASE DESIGN. **Comments on Inorganic Chemistry**, v. 26, n. 3–4, p. 127–164, maio 2005.

FREEDY, A. M. et al. Chemoselective Installation of Amine Bonds on Proteins through Aza-Michael Ligation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 139, n. 50, p. 18365–18375, 20 dez. 2017.

GABRIEL, P. et al. A heterotrinnuclear bioinspired coordination complex capable of binding to DNA and emulation of nuclease activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 226, 1 jan. 2022.

GALINDO-MURILLO R.; CHEATHAM T.E. Ethidium bromide interactions with DNA: an exploration of a classic DNA-ligand complex with unbiased molecular dynamics simulations. **Nucleic Acids Research**, v. 49, p. 3735-3747, 19 Apr 2021:

GARCIA GONZALEZ, J.; HERNANDEZ, F. J. Nuclease activity: an exploitable biomarker in bacterial infections. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 22, n. 3, p. 265–294, 2022.

GATES, K. S. An overview of chemical processes that damage cellular DNA: spontaneous hydrolysis, alkylation, and reactions with radicals. **Chemical research in toxicology**, v. 22, n. 11, p. 1747–1760, 16 nov. 2009.

GEOGHEGAN, K. F. et al. Spontaneous alpha-N-6-phosphogluconoylation of a “His tag” in Escherichia coli: the cause of extra mass of 258 or 178 Da in fusion proteins. **Analytical biochemistry**, v. 267, n. 1, p. 169–184, 1 fev. 1999.

GONZALEZ-GARCIA, J.; VILAR, R. Supramolecular Principles for Small Molecule Binding to DNA Structures. **Comprehensive Supramolecular Chemistry II**, v. 4, p. 39–70, 1 jan. 2017.

GHOSH, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. **Bioorganic Chemistry**, 1 jul. 2019.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876, jan. 2006.

GRIMME, S. Do special noncovalent π - π stacking interactions really exist? **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 47, n. 18, p. 3430–3434, 21 abr. 2008.

GUCKIAN, K. M. et al. Experimental Measurement of Aromatic Stacking Affinities in the Context of Duplex DNA. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 34, p. 8182–8183, 1 jan. 1996.

HALL, B. M.; LEFEVRE, K. R.; CORDES, M. H. J. Sequence Correlations between Cro Recognition Helices and Cognate OR Consensus Half-sites Suggest Conserved Rules of Protein–DNA Recognition. **Journal of Molecular Biology**, v. 350, n. 4, p. 667–681, 22 jul. 2005.

HARRISON, S. Molecular characteristics of the regulatory switch in phages 434 and lambda” in Transcriptional Regulation. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 17, p. 449–473, 1992.

HEFFLER, M. A.; WALTERS, R. D.; KUGEL†, J. F. Using electrophoretic mobility shift assays to measure equilibrium dissociation constants: GAL4-p53 binding DNA as a model system. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 40, n. 6, p. 383–387, nov. 2012.

HEGG, E. L.; BURSTYN, J. N. Copper(II) Macrocycles Cleave Single-Stranded and Double-Stranded DNA under Both Aerobic and Anaerobic Conditions. **Inorganic Chemistry**, v. 35, n. 26, p. 7474–7481, 1996.

HEGG, E. L.; BURSTYN, J. N. Toward the development of metal-based synthetic nucleases and peptidases: a rationale and progress report in applying the principles of coordination chemistry. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 173, p. 133-165, 1998.

HIGBY, D.J. et al. Diaminodichloroplatinum: A phase I study showing responses in testicular and other tumors. **Cancer**, 33, n. 5, p. 1219-1225, 1974.

HOLUB, J. M. Small Scaffolds, Big Potential: Developing Miniature Proteins as Therapeutic Agents. **Drug development research**, v. 78, n. 6, p. 268–282, 1 set. 2017.

HORMANN, J.; STRELLER, S.; KULAK, N. Synthesis and Evaluation of Artificial DNA Scissors: An Interdisciplinary Undergraduate Experiment. **Journal of Chemical Education**, v. 95, n. 10, p. 1848–1855, 9 out. 2018.

IMMING P, SINNING C, MEYER A. Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. **Nat Rev Drug Discov**. 2006 Oct;5(10):821-34. doi: 10.1038/nrd2132. Erratum in: *Nat Rev Drug Discov*. 2007 Feb;6(2):126. PMID: 17016423.

