



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

LEONARDO ALVES LINHARES

ESTUDOS DE FLUORESCÊNCIA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE
COFILINA-1 HUMANA

FORTALEZA

2022

LEONARDO ALVES LINHARES

ESTUDOS DE FLUORESCÊNCIA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

COFILINA-1 HUMANA

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química. Área de concentração: Química Bioinorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa.

Coorientadora: Dra. Ana Claudia Silva Gondim

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L728e Linhares, Leonardo Alves.
Estudos de fluorescência da proteína recombinante cofilina-1 humana / Leonardo Alves Linhares. –
2022.
46 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Química, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa.

1. Doença de Parkinson. 2. Cofilina-1 humana. 3. Fluorescência. I. Título.

CDD 540

LEONARDO ALVES LINHARES

ESTUDOS DE FLUORESCÊNCIA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE
COFILINA-1 HUMANA

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química. Área de concentração: Química Bioinorgânica.

Aprovada em: __/__/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Ana Cláudia Silva Gondim (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Idalina Maria Moreira de Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais, Maria de Fátima e Gentil. Às minhas tias, Francisca e Raimunda. Aos meus irmãos, amigos e demais familiares que me apoiaram, inspiraram e contribuíram nessa jornada.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará, pela sua infraestrutura, pelo seu excelente corpo docente, pelos seus programas de auxílio e por ter possibilitado tornar-me o primeiro do meu núcleo familiar a concluir o ensino superior.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro, com a manutenção das bolsas de Iniciação Científica concedidas a mim durante toda a graduação, o que impactou positivamente na minha formação como bacharel em química.

Ao Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa, pela excepcional orientação desde o início da graduação, quando me aceitou em seu grupo de pesquisa como aluno de iniciação científica, e por ter contribuído intensamente na minha formação de químico e cientista.

Ao Prof. Dr. Geancarlo Zanatta, pela excelente orientação e colaboração na área de bioinformática estrutural, e pela imensa contribuição no meu desenvolvimento como cientista.

À banca examinadora, em especial, às cientistas Profa. Dra. Idalina Maria Moreira de Carvalho e Dra. Ana Cláudia Silva Gondim, por terem aceitado o convite de participação e por toda a contribuição no meu trabalho de conclusão de curso.

Aos meus pais, Maria de Fátima Alves Linhares e Gentil Rodrigues Linhares, pela inspiração e por sempre apoiarem às minhas escolhas e terem financiado, mesmo com pouco, a minha estadia na cidade de Fortaleza.

Às minhas tias, Francisca e Raimunda. A primeira pelo carinho, pela paciência, pelos conselhos e por ter me acolhido em sua casa quando ingressei na UFC em 2017. A segunda pelo carinho e direcionamento dado desde que cheguei na cidade de Fortaleza.

Aos meus irmãos Cesar, Luis Carlos, Mauro, Mônica e Farli, por sempre me apoiarem e contribuírem para a realização dos meus sonhos, e aos meus sobrinhos, Jean e Jefferson, por se orgulharem de mim e acreditarem no meu potencial.

Aos colegas de turma, amigos e demais familiares, por terem contribuído na minha jornada dentro e fora da UFC, com apoio emocional e financeiro.

Ao Grupo e aos companheiros do Laboratório de Bioinorgânica pela amizade, atenção e apoio de todos os membros que sempre se mostraram solícitos para comigo.

“Seja corajoso. Assuma Riscos. Nada pode substituir a experiência.” (Paulo Coelho)

RESUMO

Grupos fluoróforos intrínsecos presentes nativamente em proteínas, como os resíduos de triptofano, e sondas fluorescentes extrínsecas, como o 4,4'-dianilino-1,1'-binaftil-5,5'-ácido disulfônico (bis-ANS), podem ser empregados no monitoramento de mudanças conformacionais ocasionadas pela interação de pequenas moléculas ou íons metálicos com a estrutura de proteínas a partir do fenômeno de supressão de fluorescência. Para esse fim, a cofilina-1 humana, proteína potencialmente envolvida na doença de Parkinson (DP), foi produzida de forma recombinante em *E. coli*, purificada e submetida a investigação estrutural frente a sua possível interação com íons metálicos de interesse biológico, como ferro (Fe^{3+}), zinco (Zn^{2+}) e cobre (Cu^{2+}), e alumínio (Al^{3+}), íon metálico não fisiológico, por titulação fluorimétrica. Onde, nos tampões PBS, Tris-HCl, TES e HEPES a 20 mM e pH 7,4 o comprimento de onda de máxima emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{máx}}$) da cofilina-1 se manteve na faixa de 329 e 333 nm e a adição de NaCl 50-150 mM, bem como a do quelante EDTA 1 mM ao tampão de trabalho, HEPES 20 mM pH 7,4, não influenciou no perfil de emissão da proteína. Ainda, ensaios de fluorescência intrínseca com os íons Zn^{2+} e Al^{3+} sugeriram uma rápida interação metal-proteína, enquanto experimentos de fluorescência extrínseca empregando o bis-ANS ($K_D = 3,91 \mu\text{M}$, $R^2 = 0,9956$) indicaram uma interação mais acentuada dos íons Fe^{3+} ($K_D = 16,8 \mu\text{M}$, $R^2 = 0,9844$) e Cu^{2+} com a cofilina-1. Os perfis de supressão obtidos para os íons Cu^{2+} e Zn^{2+} sugerem uma cinética de interação lenta, enquanto o perfil obtido para o íon Al^{3+} indicou uma possível interação transiente com a proteína cofilina-1 humana nativa. Esses resultados, ainda que preliminares, são promissores e podem eventualmente servir de base para futuros ensaios de fluorescência utilizando a proteína cofilina-1 humana na sua forma oxidada.

Palavras-chave: fluorescência; cofilina-1 humana; doença de Parkinson.

ABSTRACT

Intrinsic fluorophore groups natively present in proteins, such as tryptophan residues, and extrinsic fluorescent probes, such as 4,4'-dianilino-1,1'-binaphthyl-5,5'-disulfonic acid (bis-ANS), can be employed in the monitoring of conformational changes caused by the interaction of small molecules or metallic ions with proteins structure by the fluorescence quenching phenomenon. For this purpose, the human cofilin-1, a potentially involved in Parkinson's disease (PD) protein, was recombinantly produced in *E. coli*, purified and submitted to structural investigation in view of its possible interaction with metallic ions of biological interest, such as iron (Fe^{3+}), zinc (Zn^{2+}) and copper (Cu^{2+}), and aluminum (Al^{3+}), a non-physiological metal ion, by fluorometric titration. Where, in PBS, Tris-HCl, TES and HEPES buffers at 20 mM and pH 7,4, the wavelength of maximum fluorescence emission (λ_{max}) of cofilin-1 remained in the range of 329 and 333 nm and the addition of 50-15 mM NaCl, as well of the 1 mM EDTA chelator to the working buffer, 20 mM HEPES pH 7,4, did not influence the protein emission profile. Furthermore, intrinsic fluorescence assays with Zn^{2+} and Al^{3+} ions suggested a rapid metal-protein interaction, while extrinsic fluorescence experiments employing bis-ANS ($K_D = 3,911 \mu\text{M}$, $R^2 = 0,9956$) indicated a stronger interaction of Fe^{3+} ($K_D = 16,80 \mu\text{M}$, $R^2 = 0,9844$) and Cu^{2+} with cofilin-1. The quenching profiles obtained for both Cu^{2+} and Zn^{2+} ions suggest a slow interaction kinetics, while the profile obtained for the Al^{3+} ion indicated a possible transient interaction with the native human cofilin-1 protein. These results, although preliminary, are promising and may eventually serve as a basis for future fluorescence assays using human cofilin-1 protein in its oxidized form.

Keywords: fluorescence; human cofilin-1; Parkinson's disease.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Estrutura tridimensional da proteína cofilina-1 humana (PDB 1Q8X). Destaca-se, em A, as estruturas secundárias: hélices- α e hélices- β_{10} na cor verde e folhas- β em magenta. Voltas (*turns*), alças (*coils*) e segmentos (*bridges*) estão na cor cinza. Em B, como estão dispostos os resíduos de cisteína C39, C80, C139 e C147 ao longo da estrutura terciária da proteína 18
- Figura 2 – Em destaque, o resíduo de triptofano (W104) na estrutura da proteína cofilina-1 humana (PDB 1Q8X). Evidencia-se a proximidade de tal resíduo com os 4 resíduos de cisteína, principalmente com os resíduos C80 e C139, em um raio de 5 Å. Ainda próximo, em um raio de 7 Å, o resíduo C39 e mais distante, dentro um raio de 15 Å, o resíduo C147, de acordo com cálculos do UCSF Chimera 19
- Figura 3 – Diagrama de Perrin-Jablonski 20
- Figura 4 – Estrutura molecular do aminoácido triptofano, à esquerda, e a orientação dos vetores de momento de dipolo de transição para os estados 1L_a e 1L_b do indol, à direita 21
- Figura 5 – Estrutura molecular da sonda hidrofóbica bis-ANS 21
- Figura 6 · Espectro de absorção eletrônica na região do UV-Vis da cofilina-1 em tampão PBS 200 mM pH 7,4 28
- Figura 7 – Investigando condições ótimas para fluorescência da cofilina-1 com mudanças das fendas de excitação e emissão. Espectros de fluorescência obtidos pela excitação da cofilina-1 2 μ M em 280 nm (esquerda) e 295 nm (direita) nos tampões HEPES (A), PBS (B), Tris-HCl (C) e TES (D) 20 mM pH 7,4 NaCl 100 mM, com diferentes valores das aberturas das fendas..... 29
- Figura 8 – Efeito da força iônica na emissão de fluorescência da proteína cofilina-1 humana. Em destaque os espectros de emissão obtidos pela excitação em 280 nm (A) e 295 nm (B) em tampão HEPES 20 mM pH 7,4, contendo concentrações variáveis de NaCl, usando 1,50 mm de abertura de fenda 31

| | |
|---|----|
| Figura 9 – Efeito da adição de EDTA na emissão de fluorescência da cofilina-1. Espectros de emissão obtidos pela excitação em 280 nm (A) e 295 nm (B) em tampão HEPES 20 mM pH 7,4, na presença e na ausência de NaCl e EDTA, usando fendas de 1,50 mm | 32 |
| Figura 10 – Efeito da fenda de emissão aberta sobre a fluorescência da cofilina-1 durante 1 h de ensaio. Espectros de emissão da cofilina-1 2 μ M e seus respectivos gráficos de supressão de fluorescência, intensidade máxima ($I_{m\acute{a}x}$) versus tempo (t), monitorados por 60 min, obtidos pela excitação em 280 nm (1) e 295 nm (2) usando fendas de 1,50 mm nos tampões HEPES (A), PBS (B), TES (C) e Tris-HCl (D) 20 mM pH 7,4 NaCl 100 mM, mantendo-se a fenda de excitação aberta durante os experimentos | 33 |
| Figura 11 – Espectro de emissão para cofilina-1 2 μ M e seus respectivos gráficos de supressão de fluorescência, intensidade máxima ($I_{m\acute{a}x}$) versus tempo (t), monitorados por 60 min, obtidos pela excitação em 280 nm, a esquerda, e 295 nm, a direita, usando fendas de 1,50 mm em tampão HEPES 20 mM pH 7,4 NaCl 100 mM, mantendo a fenda de excitação fechada durante os experimentos | 34 |
| Figura 12 – Espectros de emissão fluorescência intrínseca da cofilina-1 sob adição de íons Zn^{2+} em tampão HEPES 20 mM pH 7,4 NaCl 100 mM. A esquerda, o espectro obtido pela excitação em 280 nm e, a direita, o espectro obtido pela excitação em 295 nm e o seu respectivo gráfico de intensidade máxima ($I_{m\acute{a}x}$) versus concentração de Zn^{2+} | 35 |
| Figura 13 – Espectros de emissão de fluorescência intrínseca da cofilina-1 sob adição de íons Al^{3+} . A esquerda, o espectro obtido pela excitação em 280 nm e, a direita, o espectro obtido pela excitação em 295 nm e o seu respectivo gráfico de intensidade máxima versus concentração de Al^{3+} | 36 |
| Figura 14 – Espectros normalizados da sonda hidrofóbica bis-ANS livre e ligada a cofilina-1 em tampão PBS 20 mM pH 7,4 NaCl 100 mM | 37 |
| Figura 15 – Curvas de saturação de bis-ANS titulada na cofilina-1, empregando-se tampão HEPES 20 mM pH 7,4 na ausência (A) e na presença (B) e de NaCl 100 mM usando abertura de fenda de 1,0 mm | 38 |

- Figura 16 – Espectros de emissão de fluorescência da sonda extrínseca bis-ANS ligada cofilina-1 sob adição dos íons Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Al^{3+} . A esquerda o espectro obtido pela excitação em 350 nm e, a direita, o seu respectivo gráfico de intensidade máxima versus concentração de íons adicionados. Sendo A, B, C e D referentes as titulações fluorimétricas usando os cátions Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Al^{3+} , respectivamente, em tampão HEPES 20 mM pH 7,4 NaCl 100 mM usando abertura de fenda de 1,0 mm 39
- Figura 17 – Cromatograma e gel de eletroforese da purificação da proteína recombinante cofilina-1 expressada em *E. coli*. O cromatograma do procedimento usando CM50 (A), evidenciando o pico eluido em tampão PBS 20 mM pH 7,0 com NaCl 100 mM. O gel de poliacrilamida em condição desnaturante (B), exhibe a banda relativa à cofilina-1 e os marcadores de proteínas..... 47
- Figura 18 – Gel de eletroforese referente a purificação realizada previamente (UFC, Dra. Ana Cláudia Silva Gondim, coorientadora do presente trabalho). Em destaque a banda referente à proteína cofilina-1 e os marcadores moleculares 48

