UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

VITOR RENAUX HERING

Interação entre Proteínas Fluorescentes e Nanocristais de CdSe/ZnS

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
14/02/2007

VITOR RENAUX HERING

Interação entre Proteínas Fluorescentes e Nanocristais de CdSe/ZnS

Dissertação/Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra.Adelaide Faljoni-Alario

São Paulo
2007

Vitor Renaux Hering

Interação entre Proteínas Fluorescentes e Nanocristais de CdSe/ZnS.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Bioquímica

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedico esta tese à minha esposa Andrea,

ao nosso filho Tomás

e à memória do Dr. Thomaz de Aquino Collet e Silva

AGRADECIMENTOS

Ao longo do período em que desenvolvi minha tese de doutorado, muitos professores e colegas me esclareceram dúvidas, estimularam a perpetuar no processo de investigação científica e auxiliaram no uso de reagentes e equipamentos. Gostaria de agradecer primeiramente à minha orientadora, Profa. Adelaide Faljoni-Alario, pela liberdade que sempre concedeu e que me permitiu, em última instância, não apenas desenvolver um trabalho de pesquisa, mas também a encontrar, dentre as várias vertentes investigatórias, aquelas que despertavam o meu interesse vital.

Recorri com freqüência ao auxílio de vários professores e, após as conversas com estes, regressava ao meu laboratório esclarecido e motivado. O Prof. Mário Politi me permitiu, por diversas vezes, reencontrar o rumo da minha pesquisa. O Prof. Ivan Schumacher me fez vislumbrar os desdobramentos *in vivo* do sistema em estudo. O Prof. Etelvino Bechara freqüentemente me amparou em seu laboratório quando precisei lançar mão de equipamentos e reagentes adicionais. O Prof. Paulo Teng inseriu uma componente eletroquímica ao meu arsenal de técnicas, cujo valor, estou certo, trará importantes desdobramentos futuros. Com os colegas, em particular o Dr. Roberto Salinas, do Instituto de Química e o Dr. Victor Mammana, do Instituto de Física, pude compartilhar minhas cogitações sobre as aplicações tecnológicas das explorações científicas com as quais nos envolvemos. Também aponto meus agradecimentos aos cientistas Dr. Jim Broug, Dr. Gary Gibson e Dr. CC Yang, do laboratório da Hewlett-Packard de Palo Alto na Califórnia, pela experiência e confiança que me transmitiram para a manipulação e caracterização de processos envolvendo nanocristais. Agradeço

ao Dr. Jim Haselof por me ter fornecido o plasmídio codificando a proteína GFP5. Agradeço também ao amigo Henrik Monssen por me ter ajudado com a importação de reagentes críticos em momentos igualmente críticos. Agradeço aos Profs. Luiz Henrique Catalani e Bianca Zingales, membros da minha banca de qualificação, por terem conferido um caráter pragmático ao meu trabalho. Agradeço à minha família por me ter dado condições de encontrar na ciência o foco da minha atuação profissional. E, agradeço também a Dóris Araújo pelo bom humor e ajuda constante, e a todas as demais pessoas que de maneira mais indireta me ajudaram a perpetuar e aprofundar minhas pesquisas.

"... A Terra nasceu provavelmente de um acaso. Mas, de acordo com uma das leis mais gerais da evolução, esse acaso, mal apareceu, achou-se imediatamente utilizado, refundido em algo de naturalmente dirigido. Pelo próprio mecanismo de seu nascimento, a película em que se concentra e se aprofunda o Dentro da Terra, emerge diante dos nossos olhos, sob a forma de um todo orgânico onde é doravante impossível separar qualquer elemento dos outros elementos que o rodeiam. Novo insecável aparecido no âmago do grande insecável que é o universo. Verdadeiramente mesmo uma pré-biosfera. É desse invólucro – dele somente, mas dele inteiro – que vamos doravante nos ocupar. Sempre debruçados sobre os abismos do passado, observemos sua cor que vai cambiando. De idade para idade a tonalidade se intensifica. Algo vai explodir sobre a terra juvenil. A vida! Eis a vida!"

Pierre Teilhard de Chardin – O Fenômeno Humano

RESUMO

Hering, V.R. **Interação entre Proteínas Fluorescentes e Nanocristais de CdSe/ZnS**. 2007. 98p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Foram utilizadas proteínas da família das GFPs e nanocristais fluorescentes de CdSe/ZnS para caracterização da interação e verificação de transferência de energia por ressonância (FRET) entre estes compostos. Formou-se dois pares doador-receptor onde ora uma proteína figurava como doadora, ora um nanocristal ocupava este papel. Verificou-se que, em ambos os casos, o doador sofre supressão da fluorescência após a formação de complexo com o receptor, complexo este motivado por interação eletrostática e dependente de pH. Foi possível comprovar, através da observação de emissão sensitizada e redução da anisotropia, que entre o par formado por nanocristal com emissão no verde e proteína HcRed1 como receptora, de fato ocorre FRET. As distâncias aparentes entre doador e receptor foram determinadas a partir da eficiência da supressão da fluorescência do doador e da distância de Förster. As distâncias assim obtidas são compatíveis com as dimensões das proteínas e dos nanocristais.

Palavras-chave: proteínas fluorescentes, GFP, HcRed1, nanocristais, CdSe/ZnS, FRET.

ABSTRACT

Hering, V.R. **Interaction Between Fluorescent Proteins and CdSe/ZnS Nanocrystals**. 2007. 98p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Proteins belonging to the GFP family were used to characterize their interaction with fluorescent CdSe/ZnS nanocrystals and to verify the occurrence of resonance energy transfer (FRET) among these elements. Two donor-acceptor pairs were established, one having a protein as donor and the other having a nanocrystal as donor. In both cases the donor suffers quenching of its fluorescence after the formation of a complex with the acceptor. The complex formation is dependent on pH and is due to electrostatic interaction. It was possible to prove the occurrence of FRET between CdSe/ZnS nanocrystals emitting green fluorescence as donors and the protein HcRed1 as acceptor, through the detection of sensitized emission and anisotropy reduction. Apparent donor-acceptor distances were determined from efficiency measurements and Förster distances. The obtained distances agreed with the protein and nanocrystal dimensions.

Keywords: fluorescent proteins, GFP, HcRed1, nanocrystals, CdSe/ZnS, FRET.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Diagrama de fitas da GFP..... 13

Figura 2. Estruturas químicas de fluoróforos..... 14

Figura 3. Mecanismo de formação do cromóforo da GFP..... 18

Figura 4. Nanocristal de CdSe/ZnS..... 40

Figura 5. Mercaptoetanol..... 53

Figura 6. Ácido mercaptoundecanóico..... 53

Figura 7. GFP5 e nanocristais de ZnS..... 58

Figura 8. Supressão da fluorescência da GFP5..... 60

Figura 9. Dicroísmo circular da GFP5..... 62

Figura 10. Sobreposição entre os espectros da GFP5 e NCs vermelhos..... 64

Figura 11. Sobreposição entre os espectros dos NCs verdes e da HcRed1..... 70

Figura 12. Espectro de absorção dos NCs verdes..... 71

Figura 13. Supressão da fluorescência dos NCs verdes..... 72

Figura 14. Emissão sensitizada da HcRed1..... 73

Figura 15. Espectro de emissão da HcRed1..... 74

Figura 16. Efeito do pH sobre a emissão sensitizada da HcRed1..... 75

Figura 17. Espectro de anisotropia de excitação da HcRed1..... 77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GFP – Green Fluorescent Protein

HcRed1 – proteína vermelha com emissão no vermelho proveniente do coral *Hetercatis crispa*

BFP – Blue Fluorescent Protein

EBFP – Enhanced Blue Fluorescent Protein

NCs – nanocristais

QDs – Quantum Dots

MUA – ácido mercaptoundecanóico

CdSe/ZnS – nanocristais cujo núcleo é formando por seleneto de cádmio sendo recobertos com sulfeto de zinco

ZnS – nanocristais de sulfeto de zinco

FRET – Fluorescence Resonance Energy Transfer

pi – ponto isoelétrico

SUMÁRIO

1. Introdução..... 13

1.1. A família das GFPs..... 13
1.2. Impacto biotecnológico e biomédico das GFPs..... 15
1.3. Biosíntese do cromóforo da GFP..... 17
1.4. Diversidade química dos cromóforos presentes nas GFPs..... 18
1.5. Aprimoramento das propriedades biofísicas das GFPs por evolução dirigida..... 21
1.6. Transferência de energia..... 23
1.7. Características do FRET..... 24
1.8. Teoria da transferência de energia para um par doador-receptor..... 26
1.9. Visualização do FRET..... 30
1.10. O efeito da transferência de energia sobre a anisotropia..... 32
1.11. FRET entre proteínas marcadas e nanocristais fluorescentes..... 37

2. Objetivos 42

3. Materiais e métodos 44

3.1. Clonagem do plasmídio pET-gfp5..... 44
3.2. Transformação de *E. coli*..... 46
3.3. Expressão e purificação da GFP5..... 46
3.4. Quantificação da GFP5..... 48
3.5. O vetor pHcRed1..... 48
3.6. Transformação de *E. coli*..... 49
3.7. Expressão e purificação da HcRed1..... 50
3.8. Quantificação da HcRed1..... 51
3.9. Seqüência de aminoácidos da GFP5 e HcRed1..... 51
3.10. Nanocristais de ZnS..... 52
3.11. Centrifugação de nanocristais de ZnS complexados com proteínas..... 53
3.12. Nanocristais de CdSe/ZnS..... 53
3.13. Fluorimetria..... 54
3.14. Dicroísmo circular – CD..... 55

4. Resultados..... 58

4.1. Interação entre nanocristais de ZnS e proteínas fluorescentes..... 58
4.2. Interação entre nanocristais de CdSe/ZnS e a GFP5..... 59
4.3. Efeito do pH sobre a interação entre a GFP5 e nanocristais de CdSe/ZnS com emissão no vermelho..... 61
4.4. Verificação da conformação da estrutura secundária da GFP5 na presença de nanocristais..... 62
4.5. Sobreposição entre o espectro de emissão da GFP5 e o espectro de absorção dos nanocristais de CdSe/ZnS com emissão no vermelho..... 63

4.6. Eventual eficiência de FRET, distância de Förster e distância entre fluoróforos..... 64
4.7. Dificuldade na comprovação da ocorrência de FRET entre a GFP5 e os nanocristais de CdSe/ZnS..... 67
4.8. A proteína HcRed1 e nanocristais de CdSe/ZnS com emissão no verde..... 68
4.9. Sobreposição entre o espectro de emissão dos nanocristais de CdSe/ZnS com emissão verde e o espectro de excitação da HcRed1..... 69
4.10. Supressão da fluorescência dos nanocristais verdes na presença da HcRed1..... 71
4.11. Efeito do pH sobre a interação entre nanocristais de CdSe/ZnS com emissão no verde e a proteína HcRed1..... 74
4.12. Eficiência de FRET, distância de Förster e distância entre fluoróforos para o par envolvendo nanocristais de CdSe/ZnS com emissão no verde e a proteína HcRed1..... 75
4.13. Efeito da transferência de energia sobre a anisotropia da HcRed1..... 76

5. Discussão..... 79

6. Conclusões..... 83

7. Referências..... 84

1. Introdução

1.1. A família das GFPs

A GFP (Green Fluorescent Protein) é a fundadora de uma nova classe de proteínas (Wachter 2006, Tsien 1998). Este grupo de proteínas homólogas e coloridas é constituído por proteínas pequenas, compactas, com onze faixas beta formando uma estrutura denominada cilindro-β e que espontaneamente geram um fluoróforo (Ormo *et al*. 1996, Yang *et a.l* 1996) (figura 1).

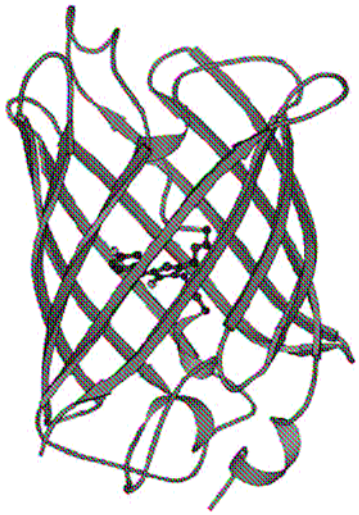


Figura 1. Diagrama de fitas da GFP apresentando o enovelamento em cilindro-β gerado a partir da resolução da estrutura da GFP-S65T por cristalografia de raios-X (Wachter 2006, Ormo 1996). O cromóforo está localizado no interior da proteína e representado por hastes e bolas.

Devido às cores brilhantes, que cobrem todo o espectro visível, estas proteínas são usadas extensivamente como ferramentas de pesquisa na Biologia Celular e Molecular (Tsien 1998). As várias cores são originadas a partir de uma entidade fluorescente que é gerada no interior da proteína através da modificação covalente de três resíduos de aminoácidos consecutivos, os quais fazem parte da cadeia

polipeptídica (figura 2). O cromóforo somente é gerado em condições que permitem o enovelamento da proteína, isto é, o polipeptídio precisa obter sua conformação tridimensional nativa para se tornar visivelmente fluorescente.

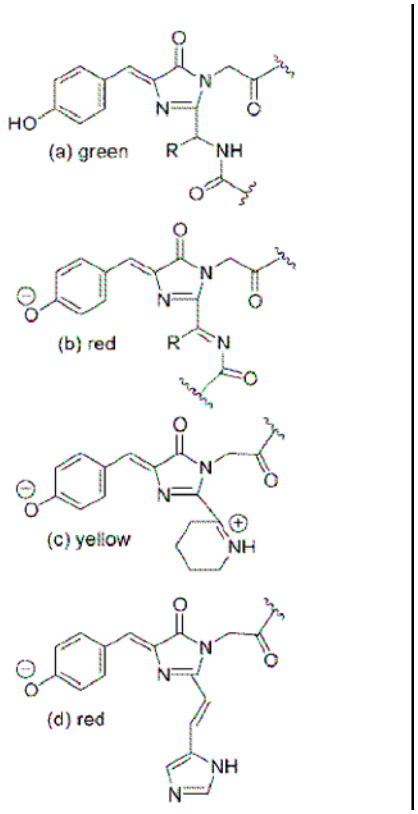


Figura 2. Estruturas químicas de cromóforos presentes em proteínas da família das GFPs: (a) GFP, (b) DsRed, (c) Zoanthos yellow, (d) Kaede (Wachter 2006).

A existência da GFP, proveniente da medusa do Pacífico Aequorea Victoria, em associação próxima com uma luciferase, foi pela primeira vez descrita por Shimomura (1979). O gene foi então clonado a partir do cDNA da medusa (Prasher *et al.* 1992) e o fluoróforo quimicamente caracterizado (Shimomura 1979, Cody *et al.* 1993, Niwa *et al.* 1996). A estrutura tridimensional da proteína foi determinada em 1996 por cristalografia de raios X (Ormo et al. 1996, Yang et al. 1996), e as propriedades físicas e bioquímicas do cromóforo foram caracterizadas em detalhe durante a última década (Tsien 1998).

Há alguns anos, uma série de proteínas semelhantes à GFP foram encontradas em corais e seu DNA foi clonado em seguida (Matz *et al.* 1999, Lukyanov *et al.* 2000, Matz *et al.* 2002). Alguns destes homólogos contém um sistema cromofórico π que é modificado a partir do estágio verde presente na GFP (Gross *et al.* 2000, Yarbrough *et al.* 2001, Wall *et al.* 2000), sugerindo que a GFP pode representar um dos sistemas mais simples e com o menor número de etapas químicas necessária para a maturação do cromóforo. Uma compreensão aprofundada das propriedades moleculares das GFPs pode ser obtida nas revisões que constam entre as referências (Tsien 1998, Matz et al. 2002, Zimmer 2002, Verkhusha e Lukyanov 2004).