IWAI, H.; WIDER, G.; WÜTHRICH, K. Letter to the Editor: NMR Structure of a Variant 434 Repressor DNA-binding Domain Devoid of Hydroxyl Groups. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 29, n. 3, p. 395–398, jul. 2004.

JIANG, Q. et al. Design of artificial metallonucleases with oxidative mechanism. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 251, n. 15–16, p. 1951–1972, 1 ago. 2007.

JINEK, M. et al. A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. **Science**, v. 337, n. 6096, p. 816–821, 17 ago. 2012.

JOSHI, T.; GRAHAM, B.; SPICCIA, L. Macrocyclic Metal Complexes for Metalloenzyme Mimicry and Sensor Development. **Accounts of Chemical Research**, v. 48, n. 8, p. 2366–2379, 5 ago. 2015.

KHAN ACADEMY. **Gel Electrophoresis**. Disponível em: <<https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/gel-electrophoresis>> 01 Maio 2023.

KEYEL, P. A. Dnases in health and disease. **Developmental Biology**, 1 set. 2017.

KIM, S. K.; NORDÉN, B. Methyl green. A DNA major-groove binding drug. **FEBS letters**, v. 315, n. 1, p. 61–64, 1993.

KIM, S. et al. PubChem 2023 update. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. D1, p. D1373–D1380, 6 jan. 2023.

KLEVAY, L. M. Cardiovascular Disease from Copper Deficiency—A History. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 2, p. 489S-492S, 1 fev. 2000.

KOUDELKA, G. B. **Recognition of DNA structure by 434 repressor** **Nucleic Acids Research**. [s.l: s.n.].

KOUDELKA, G. B.; DONNER, A. L.; CIUBOTARU, M. Role of the N- and C- terminal dimer interfaces of 434 repressor in recognizing sequence-dependent DNA structure. **Journal of biomolecular structure & dynamics**, v. 17 Suppl 1, p. 135– 139, 2000.

KRALL, N. et al. Site-selective protein-modification chemistry for basic biology and drug development. **Nature Chemistry**, v.02, p.103-113, 1 fev. 2016.

KUZIEL, W. A.; TUCKER, P. W. Determination of vector: insert junctions in lambda gt10 cDNAs that do not recut with EcoRI. Nucleotide sequence of the lambda imm434

HindIII-EcoRI DNA fragment encoding part of the *cl* protein. **Nucleic acids research**, v. 15, n. 7, p. 3181, 10 abr. 1987.

LEON, I. et al. Vanadium, Ruthenium and Copper Compounds: A New Class of Nonplatinum Metallo drugs with Anticancer Activity. **Current medicinal chemistry**, v. 24, n. 2, p. 112–148, 24 ago. 2017.

LEWIS, J. C. Artificial metalloenzymes and metallopeptide catalysts for organic synthesis. **ACS Catalysis**, v. 3, n. 12, p. 2954–2975, 6 dez. 2013.

LI, Y. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: A review. **Protein Expression and Purification**, v. 80, n. 2, p. 260–267, 1 dez. 2011.

LIAO, C. et al. Pathogen-Derived Nucleases: An Effective Weapon for Escaping Extracellular Traps. **Frontiers in immunology**, v. 13, 5 jul. 2022.

LIAO, Y.-D. et al. Removal of N-terminal methionine from recombinant proteins by engineered *E. coli* methionine aminopeptidase. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 13, n. 7, p. 1802–1810, jul. 2004.

LIBRETEXTS. 2.8.1: **Pseudo-1st-order Reactions Chemistry LibreTexts**. Disponível em: <[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Kinetics/02%3A_Reaction_Rates/2.08%3A_Second-Order_Reactions/2.8.01%3A_Pseudo-1st-order_reactions](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Kinetics/02%3A_Reaction_Rates/2.08%3A_Second-Order_Reactions/2.8.01%3A_Pseudo-1st-order_reactions)>. Acesso em: 10 set. 2023.

LIU, M. et al. Cu(ii)-TACN complexes selectively induce antitumor activity in HepG-2 cells via DNA damage and mitochondrial-ROS-mediated apoptosis. **Dalton Transactions**, v. 49, n. 1, p. 114–123, 2019a.