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Composição do gel de poliacrilamida 15% | 25 |
| Tabela 2 – Comprimentos de onda (λ) de máxima emissão | 30 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------|--|
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DP | Doença de Parkinson |
| DTT | Ditiotreitol |
| EDTA | Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético |
| FPLC | Cromatografia Líquida de Proteína Rápida |
| IPTG | Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida |
| LB | Luria Bertani |
| OD | Densidade Óptica |
| PBS | Tampão Fosfato Salino |
| PDB | Banco de Dados de Proteínas |
| PMSF | Fluoreto de fenilmetilsulfonil |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| SDS-PAGE | Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil-Sulfato de Sódio |
| TEMED | Tetrametiletlenodiamina |
| UV-Vis-NIR | Ultravioleta, Visível e Infravermelho Próximo |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 | Estrutura da cofilina-1 humana | 17 |
| 1.2 | Espectroscopia de fluorescência molecular | 19 |
| 2 | OBJETIVOS | 23 |
| 2.1 | Objetivo geral | 23 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 23 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 24 |
| 3.1 | Expressão em <i>E. coli</i> e purificação da proteína cofilina-1 humana | 24 |
| <i>3.1.1</i> | <i>Expressão</i> | 24 |
| <i>3.1.2</i> | <i>Purificação</i> | 24 |
| 3.2 | Preparação de soluções de FeCl₃, CuCl₂, ZnCl₂ e AlCl₃ | 25 |
| 3.3 | Preparação de soluções tampão PBS, Tris-HCl, HEPES e TES | 26 |
| 3.4 | Medidas espectroscópicas | 26 |
| 3.5 | Tratamento dos dados | 26 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 27 |
| 4.1 | Expressão e purificação da proteína cofilina-1 humana | 27 |
| 4.2 | Medição da absorção eletrônica | 27 |
| 4.3 | Investigação das condições de estudo | 28 |
| 4.4 | Determinação da força iônica e investigação de metais na amostra | 30 |
| 4.5 | Otimização da fluorescência da cofilina-1 com adição de íons metálicos | 32 |
| 4.6 | Titulação da cofilina-1 com os cátions Zn²⁺ e Al³⁺ por fluorescência intrínseca | 35 |
| 4.7 | Investigando o uso de bis-ANS como sonda para a cofilina-1 | 37 |
| 4.8 | Titulação fluorimétrica com os cátions Zn²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺ e Al³⁺ por fluorescência extrínseca | 39 |
| 5 | CONCLUSÃO | 42 |
| 6 | REFERÊNCIAS | 43 |
| | ANEXO A – EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA COFILINA-1 HUMANA | 47 |

1 INTRODUÇÃO

Dentre as principais patologias degenerativas que afetam milhões de pessoas pelo mundo, destacam-se as doenças de Alzheimer e Parkinson. Esta última, afetando cerca de 6 milhões de pessoas ao redor do planeta (DORSEY et al., 2018). Trata-se de uma doença neurodegenerativa complexa e sem cura, que desperta grande interesse e preocupação na comunidade científica. Aliado a isso tem-se o notável aumento em cerca de 30 anos na expectativa de vida da população em países desenvolvidos no século XX (CHRISTENSEN et al., 2009) e o consequente envelhecimento da população mundial. Visto que, apesar da hereditariedade e da exposição a pesticidas apresentarem-se como condições de risco, o principal condicionador de risco para o desenvolvimento da doença de Parkinson (DP) ainda é o envelhecimento (BEITZ, 2014).

Do ponto de vista bioquímico, a causa ou efeito mais provável das doenças neurodegenerativas está diretamente relacionada a eventos como agregação e mal enovelamento de proteínas (SOTO; PRITZKOW, 2018). No caso da DP, com a formação de agregados de α -sinucleína, uma pequena proteína intracelular de cerca de 14 kD, expressa no tecido cerebral, identificada por Maroteaux em 1988 (MAROTEAUX; CAMPANELLI; SCHELLER, 1988). Tais agregados insolúveis dão origem a principal marca histopatológica da DP, os corpos de Lewy, cuja composição é, em grande parte, de proteínas α -sinucleínas (LANGLEY; CHARLESWORTH, 1997) associadas a outras macromoléculas. Estudos recentes, conduzidos em conjunto, nos laboratórios dos professores Dr. Fábio Klamt (UFRGS) e Dr. Richard B. Parsons (King's College) mostraram, em análises de tecido encefálico humano *post mortem* de pacientes com a doença, que uma dessas macromoléculas é a proteína cofilina-1 (LOPES, 2017). Adicionalmente, demonstrou-se que essa proteína tem papel importante nos primeiros estágios do processo neurodegenerativo da DP (LOPES, 2017).

A cofilina-1, de peso molecular de 18,5 kD, pertence a superfamília das ADF/Cofilina e tem grande importância na modulação dos filamentos de actina (BERNSTEIN; BAMBURG, 2010). A descoberta da sua presença nos corpos de Lewy abre perspectiva para novos estudos, a fim de compreender a sua importância para além das funções já conhecidas, como citocinese, morfogênese, transporte celular e função sináptica, quando esta liga-se aos filamentos de actina (BERNSTEIN; BAMBURG, 2010). Recentemente demonstrou-se, também, o seu envolvimento no aumento da patogênese e transmissão de agregados fibrilares de α -sinucleína entre células de ratos modelos (YAN et al., 2022), o que sugere o seu potencial envolvimento nas fases iniciais e também na progressão da sinucleinopatia em questão.

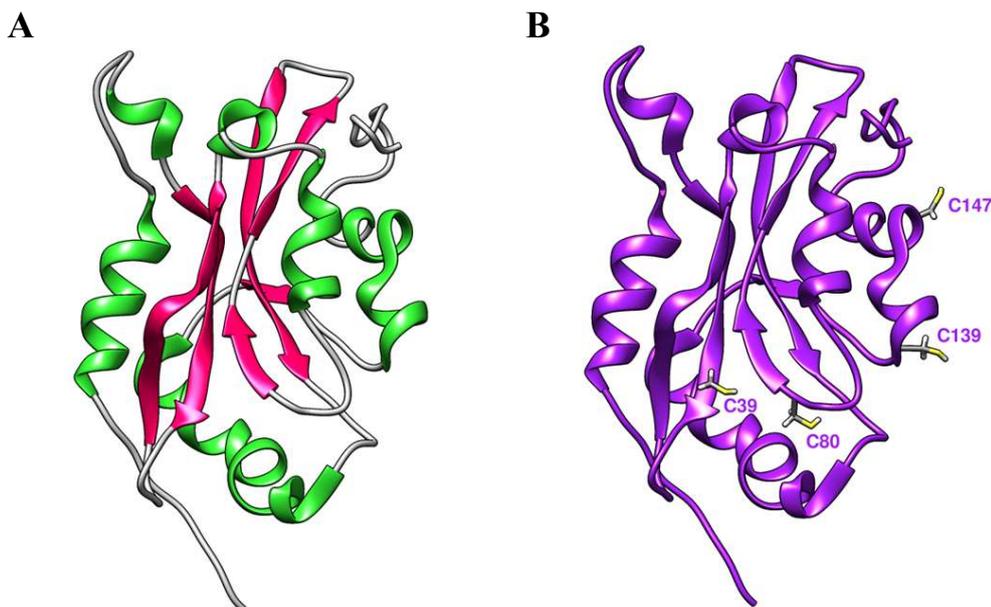
Estudos mostram que a DP afeta diretamente a homeostase e regulação do ferro em regiões do cérebro que estão sob ação degenerativa (DOUBLE et al., 2000). O ferro, assim como outros metais (BJORKLUND et al., 2018), tem sido intensamente investigado, pois tais íons estão presentes nos corpos de Lewy e sugerem que estresse oxidativo e danos à estrutura proteica causados por radicais livres podem ter papel importante na patogênese da doença (CASTELLANI et al., 2000). Ainda, é de conhecimento geral que a proteína α -sinucleína apresenta alta afinidade por metais de transição (SANTNER; UVERSKY, 2010), mas questões a cerca do papel direto dos íons metálicos no desenvolvimento da doença e na mediação da neurotoxicidade da α -sinucleína ainda permanecem em aberto (CARBONI; LINGOR, 2015).

Diferentemente do que se sabe a respeito da α -sinucleína, não há evidências de estudos de interação da cofilina-1 diretamente com metais, apenas ensaios indiretos de desfosforilação dessa proteína usando cálcio (WANG; SHIBASAKI; MIZUNO, 2005). Tal contexto, aliado a relevância do assunto e ao potencial terapêutico da abordagem, abre perspectiva para estudos envolvendo íons metálicos e a proteína cofilina-1 humana. Metais como ferro, zinco e cobre têm imensa relevância biológica, tendo em vista, por exemplo, a presença desses biometais na forma de cofatores em inúmeras enzimas, e a atuação direta na homeostase metálica e imunidade humana (SCHEIBER; MERCER; DRINGEN, 2014; WANG et al., 2020). E considerando-se que o desequilíbrio na homeostase desses biometais leva a acumulação à nível cerebral (AZZIZ, 2011), estes devem ser considerados como alvos promissores a serem investigados, uma vez que bioacumulação de metais pode ser prejudicial para a saúde humana. Como é reportado para o alumínio, um metal não biológico, em um cenário de acumulação intracelular (EXLEYT; DEREK BIRCHALL, 1992).

1.1 Estrutura da cofilina-1 humana

A cofilina-1 humana é uma proteína relativamente pequena, composta de 166 resíduos de aminoácidos, a qual apresenta estruturas secundárias do tipo hélice- α , hélice- 3_{10} , e folha- β , de acordo com o servidor de atribuição de estruturas secundárias STRIDE (HEINIG; FRISHMAN, 2004) para a estrutura depositada no banco de dados de proteínas e ácidos nucleicos PDB (BURLEY et al., 2019) sob o código 1Q8X. Curiosamente, tal proteína apresenta 4 resíduos de cisteína (C39, C80, C139 e C147) que quando oxidados dão origem a ligações dissulfeto intracadeia, o que acarreta em mudanças conformacionais que se revelaram danosas à célula humana (KLAMT et al., 2009; ZDANOV; KLAMT; SHACTER, 2010).

Figura 1 – Estrutura tridimensional da proteína cofilina-1 humana (PDB 1Q8X). Destaca-se, em A, as estruturas secundárias: hélices- α e hélices- 3_{10} na cor verde e folhas- β em magenta. Voltas (*turns*), alças (*coils*) e segmentos (*bridges*) estão na cor cinza. Em B, como estão dispostos os resíduos de cisteína C39, C80, C139 e C147 ao longo da estrutura terciária da proteína.

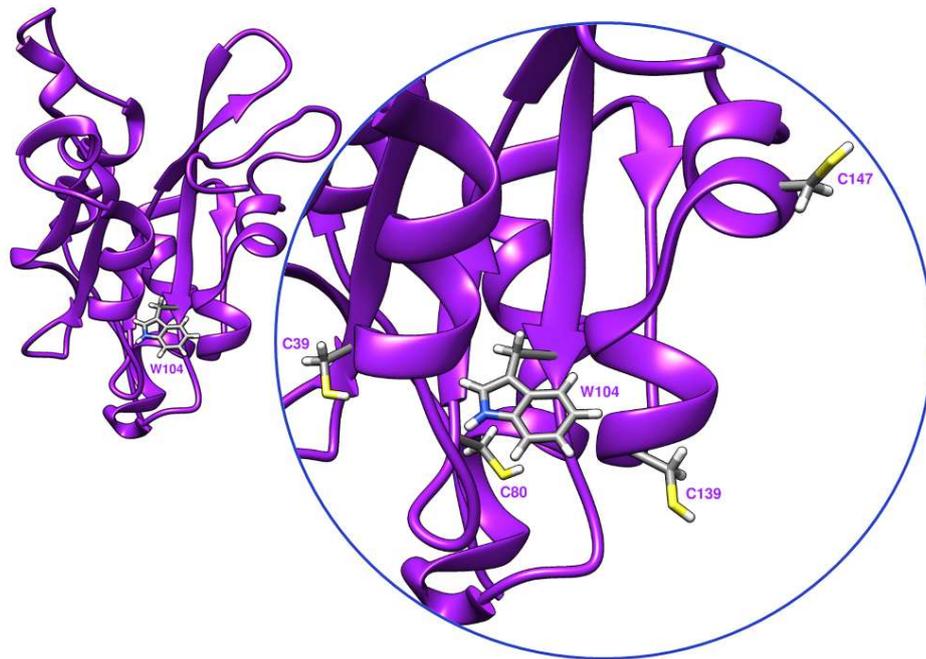


Fonte: Criado pelo autor utilizando o software de visualização de estruturas moleculares UCSF Chimera (PETTERSEN et al., 2004), a partir do primeiro frame da estrutura de RMN da cofilina-1 humana (PDB 1Q8X).

Interessantemente, essa proteína apresenta um único resíduo de triptofano (W104) em sua estrutura, sendo esse aminoácido, geralmente, o principal responsável pela fluorescência intrínseca de proteínas (TEALE; WEBER, 1957), o que a torna bastante adequada para estudos envolvendo espectroscopia de fluorescência. Uma vez que, em termos de comprimento de onda e intensidade de emissão, a fluorescência de tal resíduo é fortemente influenciada pelo seu micro-ambiente, ele exerce um papel fundamental em diversos estudos (GHISAIDOOBE; CHUNG, 2014). A supressão de emissão e/ou deslocamento do comprimento de onda máximo de emissão de fluorescência pode indicar mudanças conformacionais na estrutura terciária da proteína em cenários específicos, como no caso de interações com pequenas moléculas ou em situação de desnaturação proteica (AKBAR; SREERAMULU; SHARMA, 2016; RUAN et al., 1999; SINDREWICZ et al., 2019). Há, ainda, 6 resíduos de tirosina (Y68, Y82, Y85, Y89, Y117 e Y140) e 5 resíduos de fenilalanina (F15, F38, F71, F101 e F103) na estrutura da proteína. Tais resíduos de aminoácidos também são fluorescentes, mas geralmente contribuem pouco para a análise de alteração conformacional local, devido a baixa sensibilidade aos seus micro-

ambientes, em razão de características eletrônicas inerentes à própria natureza de tais moléculas (LAKOWICZ, 2006; ROYER, 1995).