1.2. Impacto biotecnológico e biomédico das GFPs

A família das GFPs tem profundo impacto na versatilidade das técnicas disponíveis para a biologia celular, inclusive para o estudo de doenças como o câncer, problemas de desenvolvimento, defeitos genéticos e contaminações virais (Tsien 1998, Zheng *et al.* 2006). A grande variedade de genes codificando estas sondas fluorescentes provê aos pesquisadores ferramentas poderosas para explorar eventos celulares, em particular quando utilizadas em conjunto com microscópios fluorescentes (Lippincott-Schwartz e Patterson 2003). Cerca de 200 novas publicações envolvendo GFPs aparecem no banco de dados PubMed todos os meses, sendo que muitas das publicações estão relacionadas a aplicações biomédicas tendo as GFPs como repórteres não invasivos (Wachter 2006). Um exemplo notório foi descrito num artigo a respeito da implantação de células tronco embrionárias, derivadas de ratos geneticamente transformados com GFP, em ratos normais. O resultado da implantação

das células tronco pôde ser monitorado e acompanhado visualmente (Meyer *et al.* 2005).

Um crescente número de GFPs tem sido desenvolvidas para aplicações em biosensores, com o intuito de monitorar mudanças bioquímicas no ambiente intracelular (Tsien 1998). Por exemplo, GFPs redox foram delineadas para determinar o potencial de óxido-redução no interior da mitocôndria (Hanson *et al.* 2004). Desta forma a obtenção de imagens dinâmicas e em tempo real dentro de células se torna possível (Dooley *et al.* 2004). A utilização de variantes da GFP como sensores de pH intracelular ou sensores de íons de cloro foi descrita há alguns anos (Elsliger *et al.* 1999, Jayraman *et al.* 2000, Wachter e Remington 1999). Aplicações em experimentos de marcação temporal, como os que utilizam GFPs como *timers* fluorescentes em biologia do desenvolvimento (Wachter e Remington 1999) já foram descritas, bem como membros desta família vem sendo utilizados como agentes de visualização em experimentos com múltiplas sondas e de FRET (Verkhusha e Lukyanov 2004, Shaner *et al.* 2004).

Uma variedade de experimentos demonstram, como técnicas de fotomarcação baseadas em GFPs, podem ser utilizadas para o estudo da dinâmica de eventos celulares em tempo real. GFPs fotoativáveis foram utilizadas para monitorar o movimento de proteínas dentro de células vivas (Lippincott-Schwartz e Patterson 2003), GFPs fotoalternáveis entre azul e verde foram empregadas no estudo da trajetória do transportador de dopamina humana em células vivas (Chudakov *et al.* 2004) e proteínas não fluorescentes denominadas “kindling” se tornam fluorescentes após irradiação com luz de um comprimento de onda específico (Chudakov *et al.* 2003). Uma técnica denominada *iluminação de proteínas* foi recentemente utilizada para observar o deslocamento de moléculas de sinalização entre o núcleo e o citoplasma, empregando

uma proteína fluorescente com propriedades fotocrômicas reversíveis (Ando *et al.* 2004). Tais experimentos de biologia celular são fascinantes e permitam visualizar e estudar biologia com uma precisão revolucionária, tanto no tempo quanto no espaço, e sua realização se fundamenta na propriedade das GFPs de atuarem como sondas não invasivas.

1.3 Biosíntese do cromóforo da GFP

A formação do cromóforo em proteínas da família das GFPs provém de uma modificação altamente não usual, posterior à tradução da proteína, que se dá espontanteamente, seguindo o enovelamento da proteína e que requer oxigênio. Foi demonstrado que o polipeptídio precursor, sintetizado quimicamente, é capaz de desenvolver fluorescência após o enovelamento em condições aeróbicas (Nishiuichi *et al.* 1998). O mecanismo autocatalítico (figura 3) é iniciado pelo fechamento de um anel que leva à formação de um grupo cilopentil, a partir dos átomos da cadeia principal do peptídeo precursor (Ser65, Tyr66 e Gly67 na GFP selvagem) (Cubitt *et al.* 1995, Heim *et al.* 1994). A completa maturação do cromóforo e, portanto, o desenvolvimento de fluorescência visível, requer etapas adicionais que seguem espontaneamente. Em todas as GFPs caracterizadas até hoje, estas etapas requerem pelo menos um evento oxidativo. Para gerar o cromóforo verde presente na GFP madura (figura 2a), o mecanismo contém uma ciclização, uma desidratação e uma oxidação (figura 3) (Cubitt *et al.* 1995). O cromóforo completamente conjugado somente se forma na presença de oxigênio molecular (Heim *et al.* 1994).

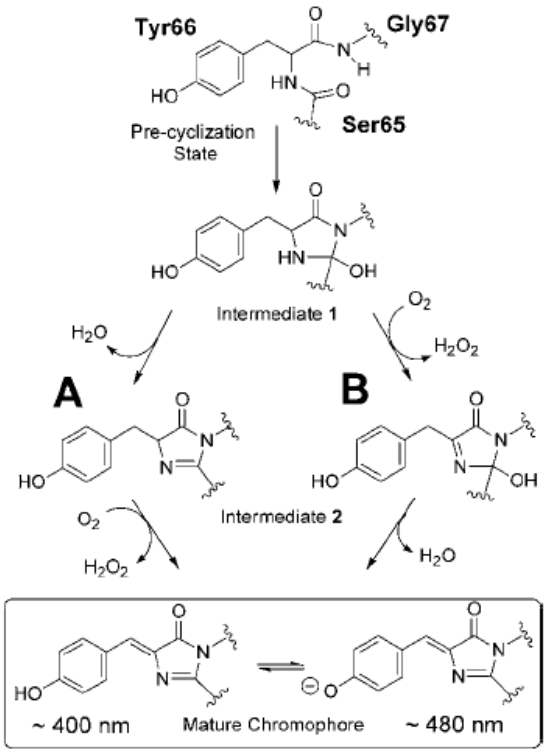


Figura 3. Mecanismo de formação do cromóforo da GFP. A ciclização do peptídeo é seguida pela eliminação de uma molécula de água e pela oxidação por oxigênio molecular, o que pode ocorrer antes ou depois. O cromóforo maduro da GFP coexiste em dois estados de carga (Wachter 2006).

Independentemente da cor final da proteína, a ciclização de um peptídeo da cadeia principal parece exercer um papel central na biosíntese do cromóforo. Esta reação de condensação ocorre cedo no processo de formação do cromóforo, iniciando o processo de modificação covalente, e parece ser comum a todas as GFPs. Não obstante uma seqüência peptídica característica, que codifique para esta modificação pós-tradução, ainda esteja por ser identificada, progresso significativo tem sido feito no entendimento da pré-organização estrutural da proteína e na contribuição de grupos catalíticos específicos para a geração do cromóforo (Barondeau *et al.* 2005, Barondeau *et al.* 2003, Rosenow *et al.* 2005, Rosenow *et al.* 2004, Sniegowski *et al.* 2005).

1.4 Diversidade química dos cromóforos presentes nas GFPs

Uma série de proteínas homólogas, relacionadas a GFP, foram clonadas durante os últimos anos, boa parte delas provenientes de corais e anêmonas (Matz *et al.* 1999, Lukyanov *et al.* 2000, *et al.* 2002). Estas proteínas são coloridas, cobrindo o azul esverdeado, verde, amarelo, laranja, vermelho e púrpura, e sendo responsáveis pela coloração vívida dos corais (Dove *et al.* 2001). A maior parte destas GFPs são fluorescentes sob luz UV ou visível, e constituem ferramentas promissoras para a biologia molecular. A partir de predições em função da seqüência primária ou da resolução da estrutura cristalina, foi demonstrado que o enovelamento de todas as GFPs é na forma de um cilindro-β, com 11 faixas beta com uma hélice no centro. Um processo de auto-modificação semelhante ao da GFP leva a alterações covalentes em tripeptídios análogos. Embora o primeiro dos três resíduos possa variar (Gln, His, Lys, etc.), o segundo e terceiro são consistentemente resíduos de tirosina e glicina, equivalentes à Tyr66 e Gly67 na GFP. Outros resíduos 100% conservados são os estruturalmente equivalentes à Arg96 e Glu222 que participam de funções catalíticas importantes nos processo de auto-modificação (Sniegowski *et al.* 2005). Dentre estas proteínas homólogas, algumas delas, em condições nativas, apresentam estrutura quaternária na forma de tetrâmeros (Karasawa *et al.* 2003, Nienhaus *et al.* 2003, Gurskayaa *et al.* 2001). Uma proteína da espécie de coral *Pocillopirin*, denominada *Rtms5*, é essencialmente não fluorescente, pois esta proteína contém um cromóforo semelhante à GFP porém com estrutura não coplanar (Prescott *et al.* 2003) o que a torna uma cromoproteína, o mesmo ocorrendo com a hcCP isolada do coral Heteractis Crispa (Gurskayaa *et al.* 2001). Outra cromoproteína, *asCP*, isolada da anêmona Anemonia Sulcata, inicialmente não é fluorescente, porém é convertida a uma forma

que fluoresce no verde quando irradiada com luz verde (Chudakov *et al.* 2004). Proteínas homólogas à GFP, com emissão mais para o vermelho, contém um sistema cromofórico π que é modificado para além do estágio verde, o qual parece ser um estado intermediário em todas estas proteínas (Gross *et al.* 2000, Yarbrough *et al.* 2001, Wall *et al.* 2000, Remington 2005). Na drFP583 (DsRed) de Discosoma (Yarbrough 2001) e na eqFP611 (Petersen *et al.* 2003), as modificações químicas adicionais incluem uma segunda etapa oxidativa que parece estar correlacionada com a formação de uma ligação peptídica cis (Tubbs *et al.* 2005). O resultado é uma extensão acilimínica do sistema cromofórico π ao longo da cadeia principal adjacente ao anel imidazolinônico (figura 2b).

Uma proteína amarela fluorescente de Zoanthus, zFP538, contém um cromóforo com três anéis (Remington *et al.* 2005), onde o terceiro anel leva a uma extensão do sistema π por uma ligação imina (figura 2c). O terceiro anel é gerado pela ciclização da cadeia lateral de uma lisina, aparentemente através de uma reação de transaminação que leva à clivagem da cadeia principal adjacente no interior da proteína. Um estado intermediário verde foi observado durante a maturação, que posteriormente se converte no espécime amarelo, provavelmente através do segundo estado intermediário vermelho acilamina (Remington *et al.* 2005). Uma proteína fluorescente laranja da anêmona Cerianthus foi recentemente cristalizada, porém a estrutura de seu cromóforo ainda é desconhecida (Ip *et al.* 2004). Um processo de fotoconversão de emissão em verde, para emissão em vermelho, foi caracterizada numa proteína denominada Kaede (Mizuno *et al.* 2003). Este processo também incorpora uma clivagem da cadeia peptídica principal adjacente ao cromóforo, embora o mecanismo deva ser diferente da zFP538. A forma vermelha da Kaede contém uma extensão do sistema π que é gerada

pela modificação da cadeia lateral de uma histidina (figura 2d). A forma acilamínica presente na DsRed não parece ser intermediária no processo de fotoconversão da Kaede.

Diversas proteínas com emissão verde-azulada são também parte do espectro de cores acessíveis para a família das proteínas homólogas à GFP. Um estudo apresentando a estrutura cristalina de alta definição e análise mutacional da proteína verde-azulada de Anemona majano concluiu que o deslocamento do verde para o verde-azulado tem sua origem principalmente no posicionamento de cadeias laterais positivas próximas ao fenolato do cromóforo (Henderson e Remington 2005), isto é, no cromóforo em si não foram observadas quaisquer modificações covalentes com relação ao cromóforo da GFP (figura 2a).

Independentemente da cor final, um cromóforo semelhante ao da GFP parece ser um estado intermediário em todas as cromoproteínas homólogas à GFP estudadas até o momento. Claramente, uma entidade química muito semelhante à presente na GFP proveniente de anêmona é sintetizada primeiro, para então gerar o amplo espectro de cores acessíveis à classe dos antozoários.

1.5 Aprimoramento das propriedades biofísicas das GFPs por evolução dirigida

Na literatura existem muitos exemplos de evolução dirigida aplicada à GFP e demais proteínas homólogas. Para ilustrar o sucesso desta prática, alguns exemplos específicos serão sumarizados. A proteína HcRed foi desenvolvida através de mutações sítio-dirigidas e mutações randômicas a partir da cromoproteína não fluorescente hcCP isolada da espécie de coral Heteractis Crispa (Gurskayaa *et al.*

2001, Wilmann *et al.* 2005). Apesar da HcRed conter apenas aproximadamente 21% de homologia na seqüência de aminoácidos com relação à GFP de Aequorea Victoria, aminoácidos críticos e motivos são conservados de modo que a HcRed também forma a característica estrutura de cilindro-β. O espectro de emissão da HcRed é deslocado em cerca de 140 nm com relação à GFP, sendo o pico de emissão em 645 nm. Inicialmente foram empreendidas 6 mutações à proteína precursora hcCP, com o objetivo de criar uma proteína fluorescente no vermelho distante e que tivesse maturação eficiente a 37ºC. No entanto, e de forma semelhante a outras cromoproteínas de corais, a proteína resultante HcRed apresentava uma tendência de formar tetrâmeros quando expressa em bactéria. Mutações adicionais resultaram numa forma dimérica ainda mais brilhante, denominada de HcRed1 (Gurskayaa *et al.* 2001).

Outro exemplo se extrai da própria GFP de Aequorea victoria. A GFP nativa tem limitações devido ao enovelamento ineficiente a temperaturas acima de 20ºC. Foi empreendido esforço para otimizar o enovelamento a temperaturas mais elevadas com o objetivo de facilitar a expressão da GFP a 37ºC tanto para aumentar o rendimento de sua expressão em bactéria quanto para aplicações em células de mamíferos. A GFP5 (Siemering *et al.* 1996) contém três mutações, bem como otimização na utilização de códons, que permitem sua expressão a 37ºC com alto rendimento.

Um terceiro exemplo selecionado reside na variação do espectro de emissão da GFP nativa. Uma das primeiras variantes em termos de cor da GFP foi a proteína fluorescente no azul (BFP). A BFP recebeu particular interesse pois o deslocamento para o azul permitiu, pela primeira vez, imagens com duas cores junto com a GFP (Heim e Tsien 1996). A substituição da Tyr66 presente no cromóforo por uma histidina resultou num deslocamento da emissão em direção ao azul com os picos de excitação

e emissão em 380 nm e 450 nm respectivamente (Heim *et al.* 1994). No entanto, o brilho desta proteína ainda era pobre de modo que adicionalmente foi empreendida a otimização da utilização dos códons e a mutação adicional Tyr145Phe que resultaram no aprimoramento da expressão e no aumento do brilho, gerando a *Enhanced Blue Fluorescent Protein*, EBFP (Yang *et al.* 1998).

1.6 Transferência de energia

Transferência de energia por ressonância ou *Fluorescence Ressonance Energy Transfer* (FRET) se tornou uma ferramenta amplamente utilizada em aplicações envolvendo fluorescência, incluindo diagnósticos médicos, análise de DNA e visualização ótica (Lakowicz 2006a). O amplo uso de FRET se deve às distâncias favoráveis para a transferência de energia, as quais são tipicamente do tamanho de uma proteína ou da espessura de uma membrana. Adicionalmente, a extensão do FRET é previsível a partir das propriedades dos fluoróforos. Se as propriedades espectrais dos fluoróforos permitirem FRET, ele ocorrerá e não será significativamente afetado pelas demais moléculas presentes na amostra (Lakowicz 2006a).

FRET é um fenômeno eletrodinâmico que pode ser explicado utilizando a Física clássica. FRET ocorre entre uma molécula doadora (D) no estado excitado e uma molécula receptora (R) no estado fundamental. As moléculas doadoras usualmente emitem em um comprimento de onda menor que se sobrepõe com o espectro de absorção do receptor. A transferência de energia ocorre sem o aparecimento de um fóton, sendo o resultado de uma interação dipolo-dipolo de longo alcance entre o doador e o receptor (Förster 1948, Clegg 1996). A taxa de transferência de energia

depende da extensão da sobreposição espectral entre o espectro de emissão do doador e do espectro de absorção do doador, da eficiência quântica do doador, da orientação relativa entre os dipolos de transição do doador e receptor, e da distância entre as moléculas doadoras e receptoras.