LOVRIEN, R. E.; MATULIS, D. Selective precipitation of proteins. **Current protocols in protein science**, v. Chapter 4, n. 1, mar. 2001.

MACEDI, E. et al. The design of TACN-based molecular systems for different supramolecular functions. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 407, p. 213151, 15 mar. 2020.

MANCHESTER, K. L. Use of UV Methods for Measurement of Protein and Nucleic Acid Concentrations. **Biotechniques**, v. 20, n. 6, p. 968–970, 2 ago. 2018.

MANCIN, F. et al. Artificial metallonucleases. **Chemical Communications**, 28 maio 2005.

MANCIN, F.; SCRIMIN, P.; TECILLA, P. Progress in artificial metallonucleases. **Chemical Communications**, v. 48, n. 45, p. 5545–5559, 9 maio 2012.

MANDEL, M.; HIGA, A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. **Journal of molecular biology**, v. 53, n. 1, p. 159–162, 14 out. 1970.

MARIAPPAN, M.; MAIYA, B. G. Effects of Anthracene and Pyrene Units on the Interactions of Novel Polypyridylruthenium(II) Mixed-Ligand Complexes with DNA. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2005, n. 11, p. 2164–2173, 1 jun. 2005.

MASH, H. E. et al. Complexation of copper by zwitterionic aminosulfonic (good) buffers. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 3, p. 671–677, 1 fev. 2003.

MAXAM, A. M.; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 2, p. 560–564, fev. 1977.

MCCABE, B. C.; PAWLOWSKI, D. R.; KOUDELKA, G. B. The Bacteriophage 434 Repressor Dimer Preferentially Undergoes Autoproteolysis by an Intramolecular Mechanism. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 16, p. 5624, ago. 2005.

MCGINNIS, R. J. et al. A monomeric mycobacteriophage immunity repressor utilizes two domains to recognize an asymmetric DNA sequence. **Nature communications**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2022.

MEDICI, S. et al. Noble metals in medicine: Latest advances. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 284, p. 329–350, 1 fev. 2015.

MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149–2154, 1 jul. 1963.

MICSONAI, A.; BULYÁKI, É.; KARDOS, J. BeStSel: From Secondary Structure Analysis to Protein Fold Prediction by Circular Dichroism Spectroscopy. **Methods in molecular biology**, v. 2199, p. 175–189, 2021.

MIKUTIS, S. et al. meCLICK-Seq, a Substrate-Hijacking and RNA Degradation Strategy for the Study of RNA Methylation. **ACS Central Science**, v. 6, n. 12, p. 2196–2208, 23 dez. 2020.

MILES, A. J.; JANES, R. W.; WALLACE, B. A. Tools and methods for circular dichroism spectroscopy of proteins: a tutorial review. **Chemical Society Reviews**, v. 50, n. 15, p. 8400, 8 ago. 2021.

MONDRAGÓN, A. et al. Structure of the amino-terminal domain of phage 434 repressor at 2.0 Å resolution. **Journal of molecular biology**, v. 205, n. 1, p. 189–200, 5 jan. 1989.

MOSQUERA, J. et al. Ruthenium bipyridyl complexes as photocleavable dimerizers: deactivation of DNA-binding peptides using visible light. **Chemical Communications**, v. 50, n. 75, p. 10975–10978, 2014.

MULLER, P. Glossary of terms used in physical organic chemistry (IUPAC Recommendations 1994) **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, n. 5, p. 1077–1184, 1994.

NEGI, S. et al. The past, present, and future of artificial zinc finger proteins: design strategies and chemical and biological applications. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, 1 abr. 2023.

NELSON, D.; COX, M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed, 2014.

NERI, D.; BILLETER, M.; WÜTHRICH, K. Determination of the nuclear magnetic resonance solution structure of the DNA-binding domain (residues 1 to 69) of the 434 repressor and comparison with the X-ray crystal structure. **Journal of Molecular Biology**, v. 223, n. 3, p. 743–767, 5 fev. 1992.

NEVES, A. et al. An Unprecedented Fe^{III} (μ -OH)Zn^{II} Complex that Mimics the Structural and Functional Properties of Purple Acid Phosphatases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 24, p. 7486–7487, 1 jun. 2007.

NOBEL PRIZE. **Jennifer A. Doudna – Facts – 2020 - NobelPrize.org**. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/doudna/facts/>>. Acesso em: 9 set. 2023a.