Figura 2 – Em destaque, o resíduo de triptofano (W104) na estrutura da proteína cofilina-1 humana (PDB 1Q8X). Evidencia-se a proximidade de tal resíduo com os 4 resíduos de cisteína, principalmente com os resíduos C80 e C139, em um raio de 5 Å. Ainda próximo, em um raio de 7 Å, o resíduo C39 e mais distante, dentro um raio de 15 Å, o resíduo C147, de acordo com cálculos do UCSF Chimera.



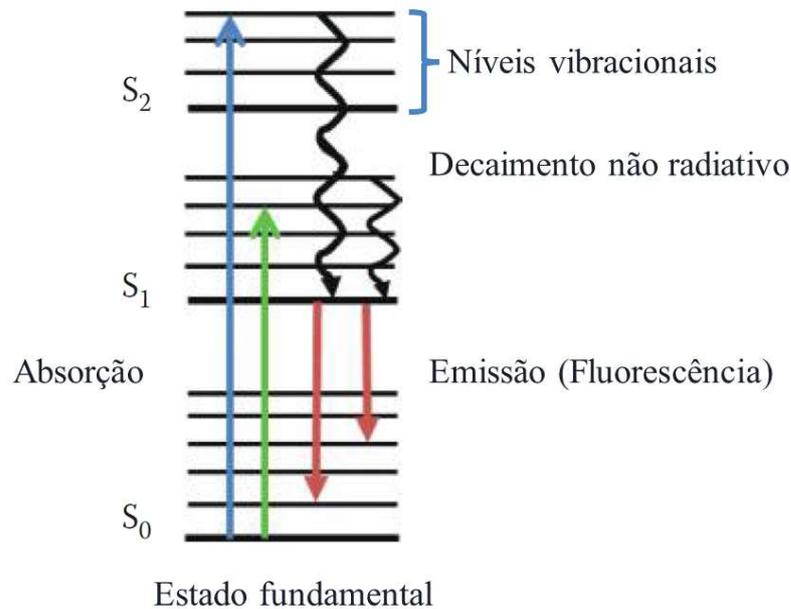
Fonte: Criado pelo autor utilizando o software de visualização de estruturas moleculares UCSF Chimera, a partir do primeiro frame da estrutura de RMN da cofilina-1 humana (PDB 1Q8X).

1.2 Espectroscopia de fluorescência molecular

A espectroscopia de fluorescência se fundamenta nos processos de absorção e emissão de fótons, essencialmente, no que acontece entre tais eventos, que ocorrem na escala dos nanossegundos (ns) (LAKOWICZ, 2006), limitando-se a transições entre estados eletrônicos de mesma multiplicidade. No caso de moléculas orgânicas, em geral, aos estados singlete S_n , onde $n \geq 0$. O S_0 é denominado estado fundamental e o S_1 e S_2 , conhecidos como primeiro e segundo estado excitado singlete, respectivamente (MIESSLER; FISCHER; TARR, 2014). Nesse fenômeno, uma fração da energia dos fótons absorvidos no processo de excitação (saída do estado S_0 para os estados S_1 e S_2) é perdida por vias não radiativas (retorno para o nível vibracional excitado mais baixo do S_1), o que faz com que os fótons emitidos (retorno ao estado

S_0) possuem menor energia e portanto, apresentem-se deslocados para a faixa do vermelho no espectro eletromagnético, ou seja, com comprimentos de onda maiores (LAKOWICZ, 2006). Tal fenômeno está resumido no diagrama simplificado de Perrin-Jablonski, assim nomeado em homenagem a alguns dos físicos responsáveis pela fundamentação teórica da espectroscopia de fluorescência quantitativa moderna (JAMESON, 2014).

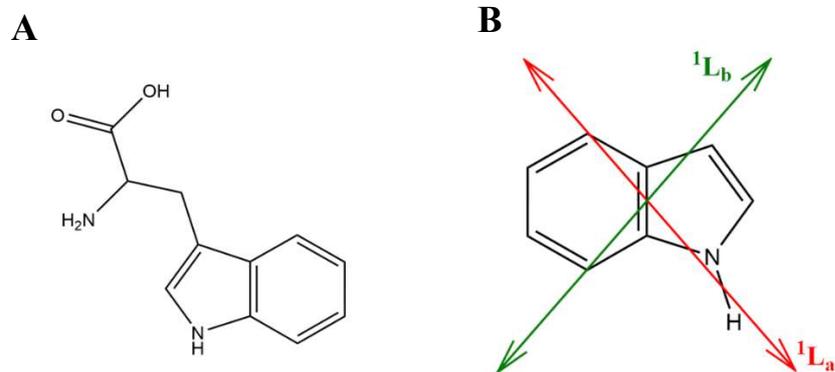
Figura 3 – Diagrama de Perrin-Jablonski



Fonte: Introduction to fluorescence, David M. Jameson 2014, página 62, figura 4.6, “Perrin-Jabłoński diagram”. Modificado pelo autor.

O uso da espectroscopia de fluorescência molecular tem grande impacto na investigação da interação entre proteína e ligante devido à sua alta sensibilidade e seletividade (MANOUCHEHRI et al., 2016). Em biomoléculas, como as proteínas, a emissão de fluorescência intrínseca é dominada pelos resíduos de triptofano e, portanto, a presença de tal resíduo é essencial na investigação estrutural de proteínas por espectroscopia de fluorescência (TEALE; WEBER, 1957). Tal molécula apresenta duas transições eletrônicas isoenergéticas próximas (JAMESON, 2014), devido a presença do indol em sua estrutura molecular. Esse composto possui 2 estados excitados, 1L_a e 1L_b , e tais estados conferem ao resíduo de triptofano a sua alta sensibilidade ao micro-ambiente, visto que ambos podem sofrer alterações energéticas a depender da polaridade do meio ao qual a proteína se encontra (CALLIS, 1997).

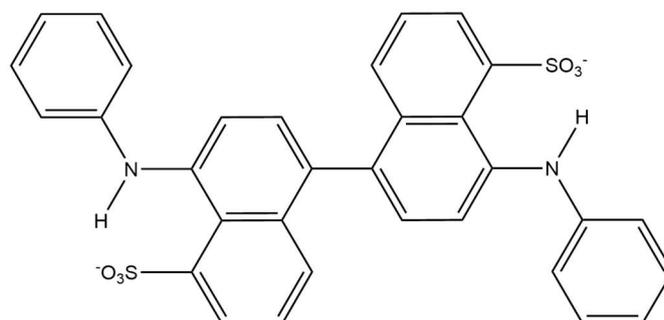
Figura 4 – Estrutura molecular do aminoácido triptofano, à esquerda, e a orientação dos vetores de momento de dipolo de transição para os estados 1L_a e 1L_b do indol, à direita.



Fonte: Criado pelo autor utilizando o software de desenho químico ChemDraw[®].

Ademais, tal técnica admite o uso de sondas fluorescentes externas como o 4,4'-dianilino-1,1'-binaftil-5,5'-ácido disulfônico (bis-ANS), que liga-se, não covalentemente, a sítios hidrofóbicos de proteínas. Este tipo de sonda tem o seu perfil espectral, comprimento de onda de emissão máxima e intensidade do sinal de emissão de fluorescência, alterado em resposta a mudanças conformacionais da proteína a qual se encontra ligada (LOBÃO et al., 2019), o que evidencia a sua sensibilidade ao micro-ambiente local e, portanto, o seu uso na determinação de alterações estruturais de macromoléculas. Essa propriedade tem sido intensamente explorada em diversos trabalhos publicados validando seu uso (KORTE; HERRMANN, 1994; R C BETHELL; N M GRAY; C R PENN, 1995; SARKAR et al., 1995; SHI; PALLEROS; FINK, 1994) .

Figura 5 – Estrutura molecular da sonda hidrofóbica bis-ANS.



Fonte: Criado pelo autor utilizando o software de desenho químico ChemDraw[®].

Nesse contexto, o presente trabalho investiga a possível interação da proteína recombinante cofilina-1 humana com íons metálicos fisiológicos (ferro, zinco e cobre) e com o íon alumínio empregando-se espectroscopia de fluorescência. Além disso, discute-se aspectos importantes relativos a obtenção de tal proteína por expressão heteróloga em bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*), bem como os desafios que envolvem a realização do estudo de interação entre proteínas, como receptores, e metais, como ligantes, dada a natureza química complexa de ambos os envolvidos. Ademais, os resultados aqui apresentados podem contribuir para lançar luz sobre a possível toxicidade de tais íons metálicos no contexto das doenças neurodegenerativas, em especial, no caso da DP, principal motivação da investigação realizada.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Produzir de forma recombinante e investigar estruturalmente a proteína cofilina-1 humana frente a determinados íons metálicos por espectroscopia de fluorescência.

2.2 Objetivos específicos

- Expressar e purificar a proteína cofilina-1 humana;
- Otimizar as rotinas de ensaios por fluorescência envolvendo a cofilina-1 humana nos tampões biológicos PBS, Tris-HCl, HEPES e TES;
- Realizar titulações fluorimétricas da proteína com os cátions Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} e Al^{3+} usando fluorescência intrínseca e sonda externa bis-ANS.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Expressão em *E. coli* e purificação da proteína cofilina-1 humana

A expressão e purificação da proteína recombinante cofilina-1 humana deu-se segundo metodologia já descrita na literatura (LU et al., 2012), com algumas modificações, descritas a seguir.

3.1.1 Expressão

A partir de uma placa de cultura contendo células de *E. coli*, cepa BL21(DE3) transformada com vetor de expressão pET30b contendo gene de resistência a canamicina e o gene da proteína cofilina-1 humana clonado, cresceu-se uma colônia em 50 mL de meio cultura LB (Luria Bertani) (Miller's, Invitrogen™) a 37 °C e 180 rpm em incubadora shaker (Tecnal, modelo TE-420) até a densidade óptica (OD) do meio atingir a faixa de 0,5-0,6 em 600 nm, e inoculou-se 4 L de meio LB (40 g de Peptone, 20 g Yeast Extract, 40 g NaCl) previamente autoclavados e contendo 50 µg mL⁻¹ de canamicina, com 4 mL da cultura crescida. Então, mantendo-se as condições de temperatura e agitação, monitorou-se o crescimento até o valor de OD atingir 1,2. Neste momento, induziu-se a expressão da proteína com 0,5 mM de IPTG, mantendo-se o crescimento por 4 h nas condições de temperatura e agitação citados.

3.1.2 Purificação

Ao fim da etapa de expressão, recolheu-se todo o conteúdo celular e centrifugou-se a 4 °C e 15000 rpm por 1 h (Beckman Coulter, modelo Allegra® 25R). Descartou-se o sobrenadante, recolheu-se as células sedimentadas em um béquer, pesou-se e adicionou-se tampão de lise (PBS 20 mM pH 7,0, NaCl 50 mM, EDTA 0,5 mM, Na₂S₂O₄ 5 mM, Lisozima 0,1 g mL⁻¹, PMSF 0,17 g mL⁻¹ em etanol) na proporção de 5 mL de tampão para 2 g de massa de célula. Ressuspendeu-se e sonicou-se a mistura usando processador ultrassônico (Sonics, Vibra-Cell) por 40 minutos. Em seguida, centrifugou-se a 4 °C e 15000 rpm por 1 h, recolheu-se o sobrenadante e tratou-se com 10 g DE52 (Whatman) adicionando-se tampão de equilíbrio (PBS 20 mM pH 7,0, NaCl 50 mM, EDTA 0,5 mM), e filtrando-se a vácuo em funil de Büchner com papel de filtro. Recolheu-se o filtrado e aplicou-se na coluna de troca iônica CM-50 (Pharmacia), previamente equilibrada com tampão de equilíbrio, eluindo-se a proteína com

tampão PBS 20 mM pH 7,0 NaCl 100 mM, monitorando-se a sua absorptividade no comprimento de onda de 280 nm via FPLC (Bio-Rad BioLogic LP). Diluiu-se as frações eluídas, num fator de 3, usando tampão PBS 20 mM pH 7,0, adicionando-se DTT 2 mM à amostra. Manteve-se a amostra diluída em repouso por 30 min e a seguir, reaplicou-se a amostra na coluna CM-50, eluindo-se a proteína com tampão PBS 20 mM pH 7,0 contendo 50 e 100 mM NaCl, monitorando-se a absorptividade em 280 nm. Coletou-se as frações eluídas e armazenou-se em -80 °C (Ultrafreezer -86 °C Thermos). Coletou-se aliquotas das frações eluídas para caracterização por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE) com Dodecil-Sulfato de Sódio (SDS). Usando-se marcador de peso molecular (Protein Marker Precision Plus, Bio-Rad) como padrão de massas relativas em gel de poliacrilamida 15%, para a identificação da proteína recombinante cofilina-1 humana expressada. Por fim, revelou-se os géis em sistema de fotodocumentação usando luz branca (Gel Doc XR, Bio-Rad).