Uma aplicação comum para o FRET é medir distâncias entre dois sítios em uma macromolécula. Tipicamente uma proteína é covalentemente marcada com um doador e um receptor. Em estudos de estrutura de proteínas o doador é freqüentemente um resíduo de triptofano. Se houver apenas um doador e um receptor e se a distância entre D-R não mudar durante o tempo de vida do estado excitado, então a distância entre D-R poderá ser determinada por medidas da extensão da supressão da fluorescência do doador, devido ao receptor, sem necessidade de resolução temporal (Lakowicz 2006a).

FRET também é utilizado em estudos em que a distância D-R não é medida. Se a amostra contiver dois tipos de macromoléculas individualmente marcadas com doador e receptor, a associação entre as moléculas pode ser observada através de FRET. A observação de FRET é adequada para medir a interação entre moléculas, mesmo sem calcular a distância D-R entre elas (Lakowicz 2006a).

1.7 Características do FRET

A distância na qual a eficiência do FRET é de 50% é chamada de distância de Förster (Förster 1948), a qual geralmente fica entre 20 e 60 Á. A taxa de transferência de energia do doador para o receptor $k_T(r)$ é dada por (Lakowicz 2006a)

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D^{-1}}\left(\frac{R_0}{r}\right)^6 \qquad (1)$$

onde τ_D é o tempo de decaimento do doador na ausência do receptor, R_o é a distância de Förster, e r é a distância doador-receptor. Portanto, a taxa de transferência é igual a taxa de decaimento do doador ($1/\tau_D$) quando a distância D-R é igual à distância de Förster (R_0) e a eficiência da transferência é de 50%. A taxa de FRET depende fortemente da distância, sendo proporcional a r^{-6}.

Distâncias de Förster entre 20 e 90 Á são convenientes para o estudo de macromoléculas biológicas (Lakowicz 2006a). Estas distâncias são comparáveis ao tamanho das macromoléculas e à distância entre sítios ou sub-unidades. Quaisquer condições que afetem a distância D-R afetarão a taxa de transferência, permitindo a quantificação da mudança na distância.

A utilização da transferência de energia como um indicador de proximidade ilustra uma importante característica deste fenômeno. Transferência de energia, pode-se prontamente assumir ocorrer, sempre que doadores e receptores estiverem caracteristicamente dentro da distância de Förster, e sempre que houver uma sobreposição espectral adequada. O valor de R_0 pode ser predeterminado a partir das propriedades espectrais dos doadores e receptores. A transferência de energia é, em grande parte, independente do solvente intersticial e de outras moléculas (Lakowicz 2006a). Em princípio, a orientação entre doador e receptor pode inibir a transferência de energia entre pares D-R, porém tal situação é rara e possivelmente inexistente em biomoléculas. Portanto, se pode assumir que o FRET ocorrerá se as propriedades espectrais forem adequadas e a distância D-R for comparável a R_0 (Lakowicz 2006a).

É importante lembrar que transferência de energia por ressonância é um processo que não envolve a emissão e reabsorção de fótons. A teoria da transferência de energia é baseada no conceito de um fluoróforo como um dipolo oscilante, o qual pode trocar energia com outro dipolo com uma freqüência de ressonância semelhante (Clegg 1996). Portanto o FRET é semelhante ao comportamento de osciladores acoplados. Em contraste, transferência de energia radiativa é devida à absorção e reemissão de fótons e, portanto, devida a efeitos internos de filtro. A transferência radiativa depende de propriedades óticas não moleculares, como o tamanho da cubeta, a dimensão do caminho ótico, a densidade ótica, os comprimentos de excitação e emissão, bem como a geometria dos caminhos óticos de excitação e emissão. Contrastando com estes fatores triviais, a transferência de energia não-radiativa contém informações estruturais valiosas a respeito do par doador-receptor (Lakowicz 2006a).

Transferência de energia por ressonância contém informações moleculares diferentes das reveladas pelo relaxamento causado por solventes, reações de estado-excitado, supressão da fluorescência, ou anisotropia. Estes demais fenômenos dependem de interações com outras moléculas na camada de solvatação próxima. Tais interações são menos importantes para a transferência de energia, exceto por seus efeitos sobre as propriedades espectrais do doador e receptor. Transferência de energia não-radiativa é efetiva sob distâncias muito maiores e as moléculas circundantes tem reduzido efeito sobre a eficiência da transferência de energia, a qual depende principalmente da distância D-R (Lakowicz 2006a).

1.8 Teoria da transferência de energia para um par doador-receptor

A teoria do FRET é moderadamente complexa, tendo equações semelhantes sido derivadas a partir de considerações clássicas ou provenientes da mecânica quântica. Uma revisão recente sobre as bases físicas do FRET está presente na referência em Clegg (1996). Serão aqui descritas apenas as equações finais. Estarão sendo considerados apenas um par doador-receptor, separados por uma distância (r). A taxa de transferência do doador para o receptor separados por uma distância r é dada por (Lakowicz 2006a)

$$k_T(r) = \frac{Q_D \kappa^2}{\tau_D r^6}\left(\frac{9000(\ln 10)}{128\pi^5 N n^4}\right)\int_0^\infty F_D(\lambda)\varepsilon_R(\lambda)\lambda^4 d\lambda \qquad (2)$$

onde Q_D é a eficiência quântica do doador na ausência do receptor, n é o índice de refração do meio, N é o número de Avogadro, r é a distância entre doador e receptor, e τ_D é o tempo de vida do doador na ausência do receptor. O índice de refração (n) é tipicamente assumido como sendo 1,4 para biomoléculas em solução aquosa. $F_D(\lambda)$ é a intensidade corrigida da fluorescência do doador no intervalo entre λ e $\lambda + \Delta\lambda$ sendo a intensidade total (área sob a curva) normalizada à unidade. $\varepsilon_R(\lambda)$ é o coeficiente de extinção do receptor em λ, tipicamente com as unidades de $M^{-1}cm^{-1}$. O termo κ^2 é um fator descrevendo a orientação relativa no espaço entre os dipolos de transição do doador e receptor. κ^2 é usualmente assumido ser igual a 2/3, o que é apropriado para uma média randômica dinâmica para doador e receptor (Lakowicz 2006a). O valor de κ^2 pode, no entanto, se distanciar do valor 2/3 em particular em sistemas envolvendo proteínas fluorescentes onde os tempos de correlação rotacional são algumas vezes maiores do que o tempo de vida da fluorescência (Jares-Erijman e Jovin 2003).

A integral de sobreposição (J) expressa o grau de sobreposição espectral entre a emissão do doador e a absorção do receptor:

$$J = \int_0^\infty F_D(\lambda)\varepsilon_R(\lambda)\lambda^4 d\lambda \qquad (3)$$

$F_D(\lambda)$ não tem dimensões. Se $\varepsilon_R(\lambda)$ for expressa em unidades de $M^{-1}cm^{-1}$ e λ em nanômetros, então J estará em unidades de $M^{-1}cm^{-1}nm^4$.

Quando se projeta um experimento é mais fácil pensar em termos de distâncias do que em taxas de transferência. Por esta razão a equação 2 pode ser escrita em termos da distância de Förster R_0. Nesta distância, metade das moléculas do doador decaem por transferência de energia e a outra metade decai pelas taxas usuais radiativas e não-radiativas. A partir das equações 1 e 2 e com $K_T(r) = \tau_D^{-1}$ obtém-se

$$R_0 = 0{,}211(\kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda))^{1/6} \qquad \text{(em ângstrons)} \qquad (4)$$

Uma vez obtido o valor de R_o a taxa de transferência pode ser calculada

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D^{-1}}\left(\frac{R_0}{r}\right)^6 \qquad (1)$$

Se a taxa de transferência for muito maior do que a taxa de decaimento, então a transferência de energia será eficiente. Se a taxa de transferência for menor do que a

taxa de decaimento, então pouca transferência ocorrerá durante o tempo de vida do estado excitado e o FRET será ineficiente.

A eficiência da transferência de energia (E) é a fração de fótons absorvidos pelo doador que são transferidos para o receptor. Esta fração é dada por (Lakowicz 2006a)

$$E = \frac{k_T(r)}{\tau_D^{-1} + k_T(r)} \qquad (5)$$

a qual é a razão da taxa de transferência pela taxa total de decaimento do doador na presença do receptor. Substituindo a equação 1 em 5, temos

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \qquad (6)$$

Esta equação mostra que a eficiência da transferência é fortemente dependente da distância quando a distância D-R é próxima a R_0. A eficiência rapidamente vai a 1 quando a distância se torna menor do que R_0. Se r = 0,1R_0, a eficiência da transferência de energia é 0,999999, indicando que a emissão do doador não seria observável. Por outro lado, a eficiência da transferência rapidamente vai a zero se r for maior do que R_0. Por E ser fortemente dependente da distância, medidas da distância (r) são confiáveis apenas quando r está dentro de um fator 2 de R_0. Se r é o dobro de R_0 (r = 2R_0) a transferência de energia é de 1,54%, e se r = 0,5R_0 a eficiência é de 98,5%. Não é adequado utilizar FRET para medir distâncias fora do intervalo r = 0,5R_0 a r = 2R_0 (Lakowicz 2006a).

A eficiência da transferência é geralmente medida utilizando a intensidade de fluorescência relativa do doador, na ausência (F_D) e na presença (F_{DR}) do receptor:

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \qquad (7)$$

É importante lembrar que a equação 7 somente é aplicável para pares doador-receptor separados por uma distância fixa, uma situação freqüentemente encontrada em proteínas marcadas.

1.9 Visualização do FRET

Fenômenos biológicos se baseiam nos processos físico-químicos fundamentais de ligação molecular, associação, mudança conformacional, difusão e catálise. A estrutura hierárquica estabelecida no nível das organelas, células, tecidos e organismos é imposta através de um extensa rede de mecanismos em cascata e de realimentação baseados nestas reações. Portanto, para se empreender a “bioquímica da célula” é imperativo elucidar as distribuições espaço-temporais e os estados funcionais das moléculas constituintes. A microscopia de fluorescência é perfeitamente adequada para esta tarefa por gerar contraste ao explorar as muitas manifestações da emissão de luz: sensibilidade, seletividade, e modulação através de reações nos estados eletrônicos fundamental e excitado. Entre estas, o FRET é único por prover sinais sensíveis à distâncias intra e intermoleculares no intervalo entre 1-10 nm. Portanto o FRET é capaz de explorar interações moleculares e conformações com uma resolução que supera em

muito o limite difracional inerente (~ $\lambda/2$) da microscopia ótica convencional (Jares-Erijman e Jovin 2003).

Existe um amplo e crescente conjunto de técnicas para a caracterização de FRET, envolvendo a medição de grandezas como intensidade da fluorescência do doador e da fluorescência sensitizada do receptor, tempo de vida da fluorescência do doador na presença e ausência do receptor, sistemas nos quais se pode modular a emissão do doador ou a absorbância do receptor, medidas da anisotropia da emissão, bem como técnicas que utilizem medições combinadas destas grandezas como, por exemplo, a caracterização do tempo de vida correlacionada a medidas de anisotropia. O importante é selecionar uma técnica que permita contornar as limitações inerentes a um dado sistema em estudo de modo a se caracterizar o FRET da maneira mais precisa e adequada possível (Jares-Erijman e Jovin 2003).

Em sistemas bem definidos, onde há um único doador e um único receptor, a medição da razão das intensidades fluorimétricas pode ser calibrada de modo a fornecer a eficiência do FRET. Esta técnica pode ter complicações na sua implementação devido à necessidade de correções relacionadas à sobreposição dos sinais relativos ao doador e receptor e, em particular devido à excitação direta do receptor (Jares-Erijman e Jovin 2003).

A determinação direta do tempo de vida da fluorescência provê uma das mais diretas medidas de FRET. Sendo uma técnica relativamente insensível a variações na concentração e no caminho ótico. Porém, no caso particular em que a eficiência do FRET é próxima a 100%, a fluorescência do doador referente à fração populacional sofrendo FRET é completamente suprimida, de modo que o tempo de vida observado

para o doador corresponde exclusivamente à fração populacional que não está sofrendo FRET (Songa e Jares-Erijman 2002).

1.10 O efeito da transferência de energia sobre a anisotropia

A medição da anisotropia da fluorescência provê uma poderosa ferramenta à bioquímica. Sob excitação com luz polarizada a emissão de diversas amostras também é polarizada. A extensão da polarização da emissão é descrita em termos da anisotropia (r). A origem da anisotropia reside na existência de momentos de transição para a absorção e emissão com direções específicas dentro da estrutura do fluoróforo. A anisotropia pode ser diminuída por fatores externos que atuam durante o tempo de vida do estado excitado. Estes incluem difusão rotacional do fluoróforo e transferência de energia por ressonância (FRET) entre fluoróforos. Ambos os processos resultam em um deslocamento angular adicional do oscilador da emissão e, portanto, menor anisotropia (Lakowicz 2006b). No caso da GFP, o tempo de vida da fluorescência é bastante menor do que o tempo de correlação rotacional (Swaminathan *et al.* 1997), de modo que a difusão rotacional provoca reduzido efeito sobre o valor da anisotropia desta proteína. Por outro lado, um evento de transferência de energia não radiativa (FRET) pode impor uma redução significativa ao valor inicial da anisotropia (Lakowicz 2006b e Jablonski 1970). A emissão sensitizada, isto é, a emissão do receptor devida à transferência de energia, é altamente despolarizada porque a orientação da luz emitida não é completamente restringida pela polarização da excitação (Rizzo e Piston 2005), o que permite obter mensurações de FRET com alta sensibilidade e contraste. Esta abordagem tem também a vantagem de eliminar falsos positivos, porque artefatos

sistemáticos, tais como a excitação cruzada do receptor, resultam no aumento da anisotropia. Esta técnica, no entanto, é inadequada para a situação na qual o receptor não apresenta fluorescência polarizada, pois neste caso não é possível distinguir a emissão sensitizada da eventual emissão devida à excitação cruzada, pois ambas seriam naturalmente despolarizadas.

Geralmente, ao se executar uma medida de anisotropia, a amostra é excitada com luz verticalmente polarizada. A intensidade da emissão é medida através de um polarizador. Quando o polarizador da emissão é orientado em paralelo (||) à direção do polarizador da excitação a intensidade observada é denominada $I_{||}$. Quando a polarizador é posicionado perpendicularmente ($\perp$) à excitação a intensidade é denominada $I_{\perp}$. Estes valores de intensidade são utilizados para calcular a anisotropia (Lakowicz 2006b)

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}} \qquad (8)$$

A anisotropia é uma quantidade sem dimensão e independente da intensidade total da amostra. Isto porque a diferença ($I_{||}$ - $I_{\perp}$) é normalizada pela intensidade total, que é dada por $I_T = I_{||} + 2I_{\perp}$. Na ausência de artefatos a anisotropia é independente da concentração do fluoróforo.