NOBEL PRIZE. **Emmanuelle Charpentier – Facts – 2020 - NobelPrize.org**. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/charpentier/facts/>>. Acesso em: 9 set. 2023b.

NOMURA, W. et al. Multimerized CHR-derived peptides as HIV-1 fusion inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 15, p. 4452–4458, 1 ago. 2013.

NURK, S. et al. The complete sequence of a human genome. **Science**, v. 376, n. 6588, p. 44–53, 1 abr. 2022.

OPPENHEIM, A. B. et al. Switches in Bacteriophage Lambda Development. **Annual Review of Genetics**, v. 39, n. 1, p. 409–429, 1 dez. 2005.

OSÓRIO, R. E. H. M. B. et al. Synthesis, magnetostructural correlation, and catalytic promiscuity of unsymmetric dinuclear copper(II) complexes: models for catechol oxidases and hydrolases. **Inorganic chemistry**, v. 51, n. 3, p. 1569–1589, 6 fev. 2012.

PAGES, B. J. et al. Metal complex interactions with DNA. **Dalton Transactions**, Royal Society of Chemistry, 28 fev. 2015.

PAPADAKOS, G.; WOJDYLA, J. A.; KLEANTHOUS, C. Nuclease colicins and their immunity proteins. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 45, n. 1, p. 57–103, 16 fev. 2012.

PERVUSHIN, K. et al. Structural Role of a Buried Salt Bridge in the 434 Repressor DNA-binding Domain The independently folding 63-residue N-terminal DNA-binding domain of the 434 repressor, 434(1-63), contains a buried Arg10-Glu35 salt bridge. **Journal of Molecular Biology**, v.264, p.1002-1012, 1996.

PFENNIG, B. **Principles of inorganic chemistry**, 2015.

PUNEKAR, N. S. **ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms**. Springer Singapore, 2018.

RCSB PDB. **3D PFV: 1R63**. Disponível em <<https://www.rcsb.org/3d-sequence/1R63?assemblyId=0>>. Acesso em: 10 set. 2023.

REEK, J. N. H. et al. Transition Metal Catalysis Controlled by Hydrogen Bonding in the Second Coordination Sphere. **Chemical Reviews**, v. 122, n. 14, p. 12308, 7 jul. 2022.

REN, R. et al. A simple Copper(II)-L-histidine system for efficient hydrolytic cleavage of DNA. **Inorganic Chemistry**, v. 39, n. 24, p. 5454–5463, 27 nov. 2000.

RIBEIRO, M. C. M. **Genética molecular**. UFSC, 2009.

ROBERTS, R. J. How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2005.

RODGERS, D. W.; HARRISON, S. C. The complex between phage 434 repressor DNA-binding domain and operator site OR3: structural differences between consensus and non-consensus half-sites. **Structure**, v.1. p. 227-240, 1993.

ROELFES, G. LmrR: A Privileged Scaffold for Artificial Metalloenzymes. **Accounts of Chemical Research**, v. 52, n. 3, p. 545–556, 19 mar. 2019.

RONCARATI, D.; SCARLATO, V.; VANNINI, A. Targeting of Regulators as a Promising Approach in the Search for Novel Antimicrobial Agents. **Microorganisms**, v. 10, n. 1, 1 jan. 2022.

ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. **Nature**, 205, n. 4972, p. 698-699, 1965.

ROTTENBERG, S.; DISLER, C.; PEREGO, P. The rediscovery of platinum-based cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, 1 jan. 2021.

ROTH, T. F.; HELINSKI, D. R. Evidence for circular DNA forms of a bacterial plasmid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 58, n. 2, p. 650, 1967.

SANTA, P. et al. The Role of Nucleases and Nucleic Acid Editing Enzymes in the Regulation of Self-Nucleic Acid Sensing. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 26 fev. 2021.

SANTINI, C. et al. Advances in Copper Complexes as Anticancer Agents. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 1, p. 815–862, 8 jan. 2014.

SARDESAI, N. Y. et al. DNA recognition by metal-peptide complexes containing the recognition helix of the phage 434 repressor, **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 2, p.762-771, 1997.

SCARPELLINI, M. et al. Phosphate Diester Hydrolysis and DNA Damage Promoted by New cis-Aqua/Hydroxy Copper(II) Complexes Containing Tridentate Imidazole-rich Ligands. **Inorganic Chemistry**, v. 42, n. 25, p. 8353–8365, 1 dez. 2003.