Tabela 1 - Composição do gel de poliacrilamida 15%

| | (Volumes em μL) | |
|---|-----------------------------|-----------------------------|
| | <i>Stacking gel</i> 5% | <i>Resolving gel</i> 15% |
| Resolving gel buffer (Tris-HCl 375 mM, pH 8,8) | - | 750 |
| Stacking gel buffer (Tris-HCl 125 mM, pH 6,8) | 450 | - |
| 30:0,8 Acrilamida/Bis-acrilamida | 300 | 2500 |
| Água | 1020 | 1660 |
| TEMED (Tetrametiletilenodiamina) | 2.0 | 2.5 |
| 10% SDS | 18 | 50 |
| 10% Persulfato de amônio | 13.5 | 38 |

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2 Preparação de soluções de FeCl_3 , CuCl_2 , ZnCl_2 e AlCl_3

Preparou-se soluções estoque a 100 mM dos sais FeCl_3 (Aldrich), CuCl_2 (Sigma-Aldrich), ZnCl_2 (Acros Organics) e AlCl_3 (Vetec) usando balança analítica (Mettler Toledo ME104/A) e água ultrapura (Milipore Direct Q[®] 3UV), atentando-se para o fato dos cátions dos respectivos sais precipitarem na forma de hidróxido. Nesse caso, adicionou-se algumas gotas de HCl concentrado (Vetec) as soluções de cobre, zinco e alumínio. No caso do sal de ferro, dissolveu-se, primeiramente, em HCl concentrado e seguiu-se com a adição de água. Ao fim dos procedimentos, armazenou-se todas as soluções em geladeira a 4° C.

3.3 Preparação de soluções tampão PBS, Tris-HCl, HEPES e TES

Preparou-se soluções tampão estoque a 100 mM e pH 7,4 de PBS (Tampão Fosfato-Salino - $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaHPO}_4$, Sigma-Aldrich), Tris-HCl (Tris-(hidroximetil)-aminometano, Uniscience), HEPES (Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico, SERVA) e TES (Ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanossulfônico, Sigma). Diluiu-se todas as massas pesadas em água ultrapura e ajustou-se o pH de cada solução até o valor de 7,4 usando medidor de pH (Metrohm 827 pH Lab). Para o tampão PBS, preparou-se soluções a 100 mM de NaH_2PO_4 (Fosfato de sódio monobásico) e Na_2HPO_4 (Fosfato de sódio dibásico) e misturou-se, na proporção de 1:3, respectivamente, ajustando-se o pH pela adição da solução de NaH_2PO_4 100 mM à mistura, sob agitação constante. No preparo dos tampões HEPES e TES ajustou-se o pH usando NaOH 2M (Synth), enquanto na preparação do tampão Tris-HCl, usou-se HCl 1:1 % (v/v). Na preparação dos tampões PBS e HEPES adicionados de NaCl, pesou-se massas de NaCl referentes as concentrações de 50, 100 e 150 mM e dissolveu-se no tampão, diluindo para a concentração de trabalho. Por fim, armazenou-se todas as soluções em geladeira a 4° C.

3.4 Medidas espectroscópicas

Realizou-se as medidas de espectroscopia eletrônica de absorção em espectrofotômetro UV-Vis-NIR (CARY 5000, VARIAN) e as medidas de espectroscopia de fluorescência em espectrofluorímetro estacionário (QM-40, Photon Technology International) usando banho termostático (Haake C10) a 25 °C. Em todas as medidas usou-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Ademais, nas titulações fluorimétricas evitou-se exceder 5% do volume amostral total, 1 mL, na adição dos titulantes, íons metálicos e bis-ANS. Ainda, monitorou-se o OD dos crescimentos bacterianos em espectrofotômetro UV-Vis com arranjo de diodos (HP 8453, Hewlett Packard) usando cubeta descartável de 1 cm de caminho óptico.

3.5 Tratamento de dados

Tratou-se todos os dados usando os softwares OriginPro 2016 e GraphPad Prism 9. Destaca-se que para a determinação da constante de dissociação (K_D) nas titulações fluorimétricas realizadas, usou-se a equação de associação a um único sítio de ligação (One site – Total binding) do GraphPad Prism 9.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

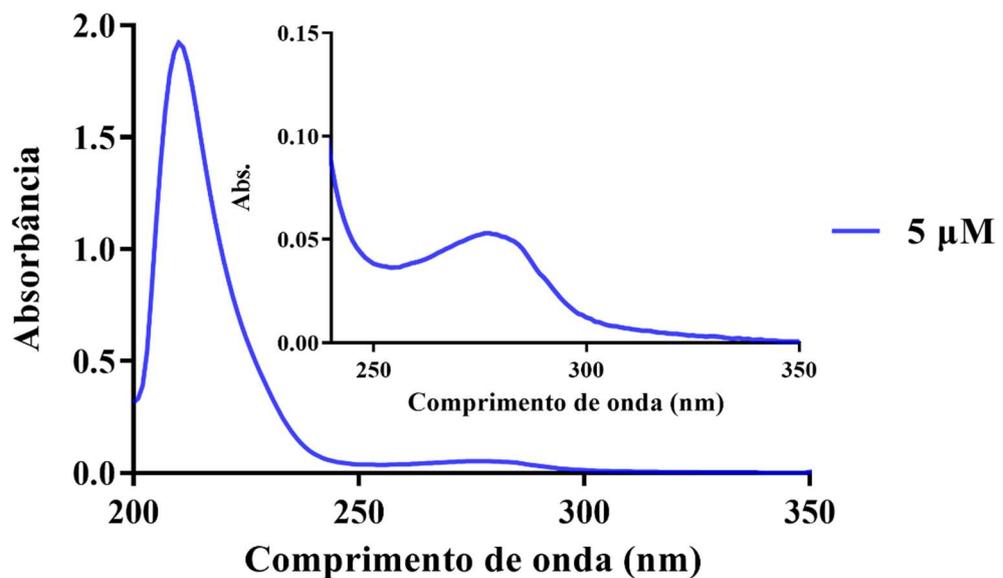
4.1 Expressão e purificação da proteína cofilina-1 humana

A proteína cofilina-1 fora previamente purificada e isolada no laboratório de Bioinorgânica, tendo sido, inclusive, sequenciada garantindo sua identidade. Dessa forma, o protocolo empregado tal como descrito na parte experimental, foi novamente realizado a fim de se obter mais da proteína, a qual foi monitorada por eletroforese em gel desnaturante (ANEXO A).

4.2 Medição da absorção eletrônica

De modo a assegurar-se que o sinal de emissão de fluorescência seria proporcional à concentração da amostra excitada, realizou-se experimentos de espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-Vis. Dessa forma, coletou-se os valores de absorbância referentes à concentração de 5 μM de cofilina-1 na faixa de 280 a 350 nm, região de excitação e emissão dos resíduos de triptofano, tirosina e fenilalanina presentes na estrutura da proteína.

Figura 6 - Espectro de absorção eletrônica na região do UV-Vis da cofilina-1 em tampão PBS 200 mM pH 7,4.



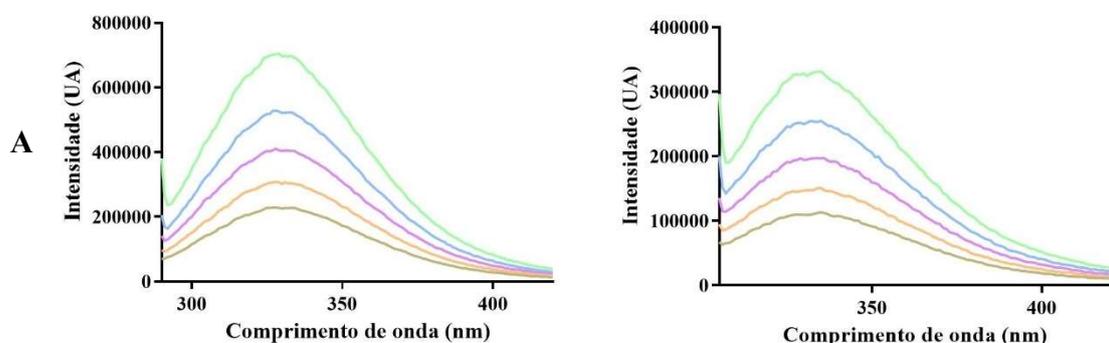
Fonte: Elaborado pelo autor.

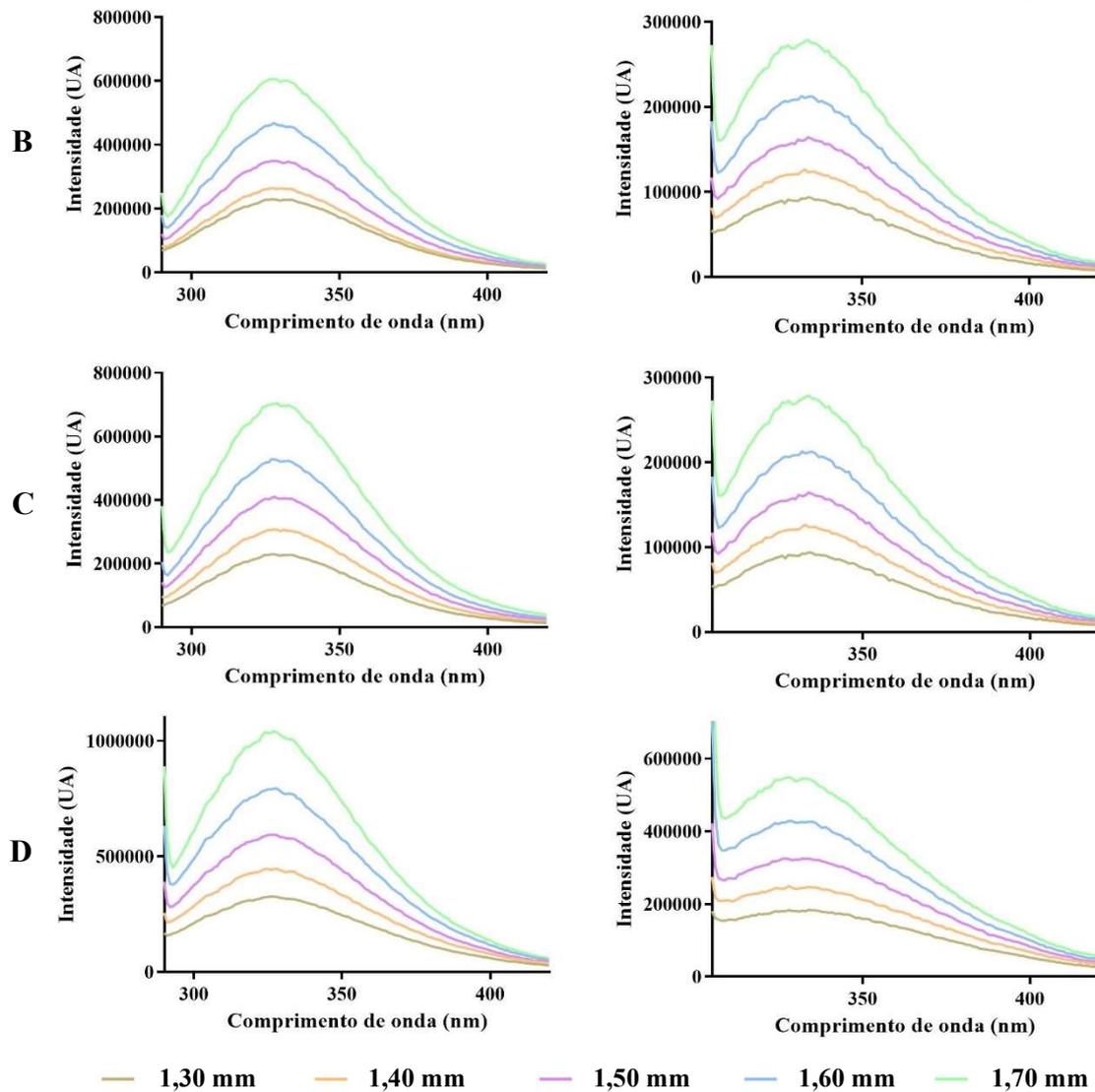
Observa-se na figura 6 que a proteína apresenta baixa absorvância na faixa de 280-350 nm, cerca de 0,05 de absorvância na concentração de 5 μM . Esse valor é descrito como a absorvância máxima limite em que se evita o efeito do filtro interno em ensaios de fluorescência (LAKOWICZ, 2006). Esse efeito tende a diminuir a intensidade da fluorescência observada devido, dentre outras razões, a absorção dessa energia pela própria amostra que se encontra relativamente concentrada no meio. Logo, qualquer valor de concentração abaixo de 5 μM pode ser utilizada com segurança em experimentos de fluorescência envolvendo a cofilina-1 humana, inclusive sem necessidade de correção desse possível efeito.

4.3 Investigação das condições de estudo

De forma a contornar o efeito do filtro interno, previamente mencionado, e, ainda, manter um equilíbrio entre quantidade de amostra utilizada por ensaio e sinal de fluorescência, decidiu-se por se empregar 2 μM de cofilina-1 por ensaio. Diante disso, realizou-se experimentos em diferentes tampões biológicos afim de determinar as melhores condições de abertura de fendas de excitação e emissão a serem utilizadas nos ensaios de fluorescência posteriormente. Como observado na figura 7, ambas as fendas foram variadas de 1,30 a 1,70 mm para todos os tampões testados no experimento.

Figura 7 – Investigando condições ótimas para fluorescência da cofilina-1 com mudanças das fendas de excitação e emissão. Espectros de fluorescência obtidos pela excitação da cofilina-1 2 μM em 280 nm (esquerda) e 295 nm (direita) nos tampões HEPES (A), PBS (B), Tris-HCl (C) e TES (D) 20 mM pH 7,4 NaCl 100 mM, com diferentes valores das aberturas das fendas.





Fonte: Elaborado pelo autor.