A teoria da anisotropia pode ser derivada considerando-se uma única molécula. Sabendo-se que um fluoróforo se comporta como um dipolo radiativo (Selényi 1939), assumindo que os momentos de transição de absorção e emissão sejam paralelos, e,

na ausência de difusão rotacional, obtém-se a seguinte expressão para a anisotropia (Lakowicz 2006b)

$$r = \frac{3\langle \cos^2 \theta \rangle - 1}{2} \qquad (9)$$

Portanto a anisotropia é determinada pelo valor médio de $\cos^2\theta$, onde θ é o ângulo entre o dipolo de emissão e o eixo *z*. Deste modo, pode-se antever que para um único fluoróforo orientado ao longo do eixo z, a anisotropia teria o valor de 1. No entanto, não é possível obter, em uma solução homogênea, toda uma população de fluoróforos perfeitamente orientados, de modo que a anisotropia terá sempre valor inferior a 1. Acrescente-se que quando uma amostra é iluminada com luz polarizada, as moléculas com transições de absorção alinhadas paralelamente com o vetor elétrico da excitação polarizada tem a maior probabilidade de excitação. O dipolo elétrico de um fluoróforo não precisa estar precisamente alinhado com o eixo z para absorver luz polarizada ao longo desta direção. A probabilidade de absorção é proporcional a $\cos^2\theta$, onde θ é o ângulo entre o dipolo de absorção e o eixo *z* (Lakowicz e Gryczynski 1997). Portanto, excitação com luz polarizada, resulta numa população de fluoróforos excitados que estão parcialmente orientados ao longo do eixo *z*. Este fenômeno é denominado fotoseleção. A população no estado excitado é simétrica em torno do eixo *z*. A maioria dos fluoróforos excitados estão alinhados próximos ao eixo *z*, e muito poucos fluoróforos excitados tem seus momentos de transição alinhados no planos *x*-*y*. Para uma distribuição randômica presente numa solução desordenada, o número de moléculas com um ângulo entre θ e $\theta + d\theta$ é proporcional a $\text{sen}\theta d\theta$. Deste modo, a

distribuição de moléculas excitadas por luz verticalmente polarizada é dada por (Lakowicz 2006b)

$$f(\theta)d\theta = \cos^2\theta \sin\theta d\theta \qquad (10)$$

Para a absorção e emissão colineares o valor de $\langle \cos^2\theta \rangle$ é dado por:

$$\langle \cos^2\theta \rangle = \frac{\int_0^{\pi/2} \cos^2\theta f(\theta) d\theta}{\int_0^{\pi/2} f(\theta) d\theta} \qquad (11)$$

Substituindo 10 em 11, obtém-se que $\langle \cos^2\theta \rangle = 3/5$. A equação 9 aponta então para uma anisotropia máxima de 0,4. Este é o valor observado quando os dipolos de absorção e emissão são colineares e não havendo processos que resultem em despolarização. Nestas condições a população excitada está preferencialmente orientada ao longo do eixo *z* e o valor de I_T é um terço do valor de $I_{||}$ ($I_{||} = 3I_{\perp}$). Vale lembrar que existem outras possibilidades para a polarização da luz, que incluem reflexões e espalhamento de luz. Para uma solução diluída que proveja o espalhamento de luz, a anisotropia terá um valor próximo a 1, de modo que o espalhamento de luz pode interferir com a medição da anisotropia. Na prática poucos fluoróforos apresentam r = 0,4. A maioria dos fluróforos apresenta valores de r inferiores a 0,4 e, em geral, o valor da anisotropia depende do comprimento de onda de excitação. Isto se explica por serem os momentos de transição deslocados por um ângulo β. A equação 9 determina

que o deslocamento do dipolo de emissão por um ângulo θ com relação ao eixo *z* resulta num decréscimo da anisotropia por um fator de $(3\cos^2\theta - 1)/2$. Da mesma forma o deslocamento dos dipolos de absorção e emissão por um ângulo β resulta numa perda adicional de anisotropia. A anisotropia observada é o produto da perda de anisotropia por fotoseleção (0,4) e da perda devida ao deslocamento angular entre dipolos. A anisotropia fundamental de um fluoróforo é dada por

$$r_0 = 0{,}4\left(\frac{3\cos^2\beta - 1}{2}\right) \qquad (12)$$

onde β é o ângulo entre as transições de absorção e emissão. O termo r_0 é utilizado para se referir à anisotropia observada na ausência de outros processos de despolarização, tais como difusão rotacional e transferência de energia.

Um espectro de anisotropia é a plotagem da anisotropia versus o comprimento de onda de excitação para um fluoróforo numa solução vítrea e diluída. Em uma solução completamente vítrea, onde não ocorre o relaxamento do solvente, a anisotropia é usualmente independente do comprimento de onda de emissão. Os maiores valores de r_0 são usualmente observados para excitação nos comprimentos de onda maiores (Thompson *et al.* 2002). O espectro de excitação da anisotropia revela o ângulo entre os momentos de transição e emissão.

Medidas de anisotropia são realizadas acoplando polarizadores a um fluorímetro. O monocromador usualmente terá uma eficiência de transmissão diferente para a luz polarizada vertical ou horizontalmente. Conseqüentemente a rotação dos polarizadores de emissão alterará as intensidades medidas, de modo que terá de se utilizar o fator de

correção G. Uma notação fácil de associar às medidas é dada por, por exemplo, I_{HV}, correspondendo à excitação polarizada horizontalmente e emissão polarizada verticalmente. Deste modo, teremos que

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \qquad (13)$$

com

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \qquad (14)$$

1.11 FRET entre proteínas marcadas e nanocristais fluorescentes

A detecção precisa de moléculas como toxinas, moléculas presentes em explosivos, carboidratos, espécimes iônicas, DNA, proteínas e peptídeos, compõe um importante objetivo científico com ramificações na medicina, saúde e segurança pública (Clapp *et al.* 2004, Iqbal *et al.* 2000). A interação entre uma molécula alvo e uma proteína, num processo de reconhecimento biológico, geralmente está associada a uma mudança na conformação da proteína como resposta à ligação. O desenvolvimento de sistemas de reconhecimento sensíveis a tais mudanças e capazes de sinalizar o seu acontecimento é foco da atenção de vários grupos de pesquisa (Benson *et al.* 2001, O'connel e Guilbault 2001). Estudos envolvendo FRET entre uma molécula fluorescente doadora ligada ao alvo e uma molécula receptora ligada à uma proteína tem sido

utilizados para estudar mudanças na conformação de proteínas e também como resposta a mudanças nas condições da solução (e.g. temperatura, pH, etc.) (Clapp *et al.* 2004, Iqabl *et al.* 2000, Benson *et al.* 2001, O'connel e Guilbault 2001). O FRET é extremamente sensível à distância separando doador e receptor, o que é ideal para investigar tais fenômenos biológicos. Moléculas orgânicas fluorescentes são utilizadas com freqüência como doadoras e receptoras em uma variedade de estudos biológicos baseados em FRET (Heim e Tsien 1996). Enquanto o FRET já tem sido usado extensivamente em aplicações biológicas, medidas precisas de mudanças conformacionas com resolução temporal, tal como o monitoramento da dinâmica de uma proteína sob extensos períodos e o contínuo monitoramento de toxinas ou pequenas moléculas sob condições realísticas, continua difícil quando são utilizados marcadores orgânicos. Marcadores orgânicos geralmente apresentam espectro de absorção estreito, emissão por demais ampla e limites muito baixos de fotodeterioração, bem como reduzido coeficiente de arrasto (Iqabl *et al.* 2000, Benson *et al.* 2001, O'connel e Guilbault 2001). Estas limitações são especialmente problemáticas no desenvolvimento de ensaios com multi-canais, onde várias moléculas são analisadas simultaneamente, em particular devido à sobreposição dos espectros de emissão.

Desde o desenvolvimento das reações de síntese química de alta temperatura em solução, a partir de precursores organometálicos e com o objetivo de prepapar nanocristais semicondutores (*Quantum Dots* – QDs) de alta qualidade, foram alcançados importantes avanços para aperfeiçoar as propriedades de fotoemissão destes QDs, bem como houve crescente interesse na compreensão das propriedades físicas fundamentais e no desenvolvimento de aplicações que fizessem uso das

características únicas destes materiais (Murray *et al.* 1993, Qu *et al.* 2001, Dabbousi *et al.* 1997). Os objetivos incluem o desenvolvimento de variantes tais como hastes e folhas nanométricas e nanocristais magnéticos (Peng *et al.* 2000, Sun *et al.* 2000), o desenvolvimento de células solares baseadas em QDs e diodos emissores de luz (LEDs) (Huynh *et al.* 2002, Coe *et al.* 2002), e a utilização de QDs coloidais luminescentes como marcadores em aplicações biotecnológicas (Clapp *et al.* 2004, Goldman *et al.* 2005, Bruchez *et al.* 1998, Delehanty *et al.* 2006, Ma *et al.* 2006). Para marcações biológicas em particular, QDs coloidais apresentam propriedades óticas e espectroscópicas únicas, possuindo várias vantagens com relação aos marcadores orgânicos, inclusive em ensaios envolvendo imunofluorescência e FRET. Os QDs apresentam propriedades de absorção e emissão moduláveis em função do diâmetro da partícula, isto se devendo ao efeito de confinamento quântico dos transportadores de carga (elétrons e vacâncias) (Murray *et al.* 1993, Qu *et al.* 2001). Os espectros de fotoemissão são estreitos e podem ser selecionados de modo a abranger desde o UV-próximo até o IR-próximo, tanto através da simples manipulação das dimensões do nanocristal, quanto da seleção da composição do núcleo inorgânico. Acrescente-se que o amplo espectro de absorção permite a excitação simultânea de várias populações de QDs ao mesmo tempo. O amplo intervalo de absorção confere flexibilidade na escolha do comprimento de onda de emissão em ensaios envolvendo FRET, onde a excitação direta do receptor pode ser substancialmente reduzida. Além disto, avanços na passivação da superfície e confinamento adicional dos excitons através do recobrimento do núcleo com semicondutores de banda mais larga amplia substancialmente a eficiência quântica a ponto de QDs do tipo núcleo-cápsula (*core-*

shell) terem eficiência quântica comparável aos marcadores orgânicos (Reiss *et al.* 2002).

Diversos métodos tem sido desenvolvidos para dispersar os QDs em meio aquoso para a aplicação em Bioquímica (Clapp *et al.* 2004, Bruchez *et al.* 1998, Goldman *et al.* 2005, Delehanty *et al.* 2006, Guo *et al.* 2003). A funcionalização da superfície dos QDs permite a formação de QDs-bioconjugados que podem se ligar especificamente a moléculas alvo e fomar complexos estáveis. Na figura 4 há uma representação de um nanocristal de CdSe/ZnS funcionalizado com ácido 2-mercaptoacético (Ji *et al.* 2005). Deste modo, QDs tem sido utilizados com sucesso na visualização de células, ensaios imunológicos, hibridização de DNA e leitura de código de barras (Clapp *et al.* 2004, Bruchez *et al.* 1998, Goldman *et al.* 2005, Delehanty *et al.* 2006, Medintz *et al.* 2004).

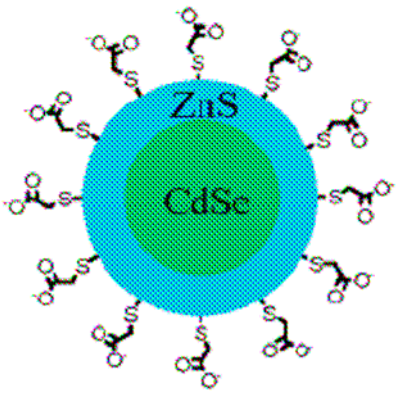


Figura 4. Nanocristal de CdSe/ZnS recoberto com ácido 2-mercaptoacético (Ji et al. 2005)

Foi demonstrado que proteínas que ligam maltose, acrescidas de um domínio eletrostático para ligação aos QDs, se ligam irreversivelmente a superfícies de QDs recobertas com ácido dihidrolipóico (Mattoussi *et al.* 2000). As proteínas que ligam maltose assim modificadas, mesmo ligadas aos QDs, mantém sua propriedade de

ligação à maltose. Começam a surgir trabalhos explorando o potencial de QDs luminescentes bioconjugados como doadores ou receptores em experimentos envolvendo FRET (Clapp *et al.* 2004, Medintz *et al.* 2004). Em um trabalho seminal (Clapp *et al.* 2004) o marcador cianina (Cy3), utilizado como receptor, foi covalentemente ligado à proteína que liga maltose e este complexo proteína-marcador foi imobilizado na superfície de um nanocristal. Nesta configuração, foram explorados os efeitos da variação da razão da quantidade de marcadores por proteína enquanto se manteve constante o número total de proteínas imobilizadas. Além disto, foi possível verificar as distâncias entre cada marcador presente na proteína e o nanocristal no qual a proteína estava ancorada, de modo a se obter a orientação de acoplamento entre eles. Foi também alterado o grau de sobreposição espectral entre doador e receptor (pelo ajuste do tamanho do nanocristal) e verificado o efeito sobre a eficiência do FRET.

Vale ressaltar que, até o presente momento, não há publicações relatando a interação entre proteínas nativamente fluorescentes, como as pertencentes à família das GFPs, e nanocristais, tema este que vem a ser o foco desta tese.

2. Objetivos

O objetivo da presente tese é estudar a interação entre proteínas fluorescentes da família das GFPs e nanocristais fluorescentes de CdSe/ZnS e investigar a possível ocorrência de FRET entre estes compostos. Em se verificando a ocorrência de FRET, pode-se monitorar a interação, bem como mensurar a distância entre estes compostos, com precisão nanométrica.

A transferência de energia entre proteínas fluorescentes e nanocristais semicondutores tem desdobramentos: Primeiramente como sistema de demonstração da ocorrência de FRET envolvendo dois compostos que ocupam posição de destaque dentre o conjunto dos marcadores biológicos. E, numa visão mais ampla, a transferência de energia entre proteínas fluorescentes e nanocristais, permite projetar experimentos onde a aproximação entre estes compostos venha a ser reveladora de informações biológicas. Por exemplo, ensaios onde o sucesso da funcionalização da superfície dos nanocristais, visando sua penetração e deslocamento orientados no interior de uma célula, possa ser avaliado em função da verificação de FRET com proteínas fluorescentes geneticamente inseridas no sistema em questão, e cuja presença esteja restrita à organela onde se busca verificar a penetração dos nanocristais.

De modo geral, a transferência de energia por ressonância entre nanocristais e proteínas fluorescentes, provê um sistema sonda-alvo envolvendo dois elementos de natureza distinta, onde ambos apresentam excelência em suas classes. Por um lado, as proteínas fluorescentes, com a condição imanente de serem integráveis ao genoma do sistema em estudo, e por outro os nanocristais, com propriedades óticas

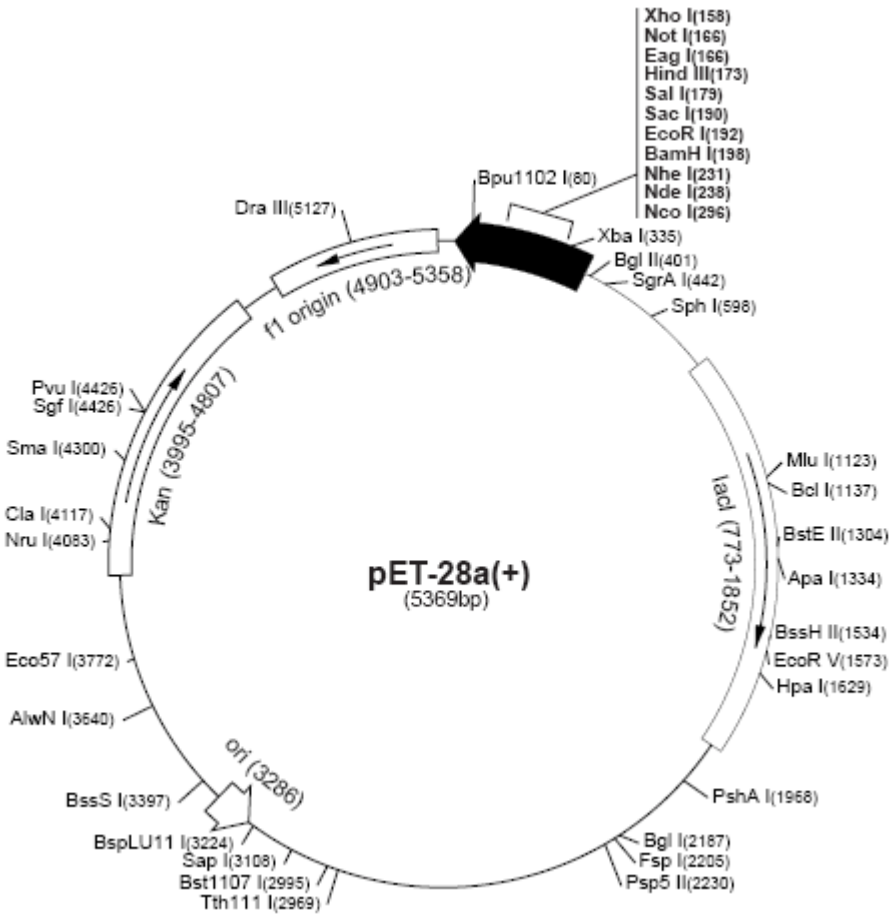
excepcionais. Na intersecção entre estas qualidades reside o fato de que, tais compostos, têm alta afinidade entre si e sua interação é prontamente revelada pelos efeitos associados ao FRET, o que, potencialmente, os credencia para utilização conjunta e os acrescenta ao conjunto de pares de sondas disponíveis à Biologia Molecular e Celular.