SCHÄGGER, H. Tricine–SDS-PAGE. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 16–22, 12 maio 2006.

SCHRÖDINGER, L. L. C. **The PyMOL molecular graphics system** 2010.

SCIORTINO, G. et al. Prediction of the interaction of metallic moieties with proteins: An update for protein-ligand docking techniques. **Journal of Computational Chemistry**, v. 39, n. 1, p. 42–51, 5 jan. 2018.

SHARMA, P. et al. Nucleases of bacterial pathogens as virulence factors, therapeutic targets and diagnostic markers. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 309, n. 8, p. 151354, dez. 2019.

SHENG, X. et al. DNA binding, cleavage, and cytotoxic activity of the preorganized dinuclear zinc(II) complex of triazacyclononane derivatives. **Bioconjugate Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 490–498, 2008.

SHEVCHENKO, A. et al. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 5, p. 850–858, 1996.

SHIMON, L. J. W.; HARRISON, S. C. The Phage 434 OR2/R1-69 Complex at 2.5 Å Resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 232, n. 3, p. 826–838, 5 ago. 1993.

SHRIVER; ATKINS. **Inorganic Chemistry**. Fifth edition ed, 2009.

SHUBSDA, M. F.; GOODISMAN, J.; DABROWIAK, J. C. Quantitation of ethidium-stained closed circular DNA in agarose gels. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 34, n. 1, p. 73–79, 1 fev. 1997.

SILVA, G. A. D. S. et al. Synthesis and characterization of FeIII(μ -OH)ZnII complexes: effects of a second coordination sphere and increase in the chelate ring size on the hydrolysis of a phosphate diester and DNA. **Dalton Transactions**, v. 46, n. 34, p. 11380–11394, 29 ago. 2017.

SILVA, M. P. et al. Dinuclear copper(II) complexes with derivative triazine ligands as biomimetic models for catechol oxidases and nucleases. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 213, 1 dez. 2020.

SISSOËFF, I.; GRISVARD, J.; GUILLÉ, E. Studies on metal ions-DNA interactions: Specific behaviour of reiterative DNA sequences. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 31, n. C, p. 165–199, 1 jan. 1978.

SMITH, H. O.; WELCOX, K. W. A Restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*: I. Purification and general properties. **Journal of Molecular Biology**, v. 51, n. 2, p. 379–391, 28 jul. 1970.

SOLER, M. et al. Design, Preparation, and Characterization of Zn and Cu Metallopeptides Based On Tetradentate Aminopyridine Ligands Showing Enhanced DNA Cleavage Activity. **Inorganic Chemistry**, v. 54, n. 22, p. 10542–10558, 27 out. 2015.

SOLER, M. et al. Peptide-mediated vectorization of metal complexes: conjugation strategies and biomedical applications. **Dalton Transactions**, v. 45, n. 33, p. 12970–12982, 2016.

SREEDHARA, A.; FREED, J. D.; COWAN, J. A. Efficient Inorganic Deoxyribonucleases. Greater than 50-Million-Fold Rate Enhancement in Enzyme-Like DNA Cleavage. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 37, p. 8814–8824, 1 set. 2000.

SRINIVASAN, B. Words of advice: teaching macromolecular crystallography. **The FEBS Journal**, 5 maio 2023.

STROHFELDT, K. **Essentials of Inorganic Chemistry: For Students of Pharmacy, Pharmaceutical Sciences and Medicinal Chemistry**. 1st edition ed, 2015.

SUNDBERG, R. J. Interactions of histidine and other imidazole derivatives with transition metal ions in chemical and biological systems. **Chemical Reviews**, v. 74, n. 4, p. 471–517, 1 ago. 1974.

TECHNOLOGY NETWORKS. **Agarose Gel Electrophoresis, How It Works and Its Uses**. Disponível em: <<https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/agarose-gel-electrophoresis-how-it-works-and-its-uses-358161>>. Acesso em: 9 set. 2023.

TJIOE, L. et al. Synthesis, structure, and DNA cleavage properties of copper(II) complexes of 1,4,7-triazacyclononane ligands featuring pairs of guanidine pendants. **Inorganic Chemistry**, v. 50, n. 2, p. 621–635, 17 jan. 2011.