Verificou-se que em todos os tampões o pico de máxima emissão da cofilina-1 nos comprimentos de onda de excitação, em 280 nm e 295 nm, mantiveram-se ao redor de 329 e 333 nm, respectivamente, como mostrado na tabela 2, indicando apenas uma pequena influência da polaridade dos tampões PBS, Tris-HCl, TES e HEPES 20 mM pH 7,4 no comportamento emissivo da proteína. Sabe-se que, devido aos efeitos eletrônicos, determinados solventes desviam a emissão de fluorescência para comprimentos de onda maiores. Isso ocorre devido à interação entre o fluoróforo e o solvente, em especial quando o fluoróforo é polar. Tal interação tende a diminuir a energia do estado excitado da molécula e por isso faz com que o máximo de emissão de fluorescência seja deslocado para comprimentos de onda de menor energia quanto mais polar é o solvente utilizado (LAKOWICZ, 2006).

Tabela 2 – Comprimentos de onda (λ) de máxima emissão

| Comprimentos de onda (nm) | | | | |
|---------------------------|-------|-----|----------|-----|
| $\lambda_{exc.}$ | HEPES | PBS | Tris-HCl | TES |
| 280 | 330 | 328 | 329 | 327 |
| 295 | 332 | 333 | 333 | 332 |

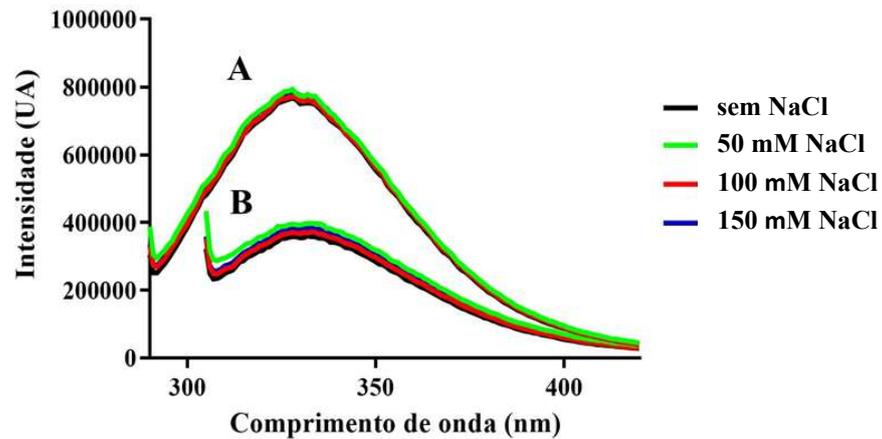
Fonte: Elaborado pelo autor.

Ainda nesse sentido, nota-se uma variação maior em relação a intensidade de emissão da proteína em cada tampão, principalmente no ensaio usando o tampão TES. Tal diferença pode ser atribuída a efeitos da ação de ciclos de congelamento e descongelamento da amostra utilizada. O que afeta diretamente a qualidade de materiais dessa natureza. Ressalta-se que a partir desse ensaio todas as amostras foram aliqüotadas em volumes adequados aos experimentos, de modo a preservar as características da amostra e evitar a propagação de erros nos experimentos posteriores.

4.4 Determinação da força iônica e investigação de metais na amostra

Seguindo um dos objetivos propostos no trabalho, a titulação fluorimétrica da cofilina-1 humana com cátions metálicos, realizou-se inicialmente um estudo de força iônica do meio, utilizando NaCl como eletrólito nos tampões PBS e HEPES. A necessidade de tais ensaios mesmo em tampões com força iônica constante, reside no fato de que interações meramente eletrostáticas podem ocorrer pela adição de metais a amostra, dado que macromoléculas apresentam, naturalmente, uma grande superfície de contato e cargas superficiais, e tais interações podem adicionar erros aos resultados desse tipo de ensaio. Interessa identificar interações sítio seletivas dos metais na cofilina-1 e não simplesmente seu efeito eletroneutralizador. Nesse sentido, observou-se a influência da força iônica na emissão de fluorescência da cofilina-1, utilizando o tampão HEPES 20 mM pH 7,4 adicionado de 50, 100 e 150 mM de NaCl.

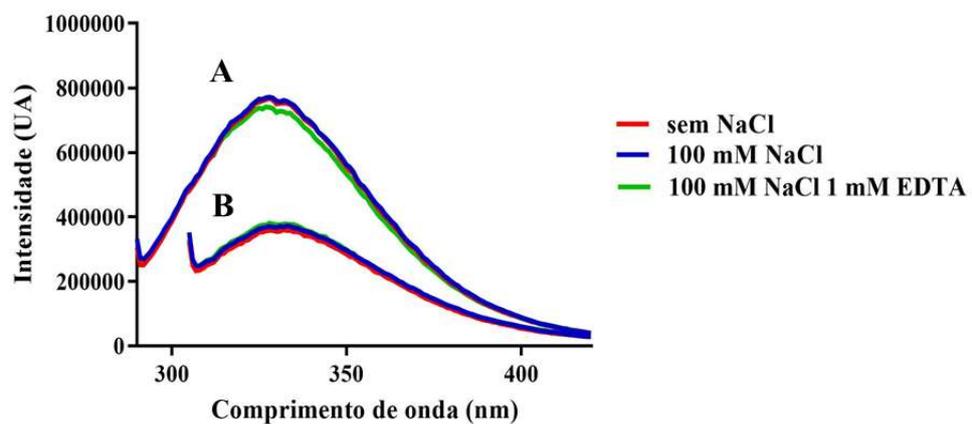
Figura 8 - Efeito da força iônica na emissão de fluorescência da proteína cofilina-1 humana. Em destaque os espectros de emissão obtidos pela excitação em 280 nm (A) e 295 nm (B) em tampão HEPES 20 mM pH 7,4, contendo concentrações variáveis de NaCl, usando 1,50 mm de abertura de fenda.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota-se que não há nenhuma mudança no perfil de fluorescência da amostra, com o pico de máxima emissão se mantendo na região já mencionada, em ambos os tampões. Esse resultado confere segurança ao uso de força iônica moderada a elevada sem o comprometimento do perfil de fluorescência da proteína. Adicionalmente, de modo a se certificar que a amostra se encontrava isenta de íon metálico, adicionou-se a cubeta 1 mM de EDTA, e mediu-se a fluorescência da amostra nessa condição. Convém mencionar que alguns íons metálicos podem atuar como supressores de fluorescência, assim, capazes eventualmente influenciar nos resultados das titulações fluorimétricas. A fim de checar se íons livres poderiam estar presentes influenciando as medidas, foi adicionado excesso de EDTA, agente quelante.

Figura 9 - Efeito da adição de EDTA na emissão de fluorescência da cofilina-1. Espectros de emissão obtidos pela excitação em 280 nm (A) e 295 nm (B) em tampão HEPES 20 mM pH 7,4, na presença e na ausência de NaCl e EDTA, usando fendas de 1,50 mm.



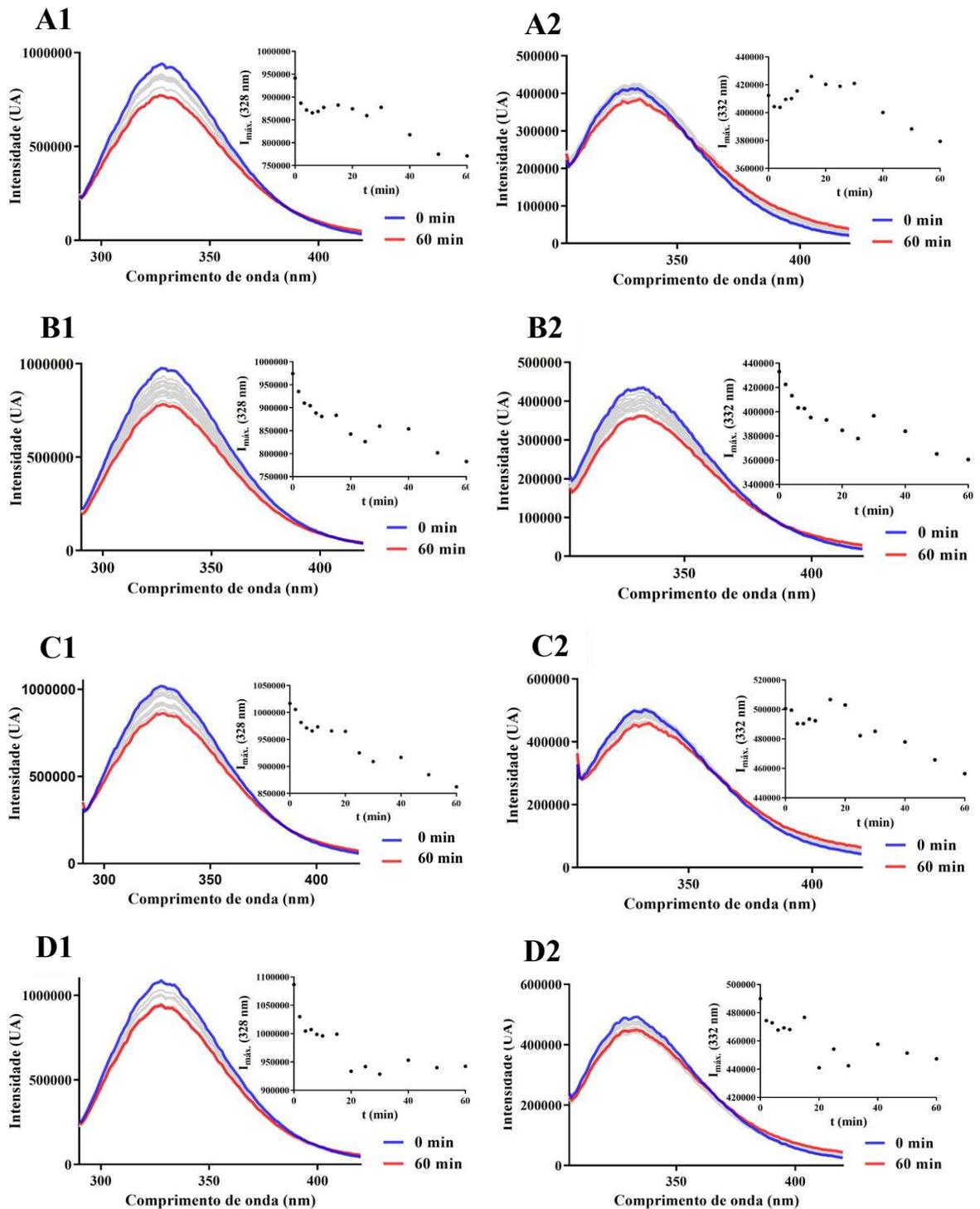
Fonte: Elaborado pelo autor.

Assim, após a adição de EDTA verificou-se, o perfil do espectro de emissão, o qual se mostrou inalterado pela presença do quelante. Na figura 9, percebe-se que os espectros da amostra, na ausência e na presença de EDTA, são semelhantes. Isso evidencia que a amostra deve se encontrar livre de íon metálico e, portanto, os eventuais resultados de supressão obtidos nos ensaios com os íons metálicos serão, muito provavelmente, devido aos efeitos de interação com a amostra de cofilina-1.

4.5 Otimização da fluorescência da cofilina-1 com adição de íons metálicos

Com o propósito de selecionar o tampão mais adequado para o tipo de ensaio proposto no trabalho, seguiu-se com a realização dos ensaios de adição de íons metálicos na amostra contida em tampão PBS e HEPES 20 mM pH 7,4 NaCl 100 mM. Nesse experimento observou-se, rapidamente, duas características marcantes. A precipitação dos íons metálicos Cu^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} e Fe^{3+} em tampão PBS, e a difícil estabilização da fluorescência da amostra quando adicionada de Fe^{3+} em tampão HEPES. A primeira observação pode ser atribuída à formação de sais de fosfato (PO_4^{3-}) pouco solúveis com os respectivos cátions. A segunda característica mostrou-se mais complexa, e diante disso, estudou-se a estabilidade da emissão de fluorescência em todos os tampões, mantendo a fenda de excitação aberta durante o período de 1 h, afim de investigar a causa de tal efeito supressor.

Figura 10 – Efeito da fenda de emissão aberta sobre a fluorescência da cofilina-1 durante 1 h de ensaio. Espectros de emissão da cofilina-1 2 μM e seus respectivos gráficos de supressão de fluorescência, intensidade máxima ($I_{\text{máx}}$) versus tempo (t), monitorados por 60 min, obtidos pela excitação em 280 nm (1) e 295 nm (2) usando fendas de 1,50 mm nos tampões HEPES (A), PBS (B), TES (C) e Tris-HCl (D) 20 mM pH 7,4 NaCl 100 mM, mantendo-se a fenda de excitação aberta durante os experimentos.

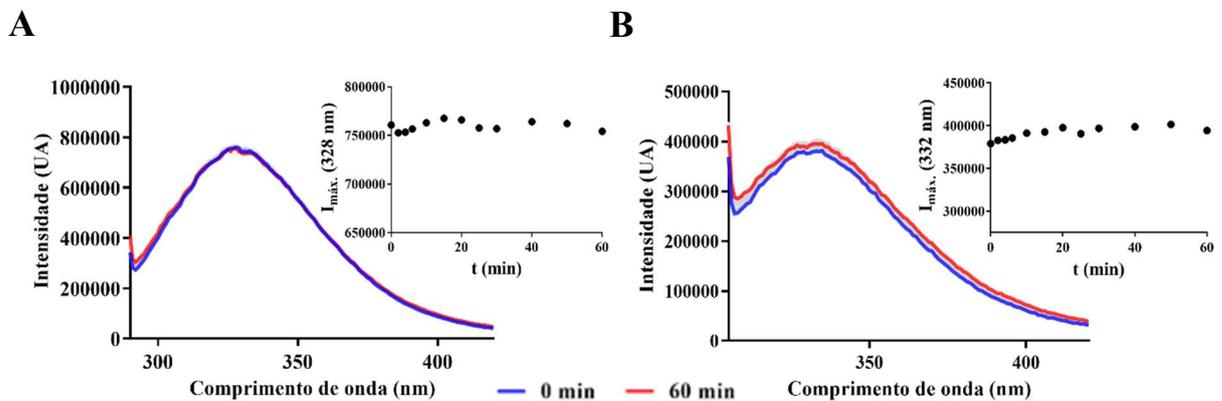


Fonte: Elaborado pelo autor

Essas medidas ilustraram que o efeito de supressão, que dificultava a análise, não deveria estar associado ao ferro e possivelmente não estaria associado ao tampão HEPES e sua potencialidade de geração de peróxido de hidrogênio como reportado em um estudo de 2013 (JEFFREY MORRIS; ZINSER, 2013), em que se demonstrou a geração de H_2O_2 , quando expostos a luz, em tampões de Good (GOOD et al., 1966), classe de tampões biológicos em que

HEPES, Tris-HCl e TES fazem parte. Entretanto, em nosso caso a amostra se comportou de maneira semelhante também em tampão PBS como mostrado em B1 e B2 na figura 10. Diante disso, realizou-se um ensaio adicional mantendo a fenda de excitação fechada após cada medida, sob o mesmo tempo de monitoramento, como mostrado na figura 11.