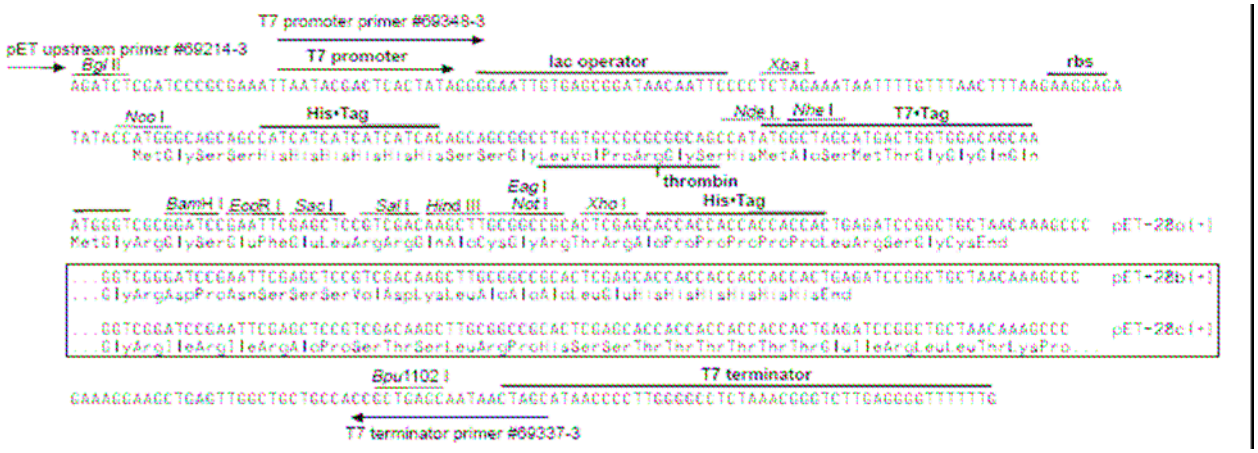
Vale ressaltar, no entanto, que a presente tese abrange somente o passo inicial, isto é, a descoberta da interação entre proteínas fluorescentes e nanocristais semicondutores e a natureza da transferência de energia que entre eles se manifesta. O aprofundamento desta investigação, visando, entre outros, a caracterização detalhada da interface de ligação entre estes compostos, e o monitoramento da transferência de energia por ressonância *in vivo*, são ainda perspectivas em aberto.

3. Materiais e métodos

3.1. Clonagem do plasmídio pET-gfp5

O plasmídio codificando a proteína GFP5, pBIN m-gfp5-ER, foi fornecido pelo Dr. Jim Haselof (Siemering *et al.* 1996). A seqüência de DNA referente à GFP5 foi extraída do plasmídio pBIN m-gfp5-ER e clonada nos sites EcoRI/SacI do vetor bacteriano pET-28a(+) (Novagen), tal vetor agrega uma cauda de histidina à porção n-terminal da proteína em expressão. O vetor resultante foi denominado pET-gfp5. A GFP5 contém três substituições com relação à GFP nativa: V163A e S175G que beneficiam o enovelamento da proteína a 37ºC e I167T que equaliza a intensidade dos picos de excitação em 395 e 473 nm (Siemering *et al.* 1996).





Os plasmídios pBIN m-gfp5-ER e pET-28a acrescentam os seguintes aminoácidos à GFP5:

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSQFgfp5HDEL

Isto é, um total de 40 aminoácidos inespecíficos, incluindo uma seqüência de hexa-histidina. Deste modo a proteína aqui denominada GFP5 contém um total de 278 aminoácidos.

3.2. Transformação de *E. coli*

200 μl de células competentes de *E. coli* (BL21 DE3) foram inoculadas com 1 μl (~500 ng/μl) do vetor pET-gfp5 e mantidas em gelo durante 30 minutos. As células foram submetidas à temperatura de 42º C por 90 minutos e depois mantidas em gelo por mais 10 minutos. Foram adicionados 500 μl de meio de cultura LB (Luria-Bertani) e a solução foi mantida a 37º C por 45 minutos, quando então foram espalhados 50 μl da solução sobre placa de LB/agar contendo canamicina (25 μg/ml). A placa foi mantida em estufa a 37º C por 12 horas.

3.3 Expressão e purificação da GFP5

Uma colônia de *E. coli* transformada pelo vetor pET-gfp5 foi inoculada em 5 ml de meio de cultura 2xYT (16 g/l de triptona, 10g/l de extrato de levedura, 5 g/l de cloreto de sódio, pH 7) acrescidos de canamicina (25 μg/ml) e crescida durante a noite a 37º C em agitador a 200 RPM. Estes 5 ml foram então transferidos para 500 ml de meio 2xYT contendo canamicina (25 μg/ml) e submetidos à agitação, 200 RPM, sob a temperatura

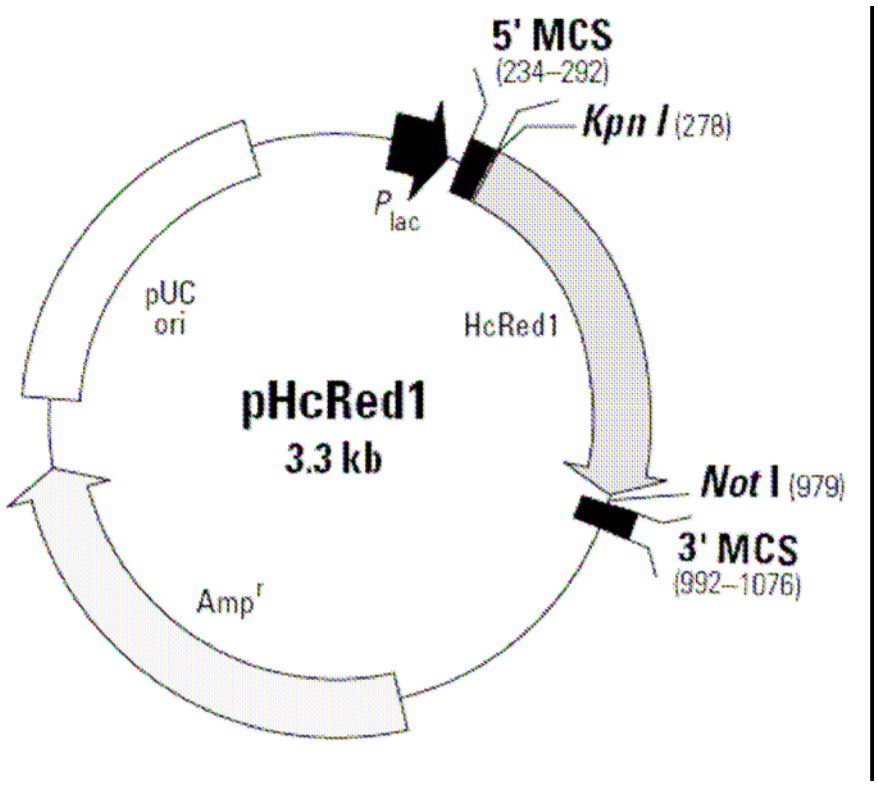
de 37º C. Após 3 horas nestas condições, foi induzida a expressão da GFP5 a partir da adição de 0,8 mM de IPTG (isopropiltiogalactosido). 4 horas depois da indução as bactérias foram colhidas por centrifugação a 6.000 RPM durante 30 minutos e solubilizadas em 15 ml de tampão de lise (20 mM Tris-Hcl; pH 8,0; 150 mM NaCl, 5 mM EDTA) e então congeladas. Após descongelamento o extrato bacteriano foi lisado em sonicador Branson Sonifier 250 sendo aplicados 5 pulsos de 30 seg a 50% da potência máxima e então centrigufado a 10.000 RPM por 10 minutos, sendo descartada a fração insolúvel. A purificação foi levada a cabo em algumas etapas. Inicialmente submeteu-se a fração solúvel do extrato bacteriano a 50º C por 10 minutos, tendo em vista que a GFP é bastante resistente à temperatura e parte das proteínas bacterianas não o é. O extrato foi então centrifugado a 10.000 RPM por 10 minutos e o sobrenadante, contendo a GFP5, foi removido e acrescido de 1 M sulfato de amônio. Nestas condições a GFP5 se mantém solúvel e parte das proteínas bacterianas sofre precipitação. Após centrifugação a 10.000 RPM por 5 minutos o sobrenadante foi novamente removido e a este se acrescentou sulfato de amônio até a concentração de 2,5 M. A GFP5 então sofre precipitação e a fração solúvel, contendo grande concentração de DNA, é descartada. A proteína precipitada foi então ressuspensa em tampão de FRET (5 mM NaH2PO4, 5 mM NaCl, pH 7) ou em água e filtrada. O rendimento obtido foi de cerca de 15 mg e o grau de pureza, em torno de 90%, foi determinado através de quantificação da proteína corada com *comassie blue* em SDS-PAGE. O grau de pureza depende, em parte, da taxa de expressão da proteína no interior da bactéria. Selecionando colônias frescas, isto é, que tenham sido recentemente transformadas, obtém-se elevadas taxas de expressão e, nestas condições, o grau de pureza final pode ultrapassar os 90%.

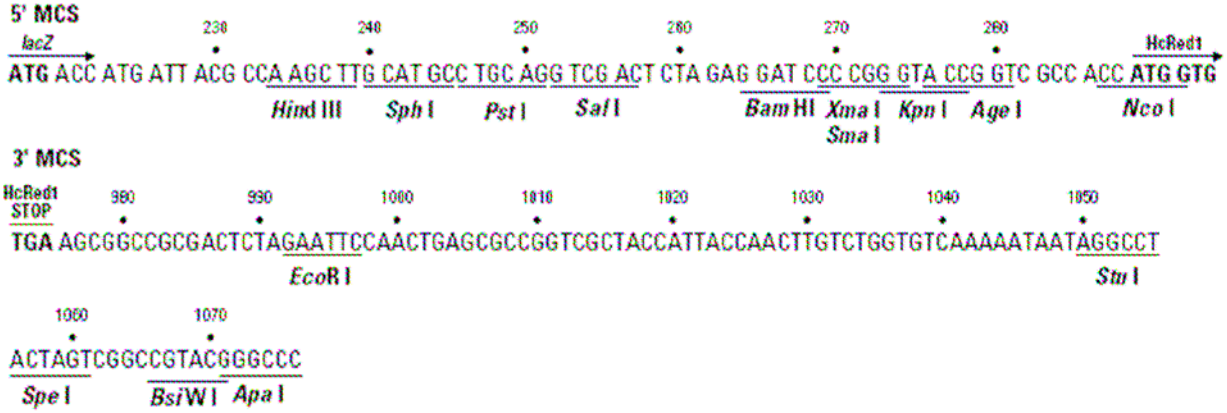
3.4 Quantificação da GFP5

A concentração de GFP5 foi determinada a partir do espectro de absorção da proteína e do coeficiente de extinção molar reportado para a GFP nativa, isto é, 25.000 $M^{-1}cm^{-1}$ em 395 nm (Zimmer 2002). Partiu-se da hipótese de que as três substituições presentes na GFP5 não promovessem alteração no coeficiente de extinção em 395 nm (Siemering *et al.* 1996). Foram obtidos espectros de absorção da GFP5 em pH 7 utilizando-se o equipamento Hitachi U-2010 Spectrophotometer. Foi determinado o valor médio de 49 μM para a concentração de GFP5.

3.5 O vetor pHcRed1

O vetor de expressão bacteriana pHcRed1 (Clontech), que codifica a proteína HcRed1, foi adquirido e utilizado sem modificações para a transformação de *E. coli* (BL21 DE3).





3.6 Transformação de E. coli

200 µl de células competentes de E. coli (BL21 DE3) foram inoculadas com 1 µl (~500 ng/µl) do vetor pHcRed1 e mantidas em gelo durante 30 minutos. As células foram submetidas à temperatura de 42º C por 90 minutos e depois mantidas em gelo

por mais 10 minutos. Foram adicionados 500 μl de meio de cultura LB (Luria-Bertani) e a solução foi mantida a 37º C por 45 minutos, quando então foram espalhados 50 μl da solução sobre placa de LB/agar contendo canamicina (25 μg/ml). A placa foi mantida em estufa a 37º C por 12 horas.

3.7 Expressão e purificação da HcRed1

Uma colônia de *E. coli* transformada pelo vetor pHcRed1 foi inoculada em 5 ml de meio de cultura 2xYT (16 g/l de triptona, 10g/l de extrato de levedura, 5 g/l de cloreto de sódio, pH 7) acrescidos de ampicilina (100 μg/ml) e crescida durante a noite a 30º C em agitador a 200 RPM. Estes 5 ml foram então transferidos para 500 ml de meio 2xYT contendo ampicilina (100 μg/ml) e submetidos à agitação, 200 RPM, sob a temperatura de 30º C. Após 4 horas nestas condições, foi induzida a expressão da HcRed1 a partir da adição de 0,16 mM de IPTG (isopropiltiogalactosido). 20 horas depois da indução as bactérias foram colhidas por centrifugação a 6.000 RPM durante 30 minutos e solubilizadas em 30 ml de tampão de lise (20 mM Tris-Hcl; pH 8,0; 150 mM NaCl, 5 mM EDTA) e então congeladas. Após descongelamento o extrato bacteriano foi lisado em sonicador Branson Sonifier 250 sendo aplicados 5 pulsos de 30 seg a 50% da potência máxima e então centrigufado a 10.000 RPM por 10 minutos, sendo descartada a fração insolúvel. A purificação foi levada a cabo em algumas etapas. Inicialmente submeteu-se a fração solúvel do extrato bacteriano a 50º C por 10 minutos, tendo em vista que a HcRed1 também é bastante resistente à temperatura e parte das proteínas bacterianas não o é. O extrato foi então centrifugado a 10.000 RPM por 10 minutos e o sobrenadante, contendo a HcRed1, foi removido e acrescido de 1 M sulfato de amônio.

Nestas condições a HcRed1 se mantém solúvel e parte das proteínas bacterianas sofre precipitação. Após centrifugação a 10.000 RPM por 5 minutos o sobrenadante foi novamente removido e a este se acrescentou sulfato de amônio até a concentração de 2,5 M. A HcRed1 então sofre precipitação e a fração solúvel, contendo grande concentração de DNA, é descartada. A proteína precipitada foi então ressuspensa em tampão de FRET (5 mM NaH2PO4, 5 mM NaCl, pH 7) ou em água e filtrada. O rendimento obtido foi de cerca de 15 mg e o grau de pureza em torno de 90% foi determinado através de quantificação da proteína corada com *comassie blue* em SDS-PAGE. O grau de pureza depende, em parte, da taxa de expressão da proteína no interior da bactéria. Selecionando colônias frescas, isto é, que tenham sido recentemente transformadas, obtém-se elevadas taxas de expressão e, nestas condições, o grau de pureza final pode ultrapassar os 90%.

3.8 Quantificação da HcRed1

A concentração de HcRed1 foi determinada a partir do espectro de absorção da proteína e do seu coeficiente de extinção molar de 125.000 $M^{-1}cm^{-1}$ em 573 nm (Wilmann *et al.* 2005). Foram obtidos espectros de absorção da HcRed1 em pH 7 utilizando-se o equipamento Hitachi U-2010 Spectrophotometer. Foram utilizadas cubetas com 1 cm de caminho ótico. Foi determinado o valor médio de 9,7 μM para a concentração de HcRed1.