TJIOE, L. et al. Phosphodiester cleavage properties of copper(II) complexes of 1,4,7-triazacyclononane ligands bearing single alkyl guanidine pendants. **Inorganic Chemistry**, v. 51, n. 2, p. 939–953, 16 jan. 2012.

TREVORS, J. T. Plasmid curing in bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 32, n. 3–4, p. 149–157, abr. 1986.

TSENG, T.-S. A.; BURSTYN, J. N. Synthesis and DNA cleavage activity of a bifunctional intercalator-linked copper(ii) macrocycle. **Chemical Communications**, n. 46, p. 6209–6211, 2008.

VAN DYKE, M. W.; HERTZBERG, R. P.; DERVAN, P. B. Map of distamycin, netropsin, and actinomycin binding sites on heterogeneous DNA: DNA cleavage-inhibition

patterns with methidiumpropyl-EDTA.Fe(II). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 18, p. 5470, 1982.

VERDONK, M. L. et al. Improved protein–ligand docking using GOLD. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 52, n. 4, p. 609–623, 1 set. 2003.

WALSH, C. T.; GARNEAU-TSODIKOVA, S.; GATTO, G. J. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 44, n. 45, p. 7342–7372, 1 dez. 2005.

WANG, L. et al. Therapeutic peptides: current applications and future directions. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 48, 14 fev. 2022.

WARDMAN, P.; CANDEIAS, L. P. Fenton Chemistry: An Introduction. **Radiation Research Society**, v. 145, 1996.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 737–738, 25 abr. 1953.

WIEDEMANN, C.; BELLSTEDT, P.; GÖRLACH, M. CAPITO--a web server-based analysis and plotting tool for circular dichroism data. **Bioinformatics**, v. 29, n. 14, p. 1750–1757, 15 jul. 2013.

WILKINS, M. H. F.; STOKES, A. R.; WILSON, H. R. Molecular Structure of Nucleic Acids: Molecular Structure of Deoxypentose Nucleic Acids. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 738–740, 25 abr. 1953.

WRIGHT, T. H. et al. Posttranslational mutagenesis: A chemical strategy for exploring protein side-chain diversity. **Science**, v. 354, n. 6312, 4 nov. 2016.

YANG, W. Nucleases: diversity of structure, function and mechanism. **Quarterly reviews of biophysics**, v. 44, n. 1, p. 1–93, fev. 2011.

YU, Z.; COWAN, J. A. Metal complexes promoting catalytic cleavage of nucleic acids — biochemical tools and therapeutics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 43, p. 37–42, 2018.

ZAHA, A.; BUNSELMAYER, F.; PASSAGLIA, L. **Biologia Molecular Básica**. Artmed, 5a ed, 2014.

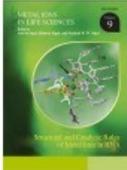
ZEGLIS, B. M.; PIERRE, V. C.; BARTON, J. K. Metallo-intercalators and metallo-insertors. **Chemical Communications**, v. 44, p. 4565-4579, 2007.

ZENKOVA, M. A. (ED.). **Artificial Nucleases**. Nucleic Acids and Molecular Biology. v. 13, 2004.

ZHAO, G.; LIN, H. Metal Complexes with Aromatic N-Containing Ligands as Potential Agents in Cancer Treatment. **Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents**, v.2, p.137-147, 2005.

ZONDLO, N. J.; SCHEPARTZ, A. Highly specific DNA recognition by a designed miniature protein. **Journal of the American Chemical Society**, p. 6938–6939, 28 jul. 1999.

ANEXO A

Best Poster Award

is hereby granted to:

Vania Mareze

In recognition of a first prize in the poster competition at LABIC-7.

*This Award is made possible by the **Metal Ions in Life Sciences** book series.*

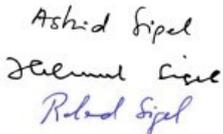
From the Content of MILS-9:

- Metal Ion Binding to RNA
- RNA Quadruplexes
- Metal Ions Regulating Riboswitches
- Multiple Roles of Metal Ions in Large Ribozymes
- The Ribosome: A Molecular Machine Powered by RNA
- Metal Ions and Artificial Ribozymes
- Binding of Kinetically Inert Metal Ions to RNA

ISSN: 1559-0836
ISBN: 978-1-84973-094-5
www.bioinorganic-chemistry.org/mils



Chair of VII LABIC



The Editors