Figura 11 - Espectro de emissão para cofilina-1 2 μM e seus respectivos gráficos de supressão de fluorescência, intensidade máxima ($I_{\text{máx}}$) versus tempo (t), monitorados por 60 min, obtidos pela excitação em 280 nm, A, e 295 nm, B, usando fendas de 1,50 mm em tampão HEPES 20 mM pH 7,4 NaCl 100 mM, mantendo a fenda de excitação fechada durante o experimento.



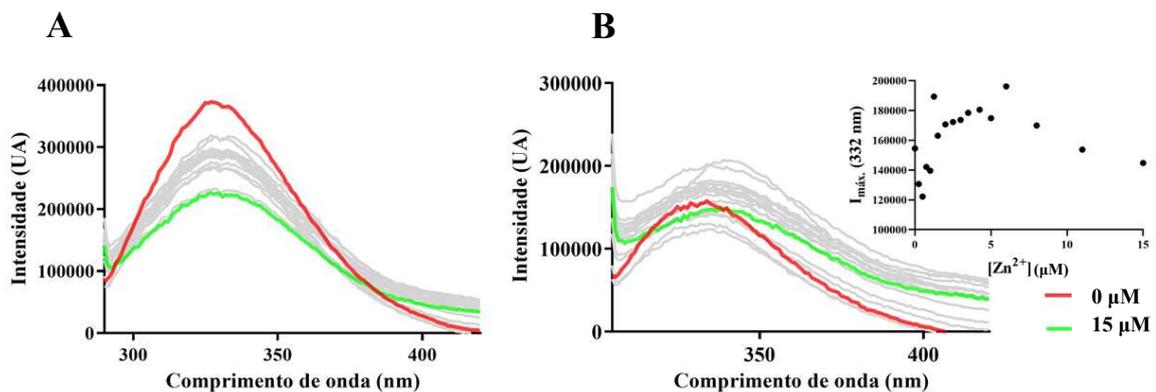
Fonte: Elaborado pelo autor

Interessantemente, a manutenção da fenda de excitação fechada ao fim de cada medida resultou na expressiva estabilização da fluorescência da amostra e, portanto, na preservação do perfil espectral da cofilina-1, como mostrado na figura 11. Isso sugere que a possível causa da supressão observada ao longo do tempo está relacionada especificamente com a luz incidida diretamente sobre amostra, visto que não há estudos indicando a geração de H_2O_2 em tampão PBS. Esse fenômeno, possivelmente, se trata de *photobleaching* da amostra, semelhantemente ao que ocorre com vários agentes fluorescentes. Desse modo, nota-se que é pouco interessante, do ponto de vista de exatidão, a realização de experimentos mantendo a amostra sob irradiação. Diante disso, conduziu-se todos os experimentos mantendo a fenda de excitação fechada após a realização de cada medida, de maneira a atenuar a propagação de erros em medidas posteriores.

4.6 Titulação da cofilina-1 humana com os cátions Zn^{2+} e Al^{3+} por fluorescência intrínseca

Na figura 12 apresenta-se ambos os espectros de emissão da proteína, antes e após a adição do íon, sendo o espectro foram perturbado pela adição de Zn^{2+} . Entretanto, observou-se, especialmente, um perfil de variação pouco linear relativo à emissão do resíduo de triptofano, quando excitado em 295 nm.

Figura 12 - Espectros de emissão fluorescência intrínseca da cofilina-1 sob adição de íons Zn^{2+} em tampão HEPES 20 mM pH 7,4 NaCl 100 mM. Em A, o espectro obtido pela excitação em 280 nm e, em B, o espectro obtido pela excitação em 295 nm e o seu respectivo gráfico de intensidade máxima ($I_{m\acute{a}x}$) versus concentração de Zn^{2+} .

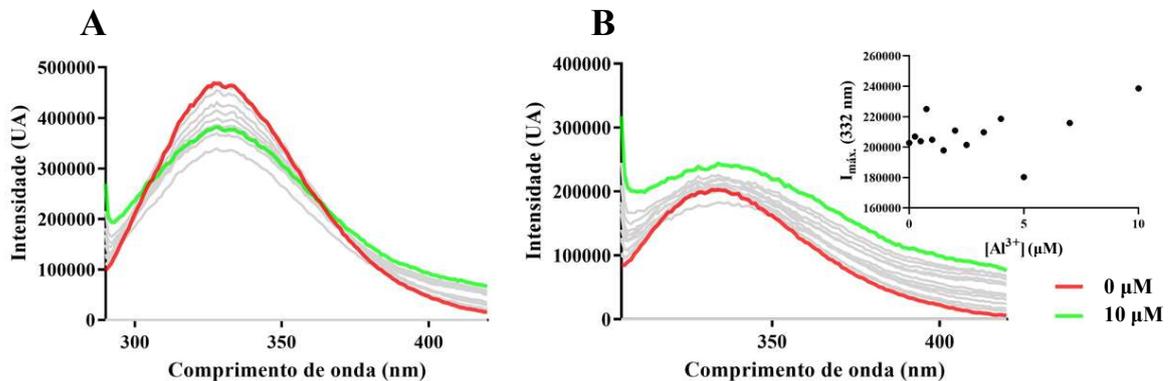


Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados apresentados na figura 12 sugerem que a proteína pode ter interagido com o íon metálico rapidamente, o que pode ter exposto o resíduo de triptofano ao solvente, diminuindo a sua emissão, que logo em seguida voltou ao ambiente hidrofóbico interno da proteína, fato notório pelo aumento do seu sinal de fluorescência no espectro da direita. Isso aparenta ter ocorrido visto que o último espectro obtido pela excitação em 295 nm encontra-se quase que sobrepuesto ao primeiro. Assim infere-se que a proteína, pelo menos nos arredores do triptofano, tenha possivelmente retornado à conformação inicial, com uma leve alteração, dado o modesto deslocamento da banda para o vermelho, observado com o aumento de zinco adicionado à amostra. Todavia, esse comportamento descrito é hipotético, e merece outros estudos para sua validação. Por outro lado, quando esse processo é investigado excitando outros

resíduos, o perfil geral não indica alteração no máximo de emissão, exceto a supressão da fluorescência da proteína com a adição de zinco.

Figura 13 - Espectros de emissão de fluorescência intrínseca da cofilina-1 sob adição de íons Al^{3+} . Em A, o espectro obtido pela excitação em 280 nm e, em B, o espectro obtido pela excitação em 295 nm e o seu respectivo gráfico de intensidade máxima versus concentração de Al^{3+} .



Fonte: Elaborado pelo autor

Diferentemente do que se observa para o zinco, o espectro relativo à emissão do resíduo de triptofano, figura 13 a direita, mostra-se menos irregular e com alteração do perfil e máximo de emissão, sendo no sentido de que o primeiro e o último espectro observados em ponto distintos. Esse comportamento, nesse contexto, pode sugerir uma mudança de local do resíduo de triptofano para um ambiente ainda mais apolar, ou seja, sugere-se que a proteína pode estar interagindo com o metal e tornando-se mais compactada. Convém mencionar que o íon Al^{3+} é relativamente leve e não se trata de espécie paramagnética, havendo assim pouca expectativa de que sua interação com a proteína provoque uma supressão de emissão, exceto se houve alterações conformacionais. O espectro de fluorescência obtido pela excitação em 280 nm mostra-se concordante com a interpretação, uma vez que nota-se a supressão do sinal de fluorescência em conjunto com pequena alteração no perfil do espectro. O que, portanto, pode indicar que mudanças conformacionais globais ocorreram na proteína titulada.

Ainda durante a execução dos ensaios notou-se uma demora relativamente alta para o sinal de fluorescência estabilizar, o que pode sugerir uma interação lenta entre o íon metálico e a proteína. De modo a reduzir esse efeito cinético sobre a medida, pode-se fazer a incubação da amostra de proteína com determinadas concentrações íons metálicos, e monitorar o tempo

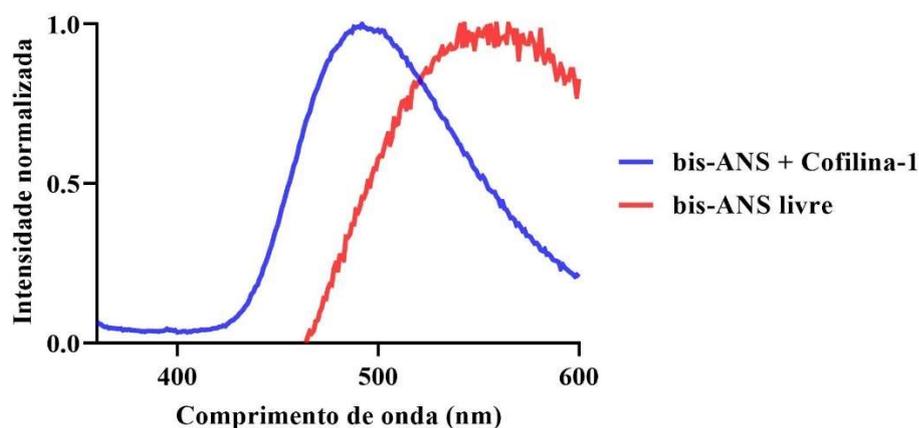
necessário para a estabilização do sinal. Tal abordagem pode ser uma alternativa para a obtenção de um resultado menos disperso, logo, de mais fácil interpretação.

Apesar de tais resultados sugerirem a ocorrência de interação com os metais, para ambos os casos, deve-se destacar que ensaios mais longos e em diferentes temperaturas devem ser realizados de forma a garantir que a supressão do sinal ocorra em razão de interações intermolecular e não meramente por colisão (supressão dinâmica).

4.7 Investigando o uso de bis-ANS como sonda para a cofilina-1

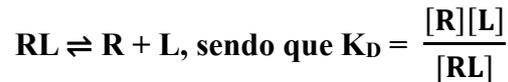
De modo a determinar a concentração ideal da sonda fluorescente extrínseca, realizou-se ensaios de saturação da cofilina-1 1 μM . Essa sonda apresenta um desvio expressivo de seu máximo de emissão para azul, o que é consistente com a diminuição da polaridade do microambiente que surge ao se ligar não covalentemente a sítios hidrofóbicos de proteínas (SHELUHO; ACKERMAN, 2001). Na figura 14 pode-se observar esse desvio quando se compara o máximo de emissão (excitada em 350 nm) da sonda livre e ligada à estrutura da macromolécula investigada.

Figura 14 - Espectros normalizados da sonda hidrofóbica bis-ANS livre e ligada a cofilina-1 em tampão PBS 20 mM pH 7,4 NaCl 100 mM.



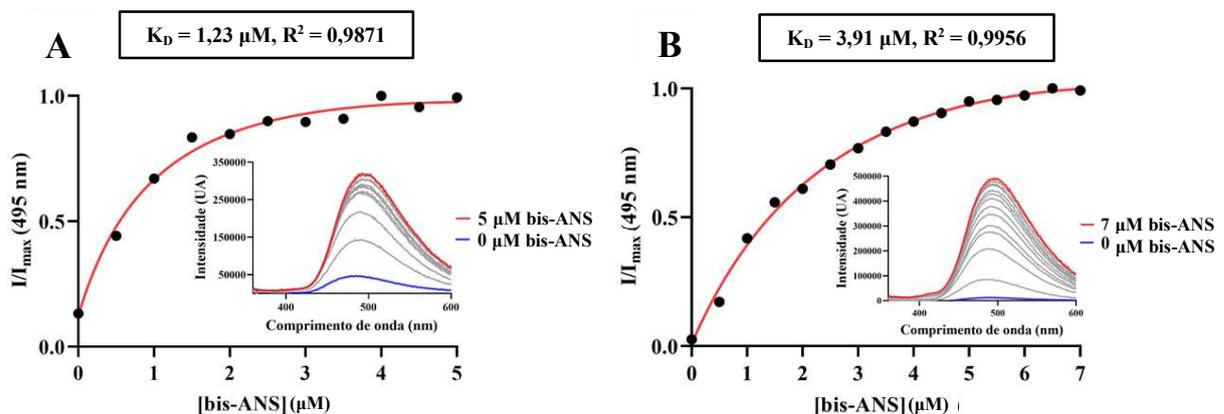
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os seguintes ensaios tiveram por objetivo determinar a constante de dissociação K_D relativa a interação entre o bis-ANS e a cofilina-1. Em bioquímica, o K_D é obtido considerando-se o equilíbrio entre um receptor R e um ligante L como descrito abaixo:



Essa constante é extremamente útil, pois revela quando metade, ou 50% dos sítios de interação do receptor estão ocupados com o ligante. Nesse momento, a concentração de ligante torna-se igual ao valor de K_D , e desse modo sabe-se qual concentração de ligante, nesse caso o bis-ANS, deve ser usado de modo a assegurar-se que a sonda se encontra ligada a proteína e, portanto, o sinal de fluorescência obtido refere-se, majoritariamente, ao complexo sonda-proteína.