3.9 Seqüência de aminoácidos da GFP5 e HcRed1

```
        10        20        30        40        50
MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTT          GFP5

...MSGLLKESMRIKMYMEGTVNGHYFKCEGEGDGNPFAGTQGMRIHVT.          HcRed1
          60        70        80        90       100
GKLPVP..WPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTIFF        GFP5

EGAPLPFAFDILAPCCAYGSRTFVHHTAEIP..DFFKQSFPEGFTWERTTTY        HcRed1
       100       120       130       140       150
KDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNV          GFP5

EDGGILTAHQDTSLEGNCLIYKVKVHGTNFPADGPVM.KNESGGWEPSTE          HcRed1
       160       170       180       190        200
YIMADKQKNGIKANFKTRHNIEDGGVQLADHYQQNTPIGDG.PVLLDPNHY         GFP5

VVYP..ENGVLCGRNVMALKV.GDRHLICHHYTSYKSKKAVRALTMPGFHF         HcRed1
       210       220       230
LSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITHGMDELYK                      GFP5

TDIRLQMLRKKKDE..YFELYEASVARYSDLPEKAN                        HcRed1
```

Os aminoácidos em cinza e o aminoácido em rosa representam mutações. Os aminoácidos em verde, rosa e vermelho representam a seqüência que gera os fluoróforos da GFP5 e HcRed1 respectivamente.

3.10 Nanocristais de ZnS

Nanocristais de ZnS recobertos com 2-mercaptoetanol foram sintetizados em meio aquoso, de acordo com o protocolo apresentado na referência Khosravi *et al.* (1995) sem a adição de manganês como dopante. Na figura 5 está a estrutura molecular do 2-mercaptoetanol. Essencialmente são preparadas soluções aquosas de cloreto de zinco, mercaptoetanol e sulfeto de sódio, todas na concentração 1 X 10^{-2} M. As soluções são misturadas gota-a-gota em atmosfera de nitrogênio. Inicialmente mistura-se o cloreto de zinco e o mercaptoetanol e então é adicionado o sulfeto de

zinco. Os nanocristais precipitados são centrifugados e lavados com água. O diâmetro esperado dos nanocristais é de 2 nm.

Figura 5. 2-mercaptoetanol

3.11 Centrifugação de nanocristais de ZnS complexados com proteínas

Foi introduzido excesso de nanocristais de ZnS em soluções contendo 0,3 mg/ml de GFP5 e HcRed1 respectivamente. Tais soluções foram centrifugadas a 10.000 RPM durante 1 minuto. Para verificar a fluorescência das proteínas complexadas com os nanocristais foi utilizada lâmpada UV comercial para excitação destas e a fluorescência foi observada a olho nu em sala escura.

3.12 Nanocristais de CdSe/ZnS

Nanocristais de CdSe/Zns, recobertos com ácido mercaptoundecanóico (MUA) e solúveis em água, foram adquiridos da NN-Labs (www.nn-labs.com), nas cores de emissão vermelha, amarela e verde. Na figura 6 está a estrutura molecular do MUA.

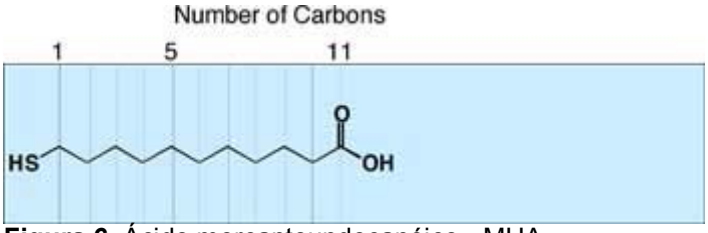


Figura 6. Ácido mercaptoundecanóico - MUA

Pico de emissão dos nanocristais:

CdSe com emissão vermelha, pico de emissão em 635 nm.

CdSe com emissão verde, pico de emissão em 550 nm.

Os nanocristais de CdSe/ZnS apresentaram tendência para a formação de agregados em pHs ácidos ou próximos à neutralidade. Para inibir a formação de agregados, os experimentos foram executados com soluções diluídas. As concentrações das soluções estoque de nanocristais foram de 14 μM para os nanocristais com emissão no vermelho e 10 μM para os nanocristais com emissão no verde (dados do fornecedor).

3.13 Fluorimetria

Espectros de fluorescência foram obtidos utilizando um fluorímetro Spex Fluorolog 1681 0.22m equipado com lâmpada de xenônio de 450 Watts. Foram utilizadas cubetas de quartzo de 1 ml com uma face funcional de 0,4 cm e outra de 1 cm. A face de 1 cm foi posicionada em frente ao detector enquanto a face de 0,4 cm foi posicionada em frente à lâmpada. A leitura da fluorescência foi executada em ângulo reto. As aberturas dos monocromadores foram fixadas em 2 mm para as tomadas de fluorescência. Geralmente fixava-se o comprimento de onda de excitação em 395 nm (no caso da GFP5 e nanocristais com emissão no vermelho) e 425 nm (no caso dos nanocristais com emissão no verde e HcRed1) e procedia-se com a leitura de intensidade da fluorescência em diferentes comprimentos de onda (modo de emissão). O tempo de resposta do equipamento foi ajustado a 0,2 segundos e a velocidade de leitura foi de 1 nm/seg. A solução aquosa utilizada nas medidas de fluorimetria 5 mM NaCl e 5 mM NaH2PO4. O pH foi ajustado acrescentando-se NaOH ou HCl. Ao se

acrescentar nanocristais ou proteínas à solução em análise, a solução era agitada e os espectros obtidos imediatamente. Foram acoplados polarizadores no fluorímetro para efetivar as medidas de anisotropia. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente.

3.14 Medidas de anisotropia

Foram acoplados polarizadores ao fluorímetro Spex. As medidas de anisotropia foram executadas, geralmente, fixando-se o comprimento de onda de emissão em 642 nm, isto é, no pico de emissão da HcRed1, e executando-se medidas de intensidade da fluorescência em diferentes comprimentos de onda (modo de excitação). Para cada medida de anisotropia foram realizadas quatro medidas seqüencialmente I_{VV}, I_{VH}, I_{HH} e I_{HV}. Nas medidas de anisotropia as aberturas dos monocromadores foram fixadas em 5 mm. A solução aquosa utilizada nas medidas de anisotropia continha 5 mM NaCl e 5 mM NaH2PO4. O pH foi ajustado acrescentando-se NaOH ou HCl.

3.14 Dicroísmo circular - CD

Foi utilizado um espectropolarímetro Jasco J-720 para a obtenção dos espectros de dicroísmo circular. Foi utilizada uma cubeta com 1 cm de caminho ótico. O tempo de resposta do equipamento foi ajustado para 0,5 segundos e a velocidade de leitura foi de 50 nm/min. Foram acumuladas 5 leituras por espectro. Inicialmente foi obtido o espectro de dicroísmo circular para a GFP5 e então foram acrescentados nanocristais à solução,

promoveu-se agitação da solução, e então foi tomado então o espectro de CD da GFP5 na presença dos nanocristais.

3.15 Cálculo da integral de sobreposição (J), distância de Förster (R_0), eficiência do FRET (E) e distância entre fluoróforos (r)

A integral de sobreposição J foi calculada utilizando a planilha eletrônica Excell (Microsoft). Os espectros de absorção e emissão foram tomados com passo de um nanômetro, isto é, foi medido um valor de intensidade ou absorbância por nanômetro. Foi determinada a área sob a curva de intensidade de emissão da fluorescência (para a GFP5 e para os nanocristais com emissão no verde) somando-se os valores da intensidade a cada nanômetro e multiplicando-se pelo intervalo entre duas medidas, isto é, 1 nm. Uma vez determinado o valor da área sob a curva os espectros de emissão eram normalizados dividindo-se a intensidade a cada ponto, pelo valor da área total. O espectro de absorção foi normalizado dividindo-se a densidade ótica pelo valor da concentração molar (nanocristais com emissão no vermelho e HcRed1). Utilizou-se cubetas com 1 cm de caminho ótico nas medidas de absorbância. Uma vez obtidos os valores normalizados de intensidade da fluorescência e de absorbância molar, foram multiplicadas ponto a ponto estas duas grandezas e multiplicadas também pelo valor do comprimento de onda elevado à quarta potência (e multiplicados também por $\delta\lambda$, que no caso era 1 nm) e o conjunto de valores foi somado de modo a se obter o valor de J. Uma vez determinado J, obteve-se R_0 a partir da equação 4 presente na introdução. Determinou-se o valor da eficiência do FRET (E) a partir da equação 7 presente na introdução, utilizando-se os valores da intensidade máxima de fluorescência na

ausência e na presença da concentração de saturação do receptor. A partir dos valores de R_0 e E, pôde-se determinar o valor da distância entre fluoróforos (r) utilizando a equação 6 presente na introdução.

4. RESULTADOS

4.1. Interação entre nanocristais de ZnS e proteínas fluorescentes

Em solução aquosa, foi observado que a GFP5 interage com nanocristais de ZnS sem perder a fluorescência. À solução contendo GFP5 foram introduzidos nanocristais de ZnS recobertos com mercaptoetanol, preparados conforme Khosravi *et al.* (1995). Em pH 6 os nanocristais de ZnS formam uma suspensão e prontamente interagem com a GFP5, tal como pode ser observado a partir da cosedimentação dos compostos quando submetidos à centrifugação. É possível observar também que a os nanocristais de ZnS seqüestram praticamente toda a GFP5 presente na solução (figura 7a). A GFP5 ligada aos nanocristais mantém a sua fluorescência (figura 7b). O mesmo fenômendo ocorre entre nanocristais de ZnS e a proteína HcRed1 (dados não mostrados). Vale ressaltar que os nanocristais de ZnS não apresentam absorção na região de emissão tanto da GFP5 quanto da HcRed1.

a **b**

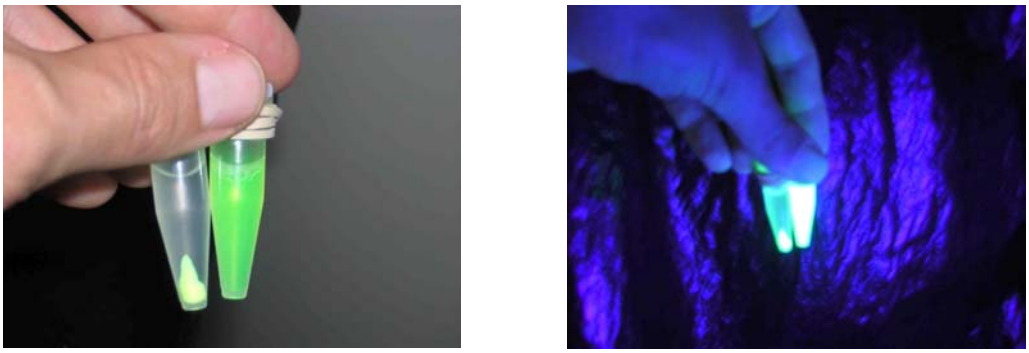


Figura 7. (a) no recipiente da esquerda há solução de GFP5 acrescida de nanocristais de ZnS após centrifugação. O recipiente da direita contém solução com a mesma concentração de GFP5, porém sem a adição de nanocristais. **(b)** sob iluminação UV verifica-se que a GFP5 ligada aos nanocristais de ZnS mantém sua fluorescência.

Após se constatar que as proteínas GFP5 e HcRed1 interagem com nanocristais de ZnS recobertos com mercaptoetanol, buscou-se verificar se o mesmo se daria com nanocristais cuja superfície fosse constituída por ZnS mas cujo o interior fosse composto por semicondutor intensamente fluorescente. Para tanto foram selecionados nanocristais de seleneto de cádmio (CdSe/ZnS) recobertos com ácido mercaptoundecanóico, o que lhes confere solubilidade em água (Dabbousi *et al.* 1997, NN-LABS.com).

4.2. Interação entre nanocristais de CdSe/ZnS e a GFP5

A introdução de nanocristais de CdSe/ZnS, recobertos com MUA e com emissão no vermelho, em solução aquosa contendo a proteína GFP5 provoca pronunciada supressão da fluorescência da proteína. Tal supressão pode ser verificada titulando-se os nanocristais em solução aquosa contendo a GFP5 e monitorando-se a intensidade da fluorescência desta quando excitada em 395 nm (ver figura 8).

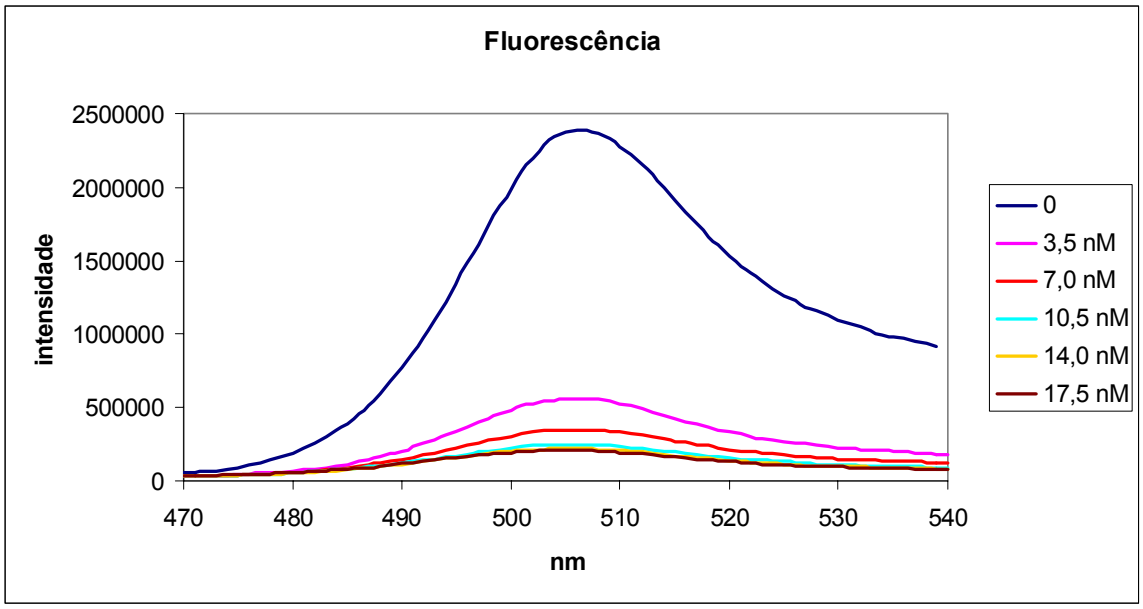


Figura 8. Supressão da fluorescência da GFP5 em função da concentração de nanocristais de CdSe/ZnS com emissão no vermelho. A concentração de GFP5 é 24 nM e a concentração de nanocristais de CdSe/ZnS com emissão no vermelho foi de 0 a 17,5 nM. A solução contém 5 mM de NaCl e 5 mM de NaH_2PO_4, o pH foi ajustado a 6 com a adição de NaOH . Espectro de emissão sendo a amostra excitada em 395 nm.

A partir da figura 8 pode-se verificar que a adição de nanocristais suprime a fluorescência da GFP5 até um valor mínimo de cerca de 10% do valor da intensidade inicial. Vale notar que a supressão ocorre sob concentrações nanomolares de proteína e nanocristais, o que aponta para uma interação de ligação entre estes dois compostos e não um processo de supressão dinâmica, dado que, e levando-se em conta que o tempo de vida do estado excitado da GFP5 é de cerca de 3 ns (Swaminathan *et al.* 1997), uma eventual constante de supressão dinâmica estaria em desacordo com o limite difusional (Lakowicz 2006c). Deste modo, pode-se deduzir da figura 8, que não apenas a interação entre a GFP5 e os nanocristais promove a supressão da fluorescência, mas também que ocorre a formação de um complexo entre os nanocristais e a proteína.

Tendo em vista que os nanocristais apresentam elevada absorção em 395 nm (comprimento de onda utilizado para a excitação da GFP) e também apresentam

absorção no comprimento de onda de emissão da GFP5 (508 nm) foram utilizadas concentrações reduzidas deste material, visando a redução de eventual efeito filtro. A densidade ótica no ensaio de supressão da fluorescência (figura 8) se manteve inferior a 0,01. Sob valores de densidade ótica tão diminutos, o efeito filtro sobre a intensidade da fluorescência da GFP5 é inferior a 2% (Medintz *et al.* 2003).

4.3 Efeito do pH sobre a interação entre a GFP5 e nanocristais de CdSe/ZnS com emissão no vermelho

Foi verificado o efeito dos nanocristais sobre a fluorescência da GFP5 em pH variando de 4 a 10, mantendo-se a concentração de GFP5 constante em 24 nM e titulando-se nanocristais de CdSe/ZnS com emissão no vermelho. Observou-se que em pH abaixo de 5 a GFP5 é instável, dificultando a mensuração da interação com os nanocristais, sendo que a GFP nativa é resistente a pH's até 12 (Mazzola *et al.* 2006). Em pH entre 5 e 7, pôde-se verificar a supressão da fluorescência da GFP5 em função da concentração de nanocristais. Em pH 8, o efeito da adição de nanocristais sobre a fluorescência da GFP5 se reduz significativamente. Em pH 10 a adição de excesso de nanocristais causa uma supressão inferior a 10% da intensidade inicial da fluorescência da GFP5, contrastando com os cerca de 90% de supressão que ocorre em pH 6.

Vale acrescentar que a supressão da fluorescência apresentou um caráter reversível, isto é, a fluorescência da GFP5, na presença dos nanocristais, pode ser modulada em função do pH. Em pH 6 a supressão é máxima, elevando-se o pH a 8,5 através da adição de NaOH, restabelece-se, em grande parte, a fluorescência da GFP5. Reduzindo novamente o pH a 6, através da adição de HCl, observa-se

novamente a intensa supressão da fluorescência, de modo que a interação entre a GFP5 e os nanocristais de CdSe/ZnS recobertos com MUA, além de ser dependente do pH, tem também um caráter reversível.

4.4 Verificação da conformação da estrutura secundária da GFP5 na presença de nanocristais

Foram realizadas medidas de dicroísmo circular da GFP5, na presença e na ausência de nanocristais de CdSe/ZnS com emissão no vermelho, para verificar o efeito dos nanocristais sobre a estrutura secundária da proteína (Hua *et al.* 2006, Ji *et al.* 2005), tal como pode se ver na figura 9.

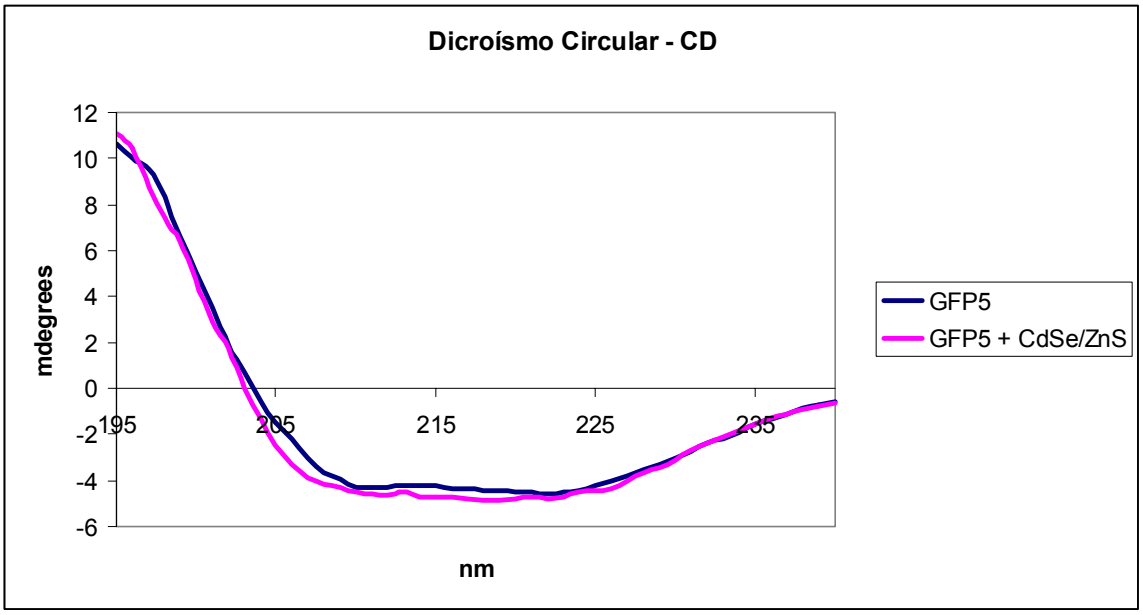


Figura 9. Espectro de dicroísmo circular da GFP5 na ausência e na presença de nanocristais de CdSe/ZnS com emissão no vermelho, em pH 6. A concentração de proteína é de 82 nM. Foram adicionados 40 nM de nanocristais. Foi utilizada cubeta com 1 cm de caminho ótico. A adição dos nanocristais, nestas condições, leva à supressão de cerca de 90% da intensidade da fluorescência da GFP5.

O espectro de dicroísmo circular presente na figura 9 permite inferir que a GFP5, na presença de nanocristais de CdSe/ZnS, mantém substancialmente a sua estrutura secundária. Isto é, os nanocristais não provocam a desnaturação da estrutura secundária, o que poderia ser uma razão trivial para a supressão da fluorescência da proteína.

4.5 Sobreposição entre o espectro de emissão da GFP5 e o espectro de absorção dos nanocristais de CdSe/ZnS com emissão no vermelho

Tendo em vista que a GFP5 e os nanocristais formam um complexo, tal como visto na seção anterior, e que ocorre sobreposição entre os espectros de emissão da GFP5 e de absorção dos nanocristais (ver figura 10), pode haver transferência de energia por ressonância (FRET) entre os compostos, o que explicaria a supressão da fluorescência da GFP5. Vale ressaltar também que são conhecidas as propriedades individuais destes dois compostos de agirem como elementos de transferência de energia por FRET (Heim e Tsien 1996, Clapp *et al.* 2004) o que, em princípio, os habilita para tal fim. Este conjunto de fatores leva a conjecturar que a supressão da fluorescência da GFP5, observada quando na presença de nanocristais, se deva à transferência de energia por ressonância.

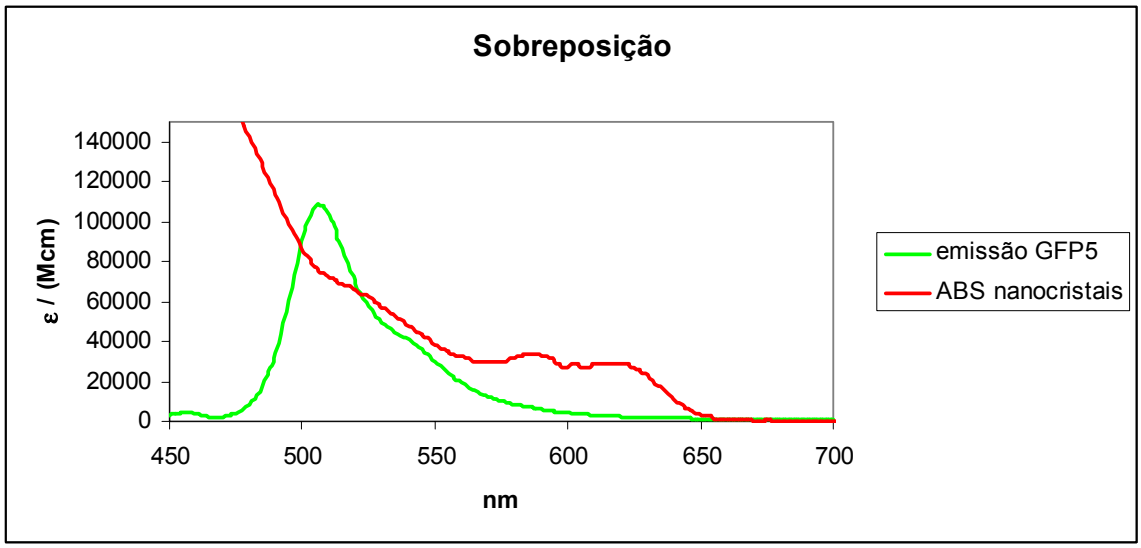


Figura 10. Sobreposição entre o espectro de emissão da GFP5 e o espectro de absorção dos nanocristais de CdSe/ZnS com emissão no vermelho.

4.6 Eventual eficiência de FRET, distância de Förster e distância entre fluoróforos

Caso a supressão da fluorescência da GFP5 pelos nanocristais de CdSe/ZnS fosse de fato motivada por FRET, poder-se-ia determinar a eficiência do FRET (E) (Lakowicz 2006a) através da expressão

$$E = 1 - (F_{DR} / F_D) \qquad (1)$$

onde F_{DR} é a intensidade da fluorescência dos nanocristais (receptores) na presença da GFP5 (doador) e F_D é a intensidade da fluorescência dos nanocristais na ausência da GFP5. Utilizando os valores para F_{DR} e F_D a partir das curvas de maior e menor intensidades presentes na figura 2, ter-se-ia uma eficiência de FRET (E) de 91% para este sistema

E = 91%

Outro parâmetro importante que se poderia determinar, seria a distância de Förster, R_o, que corresponde à distância na qual a eficiência do FRET é de 50%

$$R_0 = 0{,}211(\kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda))^{1/6} \qquad \text{(em ângstrons)} \qquad (2)$$

onde κ é o fator de orientação, n é o índice de refração do meio, Q_D é eficiência quântica do doador, e J é a inegral de sobreposição. O termo κ^2 é um fator que descreve a orientação relativa entre os dipolos do doador e receptor. Usualmente se assume que κ^2 seja igual a 2/3, valor que é apropriado para uma média randômica entre os ângulos dos dipolos do doador e do receptor (Lakovicz 2006x). O índice de refração (n) é tipicamente assumido como sendo 1,4 para biomoléculas em solução aquosa. A eficiência quântica da GFP selvagem é de 78% quando excitada em 395 nm e este valor será utilizado também para a GFP5 supondo que as três mutações contidas na GFP5 não interfiram com a eficiência quântica relacionada à excitação em 395 nm (Siemering *et al.* 1996). A integral J expressa o grau de sobreposição espectral entre a emissão do doador e a absorção do receptor:

$$J = \int_0^\infty F_D(\lambda)\varepsilon_R(\lambda)\lambda^4 d\lambda \qquad (3)$$

onde $F_D(\lambda)$ é a intensidade de fluorescência corrigida do doador no intervalo $\lambda + \Delta\lambda$ sendo a intensidade total (área sob a curva) normalizada à unidade. $\varepsilon(\lambda)$ é o

coeficiente de extinção, ε, do receptor em λ, tipicamente em unidades de $M^{-1}cm^{-1}$. O valor da integral de sobreposição para o sistema em questão pode ser obtido integrando-se os valores presentes no gráfico de sobreposição (figura 9) multiplicados por λ^4. Procedendo desta forma, obteve-se o valor para J de 4,80 x 10^{15} $M^{-1}cm^{-1}nm^4$.

A partir da equação 2, pôde-se obter o valor de Ro para a GFP5 e os nanocristais de CdSe/ZnS recobertos com MUA e com emissão no vermelho:

Ro = 62 Å

Em se obtendo um valor de 62 ângstrons para Ro, que corresponde à distância na qual a eficiência do FRET é de 50%, pôde-se determinar a distância entre fluoróforos (r). A equação 4 relaciona a eficiência do FRET (E) à distância (r)

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \qquad (4)$$

De modo que se pôde determinar a eventual distância entre o fluoróforo da GFP5 e o núcleo fluorescente de CdSe dos nanocristais:

r = 42 Å

Em resumo, caso a supressão da fluorescência da GFP5 na presença dos nanocristais seja de fato motivada por uma transferência de energia por FRET, ter-se-ia que a eficiência da transferência de energia seria de 91%, a distância de Förster seria

de 62 Å e a distância entre os fluoróforos seria de 42 Å. Vale notar que o diâmetro da GFP5 é de 24 Å (Zimmer 2002) e o diâmetro dos nanocristais com emissão no vermelho é de cerca de 60 Å (Dabbousi *et al.* 1997).

4.7 Dificuldade na comprovação da ocorrência de FRET entre a GFP5 e os nanocristais de CdSe/ZnS

Tendo em vista que o espectro de excitação dos nanocristais é bastante extenso e sobrepõe todo o espectro de excitação da GFP5, não existe um comprimento de onda no qual seja possível promover uma excitação seletiva da proteína e, desta forma, verificar a emissão sensitizada dos nanocristais e com isto comprovar a ocorrência de FRET. Além disto, a supressão da intensidade da fluorescência da proteína é bastante elevada, pouco acima de 90%, e estaria associada a uma elevada eficiência de FRET. Nos casos em que a eficiência do FRET é muito elevada, a fluorescência da fração populacional sofrendo FRET é amplamente suprimida, dificultando, por exemplo, a caracterização de uma eventual redução no tempo de vida (Songa *et al.* 2002) ou aumento da anisotropia do doador, neste caso a GFP5 (Jares-Erijman e Jovin 2006, Rizzo e Piston 2004). A mensuração da anisotropia do receptor também não se mostra adequada para verificar a existência de FRET quando o receptor é um nanocristal esférico, dado que nanocristais esféricos apresentam anisotropia zero (Peng *et al.* 2000, Hu *et al.* 2001), o que impede a verificação de uma eventual redução da anisotropia do receptor motivada pela transferência de energia por ressonância.

Estando as maneiras mais imediatas de se caracterizar FRET obstruídas para o caso da GFP5 como doadora e os nanocristais de CdSe/ZnS como receptores, seria

necessário lançar mão de outros métodos para efetivar tal esclarecimento. Uma possibilidade viria através da variação da espessura da camada que recobre os nanocristais, no caso presente ácido mercaptoundecanóico (MUA). Poder-se-ia subsitituir o MUA por compostos semelhantes, porém com cadeias mais curtas e mais longas e verificar o efeito sobre a eficiência da transferência de energia e a distância entre fluoróforos. Por exemplo, poder-se-ia substituir o MUA por ácido 2-mercaptoacético (Ji *et al.* 2005). Outras maneiras, talvez com um maior grau de sofisticação, poderiam ser aplicadas, tal como a verificação da emissão sensitizada dos nanocristais através da excitação da GFP5 com dois fótons, uma vez que a seção de choque para dois fótons da GFP5, para excitação em torno de 800 nm, é duas ordens de grandeza maior do que a dos nanocristais (Kirkpatrick *et al.* 2001, Chon *et al.* 2004, Hao *et al.* 2006) e, desta forma, poder-se-ia, eventualmente, observar a emissão sensitizada dos nanocristais. De todo o modo, antes de partir para uma empreitada envolvendo um maior grau de sofisticação experimental, buscou-se uma variação do tema, isto é, ao invés da proteína atuar como doadora e os nanocristais como receptores, selecionou-se uma proteína da família das GFPs com emissão no vermelho, a HcRed1, como receptora e nanocristais de CdSe/ZnS recobertos com MUA com emissão no verde, como doadores, isto é, inverteu-se o par doador/receptor. Tal inversão trouxe vantagens experimentais para a verificação da ocorrência de FRET entre os compostos, tal como se verá a seguir.