Figura 15 - Curvas de saturação de bis-ANS titulada na cofilina-1, empregando-se tampão HEPES 20 mM pH 7,4 na ausência (A) e na presença (B) e de NaCl 100 mM usando abertura de fenda de 1,0 mm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

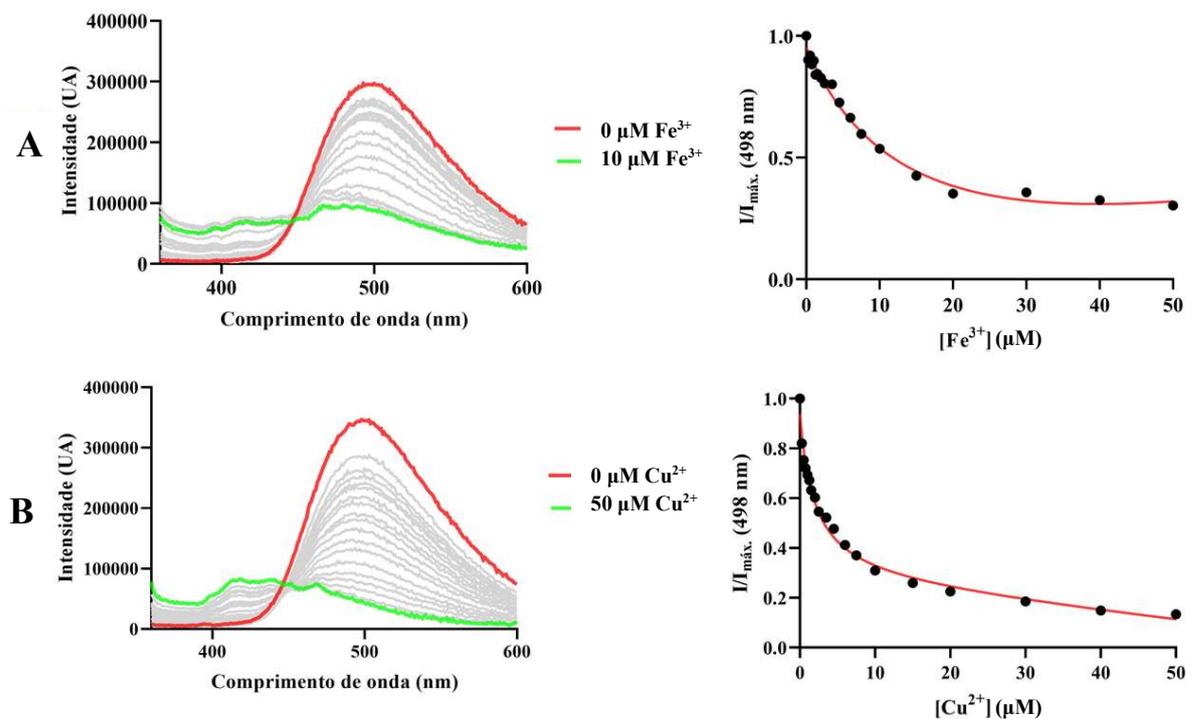
Sabendo disso, titulou-se a proteína em tampão HEPES 20 mM pH 7,4 na ausência e na presença de NaCl 100 mM até que fosse alcançada a saturação do sinal de emissão, o que indica a ocupação total dos sítios hidrofóbicos da cofilina-1 pela sonda hidrofóbica utilizada como titulante. Percebe-se pela figura 15 que a proteína interage de forma diferente com a sonda a depender a salinidade do meio. Assim, foi possível determinar uma constante de dissociação cerca de 3 vezes menor para o complexo cofilina-sonda em meio isento de NaCl, o que indica uma maior afinidade da sonda pela proteína em tampão sem sal. Tal resultado é interessante, porém para estudos envolvendo metais, como já mencionado, é necessário que a força iônica do meio esteja ajustada e, portanto, o K_D no valor de 3,91 μM mostra-se mais útil no contexto

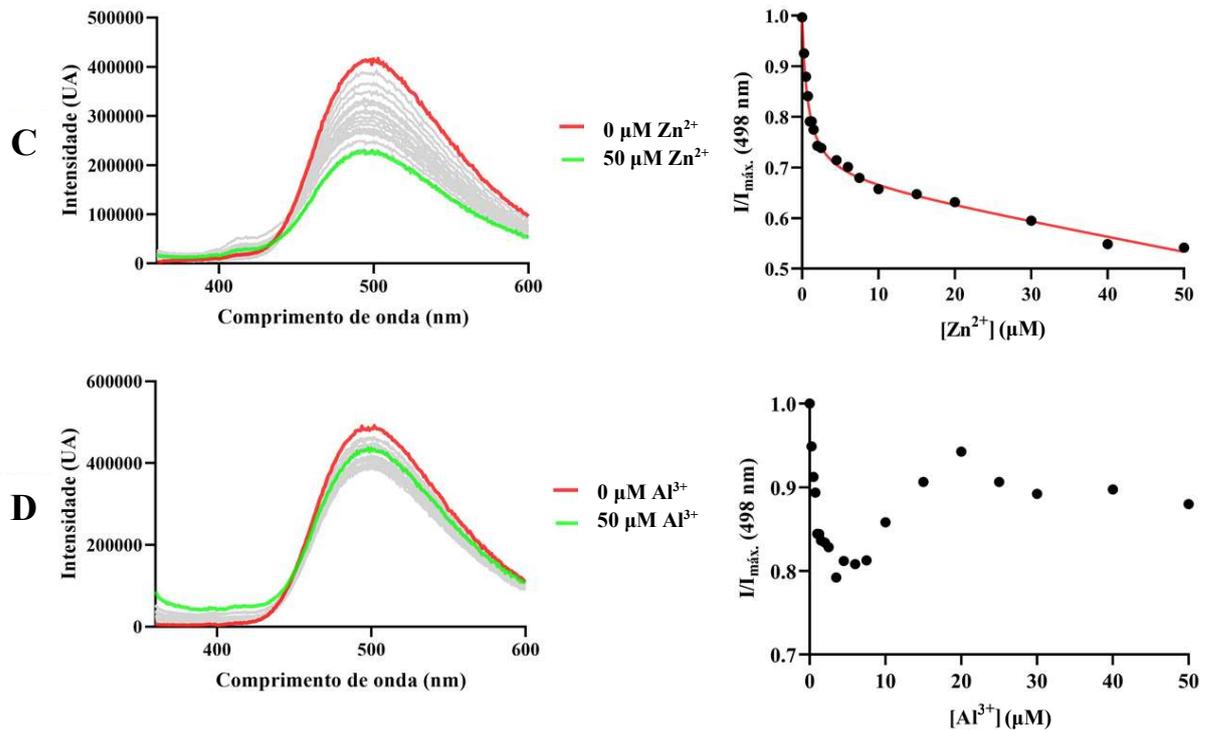
do presente trabalho. Nos estudos posteriores utilizou-se como base a concentração de 4 μM de bis-ANS para as titulações realizadas com a sonda e cofilina 1 μM em tampão HEPES 20 mM pH 7,4 NaCl 100 mM.

4.8 Titulação fluorimétrica com os cátions Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} e Al^{3+} por fluorescência extrínseca

Como mostrado na figura 16, todos os espectros de emissão foram alterados conforme adicionou-se metal ao complexo bis-ANS-cofilina-1 presente na cubeta.

Figura 16 - Espectros de emissão de fluorescência da sonda extrínseca bis-ANS ligada a cofilina-1 sob adição dos íons Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Al^{3+} . A esquerda o espectro obtido pela excitação em 350 nm e, a direita, o seu respectivo gráfico de intensidade máxima versus concentração de íons adicionados. Sendo A, B, C e D referentes as titulações fluorimétricas usando os cátions Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Al^{3+} , respectivamente, em tampão HEPES 20 mM pH 7,4 NaCl 100 mM usando abertura de fenda de 1,0 mm.





Fonte: Elaborado pelo autor.

Observou-se que os íons Fe³⁺ e Cu²⁺ podem ter causado uma alteração estrutural mais global na proteína, quando comparados com os íons Zn²⁺ e Al³⁺, devido a supressão quase que total do sinal de emissão do bis-ANS ligado a proteína, indicando a possível exposição dos sítios hidrofóbicos da cofilina-1, e conseqüentemente da sonda, ao ambiente polar do solvente. Nesse contexto, a saturação do sinal de fluorescência para o Fe³⁺, com respeito ao seu máximo de emissão, figura 16A, proporcionou a determinação da constante de dissociação K_D desse metal de forma indireta, cujo valor estimado foi de 16,8 μM (ajuste não linear, R² = 0,9844). Ainda que em ambos, mas de forma mais expressiva no caso do cobre, observa-se a formação de uma banda ao redor de 430 nm, ilustrando deslocamento para o azul, porém banda sem muita definição e distinta do bis-ANS livre.

Apesar da titulação com o íon cobre o sinal de emissão ainda apresentar-se em queda, ao fim da adição de 50 μM do metal a amostra, figura 16B, é nítida a queda dramática do sinal de emissão da sonda no início da titulação. Esse comportamento pode indicar uma afinidade significativa desse íon metálico pela proteína, o que pode estar relacionado com a afinidade desse metal por ligantes contendo átomos de enxofre, presente nos resíduos de cisteína da cofilina-1 e encontrado no sítio ativo de proteínas que apresentam o cobre como cofator, como por exemplo nas multicobre-oxidases azuis (KOMORI; HIGUCHI, 2010) que podem apresentar, também, metionina como resíduo coordenante ao cobre.

De modo similar ao cobre, a supressão do sinal de emissão da sonda para a titulação com o zinco, ocorreu de forma intensa, figura 16C. Porém, nota-se que mesmo após a adição de 50 μM de metal a amostra, o sinal de emissão ainda se encontra sob supressão, indicando que a interação, apesar de intensa no início, pode apresentar uma cinética lenta. Tal fato pode estar relacionado, assim como no caso do cobre, com a afinidade do zinco por átomos de enxofre, notável pela existência de diversas proteínas contendo um ou mais íons Zn^{2+} ligados aos resíduos de cisteína, como no caso das proteínas multifuncionais dedos de zinco (LAITY; LEE; WRIGHT, 2001). Como mostrado na titulação por fluorescência intrínseca, o último espectro relativo a excitação do resíduo de triptofano em 295 nm, mostrou-se similar, em termos de intensidade, com o espectro inicial da proteína isenta de Zn^{2+} . Tal fato ocorreu na concentração de 15 μM , curiosamente, a mesma concentração em que o gráfico da sonda, figura 16C à direita, apresentou uma estabilização momentânea. Nesse contexto, infere-se que, apesar de ambos os experimentos apresentarem concentrações máximas de zinco adicionado diferentes, os dois resultados estão de acordo, uma vez que o espectro obtido pela excitação em 280 nm encontra-se sob supressão, o que por fim, pode sugerir a existência de uma cinética de interação lenta entre o zinco e a cofilina-1.

Assim como mostrado previamente por fluorescência intrínseca, a adição de alumínio a amostra também perturbou o espectro de emissão de fluorescência da sonda, figura 16D, Todavia, nota-se que pode ter ocorrido apenas uma interação transiente com a proteína, uma vez que o seu espectro apresenta um mínimo em 4,5 μM de Al^{3+} adicionado, figura 16D a direita, similar ao que se observa no espectro obtido por fluorescência intrínseca pela excitação da proteína em 295 nm que ocorre por volta de 5 μM , figura 15 à direita. Esse perfil pode indicar um rearranjo conformacional da proteína, mas que merece maiores estudos. Observa-se também que tal interação sugere ter sido suficiente para alterar a conformação inicial da proteína, visto que o último espectro obtido se apresenta levemente suprimido em relação ao inicial e, portanto, está em concordância com o que se observou na titulação com alumínio via espectroscopia intrínseca da cofilina-1.

5 CONCLUSÃO

Nesse trabalho conduziu-se a expressão da proteína recombinante cofilina-1 humana em *E. coli* e foi iniciada sua purificação. Embora a proteína obtida ainda necessite ser posteriormente purificada e caracterizada, há indícios de que tenha sido obtida na sua forma nativa.

O uso da cofilina-1 previamente isolada possibilitou otimização de grande parte das rotinas de ensaios de fluorescência envolvendo a cofilina-1 humana. Nesse sentido, foi possível determinar, por exemplo, os valores de concentrações mais apropriadas da proteína para estudos de fluorescência, aberturas de fendas de excitação e emissão do fluorímetro, bem como determinar constantes de dissociação importantes referentes a interação proteína-sonda externa fluorescente (bis-ANS). Além disso foi possível descrever o comportamento emissivo dessa proteína em vários tampões biológicos, como PBS, HEPES, TES e Tris-HCl, o que auxiliará no desenvolvimento de experimentos futuros dessa natureza.

Por fim, através de titulação fluorimétrica da proteína cofilina-1 humana, seja por fluorescência intrínseca ou usando a sonda fluorescente bis-ANS, com os íons Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} e Al^{3+} , detectou-se uma possível interação da proteína com tais íons, com destaque para o íon férrico que apresentou uma constante de dissociação de 16,8 μM . Convém destacar os íons metálicos zinco e cobre, que sugerem uma propícia interação com sítios específicos da proteína, em particular e possivelmente, com os resíduos de cisteína dessa biomolécula. Tais íons são conhecidos por apresentarem afinidade aos átomos de enxofre das proteínas. Com isso, abrem-se novas oportunidades de se investigar o possível papel biológico desses metais frente à cofilina-1, considerando que no cérebro há quantidades consideráveis de íons zinco, por exemplo, e sua função pode ser bastante relevante.

6 REFERÊNCIAS

- AKBAR, S. MD.; SREERAMULU, K.; SHARMA, H. C. **Tryptophan fluorescence quenching as a binding assay to monitor protein conformation changes in the membrane of intact mitochondria**. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v. 48, n. 3, p. 241–247, 2016.
- AZZIZ, Y. B.-H. **O papel do cobre, ferro e zinco na doença de Parkinson**. Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2011.
- BEITZ, J. M. **Parkinson s disease a review**. *Frontiers in Bioscience*, v. S6, n. 1, p. S415, 2014.
- BERNSTEIN, B. W.; BAMBURG, J. R. **ADF/Cofilin: a functional node in cell biology**. *Trends in Cell Biology*, v. 20, n. 4, p. 187–195, 2010.
- BJORKLUND, G. et al. **Metals and Parkinson’s Disease: Mechanisms and Biochemical Processes**. *Current Medicinal Chemistry*, v. 25, n. 19, p. 2198–2214, 2018.
- BRADFORD, M. **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding**. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BURLEY, S. K. et al. **RCSB Protein Data Bank: biological macromolecular structures enabling research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology and energy**. *Nucleic Acids Research*, v. 47, n. D1, p. D464–D474, 2019.
- CALLIS, P. R. [7] **1La and 1Lb transitions of tryptophan: Applications of theory and experimental observations to fluorescence of proteins**. *Methods in Enzymology*, p. 113–150, 1997.
- CARBONI, E.; LINGOR, P. **Insights on the interaction of alpha-synuclein and metals in the pathophysiology of Parkinson’s disease**. *Metallomics: Integrated Biometal Science*, v. 7, n. 3, p. 395–404, 2015.
- CASTELLANI, R. J. et al. **Sequestration of iron by Lewy bodies in Parkinson’s disease**. *Acta Neuropathologica*, v. 100, n. 2, p. 111–114, 2000.
- CHRISTENSEN, K. et al. **Ageing populations: the challenges ahead**. *The Lancet*, v. 374, n. 9696, p. 1196–1208, 2009.
- DORSEY, E. R. et al. **Global, regional, and national burden of Parkinson’s disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016**. *The Lancet Neurology*, v. 17, n. 11, p. 939–953, 2018.
- DOUBLE, K. L. et al. **Impaired iron homeostasis in Parkinson’s disease**. *Advances in Research on Neurodegeneration*. Vienna: Springer Vienna, 2000. p. 37–58.
- DUONG-LY, K. C.; GABELLI, S. B. **Gel Filtration Chromatography (Size Exclusion Chromatography) of Proteins**. *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc., 2014. v. 541p.

105–114.

EXLEYT, C.; DEREK BIRCHALL, J. **The Cellular Toxicity of Aluminium.** Journal of Theoretical Biology, p. 83–938, 1992.

GHISAIDOOBE, A.; CHUNG, S. **Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques.** International Journal of Molecular Sciences, v. 15, n. 12, p. 22518–22538, 2014.

GOOD, N. E. et al. **Hydrogen Ion Buffers for Biological Research.** Biochemistry, v. 5, n. 2, p. 467–477, 1966.

HEINIG, M.; FRISHMAN, D. **STRIDE: a web server for secondary structure assignment from known atomic coordinates of proteins.** Nucleic Acids Research, v. 32, n. Web Server, p. W500–W502, 2004.

JAMESON, D. M. **Introduction to Fluorescence.** CRC Press, 2014.

JEFFREY MORRIS, J.; ZINSER, E. R. **Continuous hydrogen peroxide production by organic buffers in phytoplankton culture media.** Journal of Phycology, v. 49, n. 6, p. 1223–1228, 2013.

KLAMT, F. et al. **Oxidant-induced apoptosis is mediated by oxidation of the actin-regulatory protein cofilin.** Nature Cell Biology, v. 11, n. 10, p. 1241–1246, 2009.

KOMORI, H.; HIGUCHI, Y. **Structure and molecular evolution of multicopper blue proteins.** Biomolecular Concepts, v. 1, n. 1, p. 31–40, 2010.

KORTE, T.; HERRMANN, A. **pH-dependent binding of the fluorophore bis-ANS to influenza virus reflects the conformational change of hemagglutinin.** European Biophysics Journal, v. 23, n. 2, p. 105–113, 1994.

LAITY, J. H.; LEE, B. M.; WRIGHT, P. E. **Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity.** Current Opinion in Structural Biology, v. 11, n. 1, p. 39–46, 2001.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy Third Edition.** Springer, v. 3.

LANGLEY, C. H.; CHARLESWORTH, B. **alpha-Synuclein in Lewy bodies.** Nature, Vol 388, p. 839–840, 1997.

LOBÃO, J. B. DA S. et al. **Oxygen triggers signal transduction in the DevS (DosS) sensor of *Mycobacterium tuberculosis* by modulating the quaternary structure.** The FEBS Journal, v. 286, n. 3, p. 479–494, 2019.

LOPES, F. M. **Parkinson's disease: experimental in vitro model validation and the potential role of cofilin-1 in the pathophysiological mechanisms.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

LU, J.-X. et al. **Cloning, soluble expression, rapid purification and characterization of**

human Cofilin1. Protein expression and purification, v. 82, n. 1, p. 186–91, 2012.

MANOUCHEHRI, F. et al. **Experimental, computational and chemometrics studies of BSA-vitamin B6 interaction by UV–Vis, FT-IR, fluorescence spectroscopy, molecular dynamics simulation and hard-soft modeling methods**. Bioorganic Chemistry, v. 68, p. 124–136, 2016.

MAROTEAUX, L.; CAMPANELLI, J.; SCHELLER, R. **Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal**. v. 8, n. 8, p. 2804–2815, 1988.

MISSLER, G. L.; FISCHER, P. J.; TARR, D. A. **Inorganic chemistry**. Pearson, v. 5.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera - **A visualization system for exploratory research and analysis**. Journal of Computational Chemistry, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.

R C BETHELL; N M GRAY; C R PENN. **The kinetics of the acid-induced conformational change of influenza virus haemagglutinin can be followed using 1,1'-bis(4-anilino-5-naphthalenesulphonic acid)**. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 206, p. 355–361, 1995.

ROYER, C. A. **Fluorescence Spectroscopy**. Methods in Molecular Biology, v. 40, p. 65–90, 1995.

RUAN, K. et al. **Fluorescence and FTIR study of the pressure-induced denaturation of bovine pancreas trypsin**. European Journal of Biochemistry, v. 265, n. 1, p. 79–85, 1999.

SANTNER, A.; UVERSKY, V. N. **Metalloproteomics and metal toxicology of α -synuclein**. Metallomics: Integrated Biometal Science, v. 2, n. 6, p. 378–92, 2010.

SARKAR, N. et al. **Aging of Tubulin Monomers Using 5,5'-Bis(8-anilino-1-naphthalenesulfonate) as a Probe**. Biochemistry, v. 34, n. 41, p. 13367–13373, 1995.

SCHEIBER, I. F.; MERCER, J. F. B.; DRINGEN, R. **Metabolism and functions of copper in brain**. Progress in Neurobiology, v. 116, p. 33–57, 2014.

SHELUHO, D.; ACKERMAN, S. H. **An Accessible Hydrophobic Surface Is a Key Element of the Molecular Chaperone Action of Atp11p**. Journal of Biological Chemistry, v. 276, n. 43, p. 39945–39949, 2001.

SHI, L.; PALLEROS, D. R.; FINK, A. L. **Protein Conformational Changes Induced by 1,1'-Bis(4-anilino-5-naphthalenesulfonic acid): Preferential Binding to the Molten Globule of DnaK**. Biochemistry, v. 33, n. 24, p. 7536–7546, 1994.

SINDREWICZ, P. et al. **Intrinsic tryptophan fluorescence spectroscopy reliably determines galectin-ligand interactions**. Scientific Reports, v. 9, n. 1, p. 11851, 2019.

SOTO, C.; PRITZKOW, S. **Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases**. Nature Neuroscience, v. 21, n. 10, p. 1332–1340, 2018.

TEALE, F. W. J.; WEBER, G. **Ultraviolet fluorescence of the aromatic amino acids.** *Biochemical Journal*, v. 65, n. 3, p. 476–482, 1957.

WANG, C. et al. **Metalloimmunology: The metal ion-controlled immunity.** *Advances in Immunology*. Academic Press Inc., 2020. v. 145p. 187–241.

WANG, Y.; SHIBASAKI, F.; MIZUNO, K. **Calcium Signal-induced Cofilin Dephosphorylation Is Mediated by Slingshot via Calcineurin.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 13, p. 12683–12689, 2005.

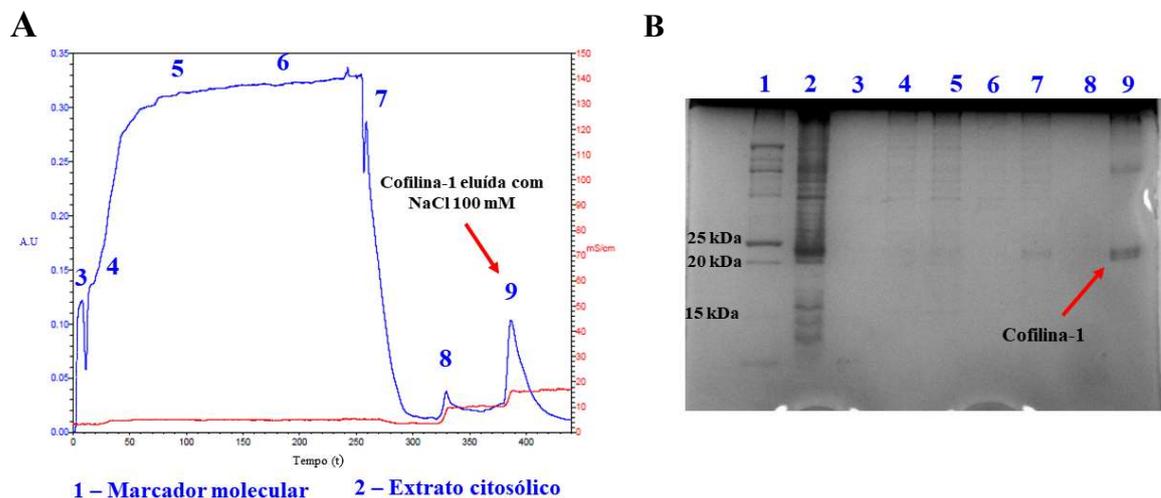
YAN, M. et al. **Cofilin 1 promotes the pathogenicity and transmission of pathological α -synuclein in mouse models of Parkinson's disease.** *npj Parkinson's Disease*, v. 8, n. 1, p. 1, 2022.

ZDANOV, S.; KLAMT, F.; SHACTER, E. **Importance of cofilin oxidation for oxidant-induced apoptosis.** *Cell Cycle*, v. 9, n. 9, p. 1675–1677, 2010.

ANEXO A – EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA COFILINA-1 HUMANA

Nesse procedimento de eletroforese em gel, observou-se que a fração eluída usando tampão PBS 20 mM pH 7,0 NaCl 100 mM, pico número 9 identificado no cromatograma da figura 17, ainda se encontrava impura e necessitaria passar por mais outra etapa de purificação cromatográfica. Isso pode ser evidenciado pela presença de outras bandas no gel, além da presença de uma banda logo acima daquela atribuída à cofilina-1. O uso de cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) pode ser interessante nesse contexto, visto que a coluna utilizada nesse tipo de técnica separa eficientemente proteínas de tamanhos diferentes, eluindo rapidamente as proteínas maiores e retendo na sua fase estacionária aquelas de tamanhos menores (DUONG-LY; GABELLI, 2014). Esse procedimento fora realizado no laboratório para essa proteína.

Figura 17 - Cromatograma e gel de eletroforese da purificação da proteína recombinante cofilina-1 expressada em *E. coli*. O cromatograma do procedimento usando CM50 (A), evidenciando o pico eluído em tampão PBS 20 mM pH 7,0 com NaCl 100 mM. O gel de poliacrilamida em condição desnaturante (B), exibe a banda relativa à cofilina-1 e os marcadores de proteínas.

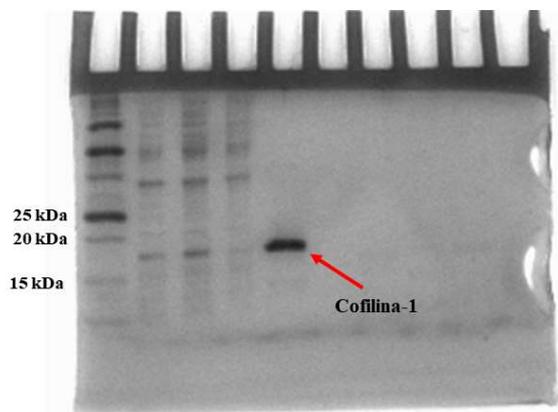


Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se ainda que a banda intensa no gel de eletroforese atribuída à cofilina-1 apresenta-se em uma região de peso molecular levemente acima da região esperada para o seu peso molecular de 18.5 kDa, já reportado na literatura. Como pode ser confirmado, também, pela comparação com outra banda presente no gel de uma purificação realizada em 2018, figura

18. Na qual expressou-se a cofilina-1 em quantidade significativa, cerca de 40 mg, e quantificou-se a sua concentração em $3.95 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$ por meio do ensaio de Bradford (BRADFORD, 1976), bem como foi realizado sequenciamento confirmando sua identidade. É importante esclarecer que se utilizou a cofilina-1 dessa expressão em todos os experimentos do presente trabalho.

Figura 18 - Gel de eletroforese referente a purificação realizada previamente (UFC, Dra. Ana Claudia Silva Gondim, coorientadora do presente trabalho). Em destaque a banda referente à proteína cofilina-1 e os marcadores moleculares.



Fonte: Disponibilizado pela Dra. Ana Cláudia Silva Gondim e modificado pelo autor.