4.8 A proteína HcRed1 e nanocristais de CdSe/ZnS com emissão no verde

Uma alternativa para se buscar a excitação seletiva entre nanocristais e proteínas seria invertendo o par doador/receptor, onde o nanocristal figuraria como doador. Para tanto, foi possível selecionar uma proteína homóloga à GFP com emissão mais para o vermelho e um nanocristal com emissão no verde. Como não estão disponíveis nanocristais com emissão no azul que sejam satisfatoriamente estáveis (dados do fornecedor NN-Labs) e que poderiam ser utilizados como doadores tendo a própria GFP5 como receptora, buscou-se proteínas homólogas à GFP com emissão mais para o vermelho. Em particular selecionou-se a proteína HcRed1 que tem o pico de absorção em torno de 570 nm e emissão em 640 nm. A HcRed1 é uma cromoproteína homóloga à GFP (Gurskayaa *et al.* 2001, Wilmann *et al.* 2005), tal proteína pode ser testada como receptora com nanocristais com emissão, por exemplo, no verde. Foram adquiridos nanocristais de CeSe/ZnS recobertos com MUA com emissão no verde. Tais nanocristais são semelhantes aos nanocristais com emissão no vermelho utilizados nos ensaios com a GFP5, porém tem diâmetro menor, o que impõe maior confinamento quântico e emissão de luz no comprimento de onda do verde (Dabbousi *et al.* 1997). Ainda assim, tais nanocristais tem a superfície constituída pelos mesmos compostos presentes na superfície dos nanocristais com emissão no vermelho, isto é, ZnS recoberto com MUA. Em um ensaio preliminar, foi verificado que tais nanocristais também impõe supressão da fluorescência à GFP5, ainda que com menor intensidade do que os nanocristais com emissão no vermelho, porém a interação destes com a proteína HcRed1 passou a ser o tema central da investigação.

4.9 Sobreposição entre o espectro de emissão dos nanocristais de CdSe/ZnS com emissão verde e o espectro de excitação da HcRed1

A eficiência do FRET depende, entre outros fatores, do grau de sobreposição entre os espectros de emissão do doador e o espectro de absorção do receptor. Na figura 11 pode-se verificar a sobreposição entre os espectros dos nanocristais de CdSe/ZnS com emissão no verde e a proteína HcRed1.

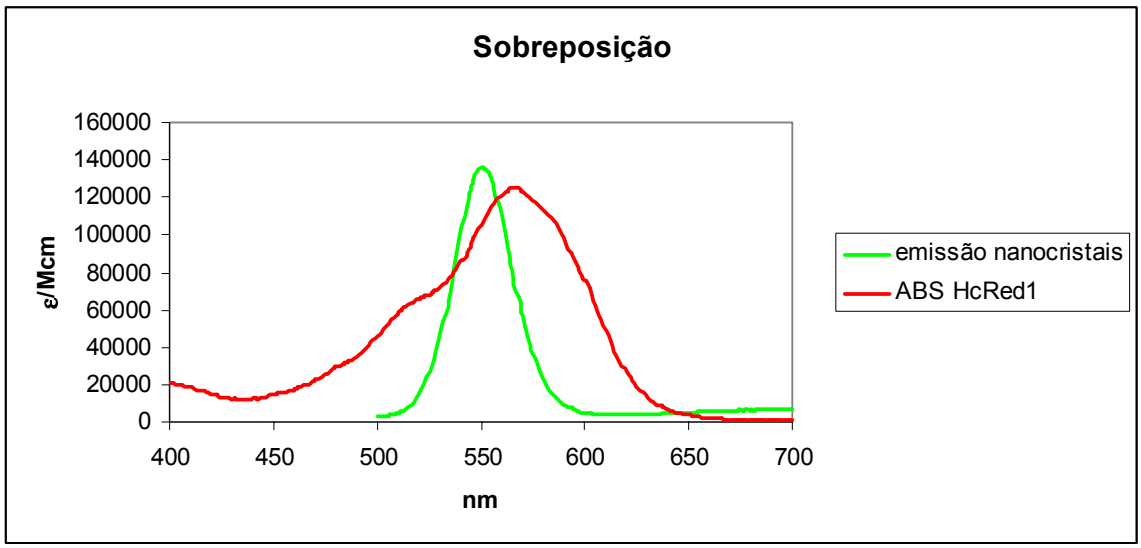


Figura 11. Sobreposição entre o espectro de emissão dos nanocristais de CdSe/ZnS com emissão no verde e o espectro de absorção da proteína HcRed1.

A partir da figura 11, observa-se que além da conveniente sobreposição entre os espectros, a proteína HcRed1 tem reduzida absorção no intervalo entre 400 e 475 nm, região que pode ser utilizada para promover a excitação seletiva dos nanocristais com emissão no verde, tendo em vista que estes nanocristais tem elevada absorção neste intervalo, tal como pode ser visto na figura 12.

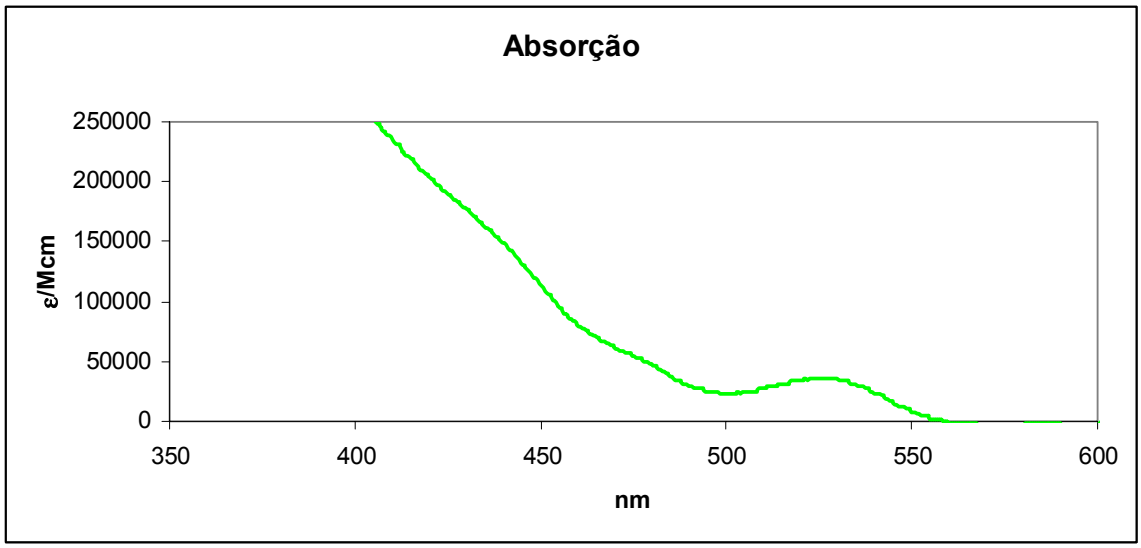


Figura 12. Espectro de absorção dos nanocristais de CdSe/ZnS com emissão no verde.

4.10 Supressão da fluorescência dos nanocristais verdes na presença da HcRed1

A titulação de HcRed1 em solução contendo nanocristais de CdSe/ZnS com emissão no verde, promove a supressão da fluorescência destes, tal como pode ser visto na figura 13.

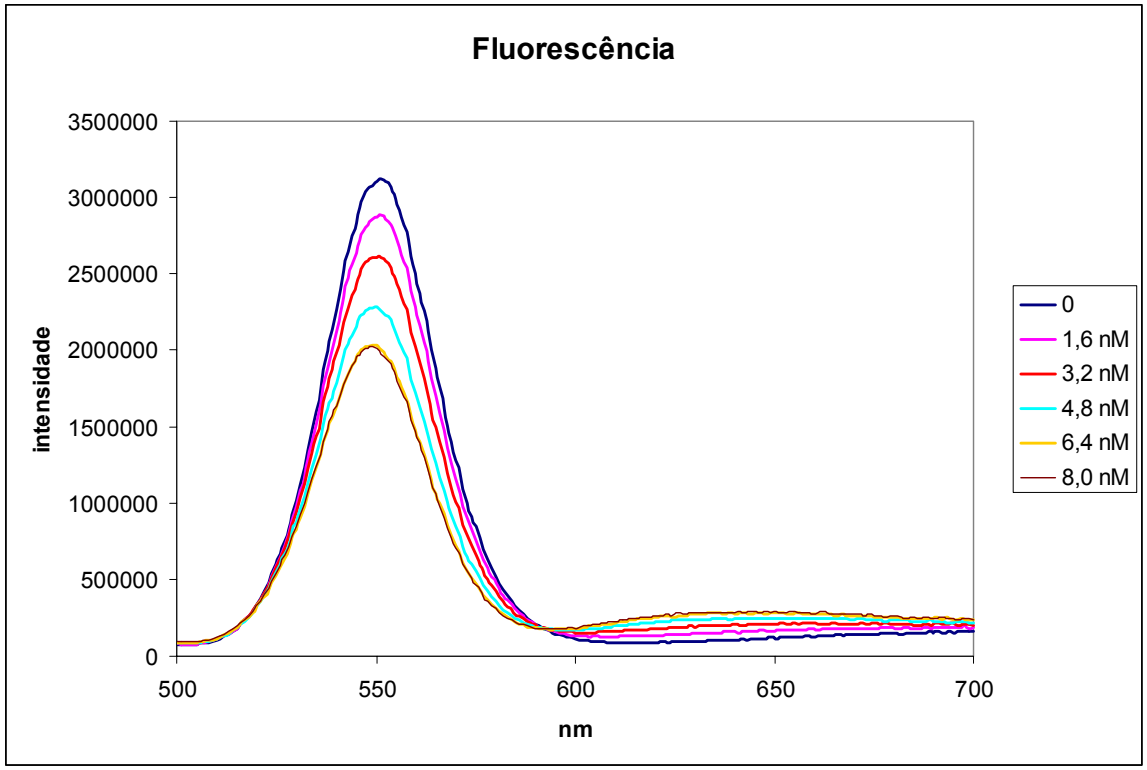


Figura 13. Supressão da fluorescência dos nanocristais de CdSe/ZnS com emissão no verde em função da concentração da proteína HcRed1. A concentração de nanocristais é 33 nM e a concentração de HcRed1 foi de 0 a 8 nM. A solução contém 5 mM de NaCl e 5 mM de NaH_2PO_4, o pH foi ajustado a 6 com a adição de NaOH . Espectro de emissão sendo a amostra excitada em 425 nm.

A partir da figura 13 pode-se verificar que a adição de HcRed1 à solução contendo os nanocristais com emissão no verde (550 nm) suprime a fluorescência destes até um valor mínimo de cerca de 65% do valor da intensidade inicial. Vale notar que a supressão ocorre sob concentrações nanomolares de proteína e nanocristais, o que aponta para uma interação de ligação entre estes dois compostos e não um processo de supressão dinâmica, dado que nesta reduzida concentração a supressão dinâmica estaria em discrepância com a velocidade de difusão das moléculas e com o tempo de vida do estado excitado dos nanocristais que é da ordem de 3 ns (Clapp *et al.* 2004, Lakowicz 2006c). Deste modo, tal como foi observado para a GFP5 e nanocristais com emissão no vermelho, ocorre interação por ligação. Vale acrescentar que o grau de diluição também é incompatível com uma eventual supressão trivial por

efeito filtro, pois o valor da densidade ótica é inferior a 0,01 e impõe correções diminutas à intensidade da emissão (Medintz *et al.* 2003). Também se pode observar na figura 13, além da supressão da fluorescência dos nanocristais, o surgimento de uma banda de emissão em torno de 640 nm, isto é, na região de emissão da proteína HcRed1. Tal efeito pode ser melhor observado na figura 14.

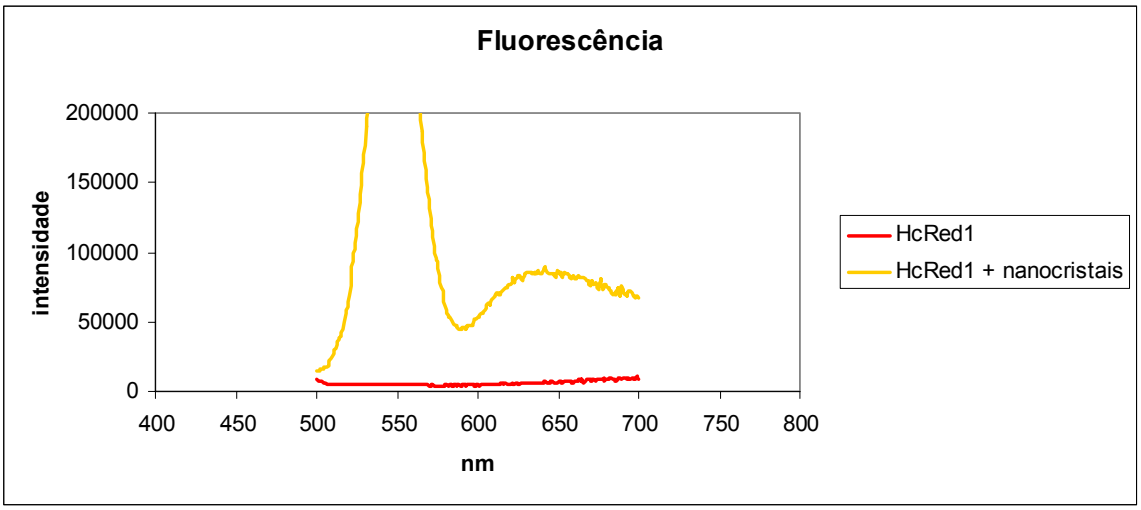


Figura 14. Emissão sensitizada da proteína HcRed1 na presença de nanocristais de CdSe/ZnS com emissão no verde. A concentração de HcRed1 é 96 nM. A concentração adicionada de nanocristais é de 98 nM. Espectro de emissão sendo a amostra excitada em 425 nm.

Na figura 14 foi mantida constante a concentração de HcRed1, sendo a amostra excitada em 425 nm. Com tal excitação a HcRed1 praticamente não apresenta emissão de luz (curva em vermelho). Quando são adicionados nanocristais de CdSe/ZnS com emissão no verde, verifica-se que a HcRed1 passa a apresentar emissão de luz com comprimento de onda em torno de 640 nm (curva em amarelo). Tal emissão é denominada sensitizada, sendo característica do fenômeno de transferência de energia não radiativa, isto é, FRET. Vale acrescentar que a eficiência quântica da HcRed1 é de apenas 5% (45), de modo que a emissão sensitizada não é intensa.

Na figura 15 pode-se observar a emissão da HcRed1 excitada diretamente com luz de comprimento de onda de 545 nm e verificar que o formato da curva de emissão

direta, bem como a posição do pico de emissão, coincide com o espectro de emissão sensitizada.

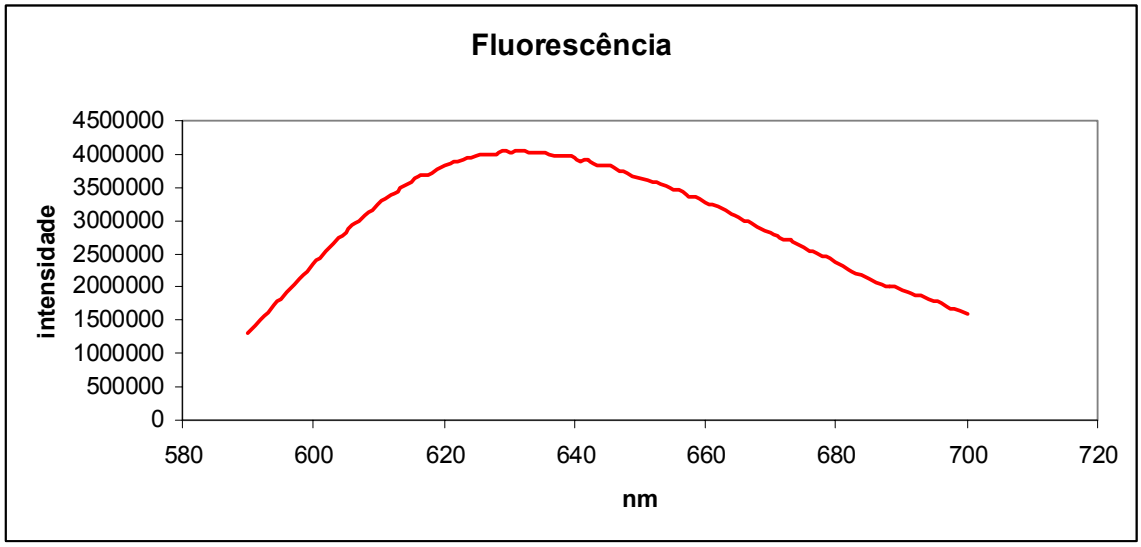


Figura 15. Espectro de emissão da HcRed1 excitada em 545 nm.

4.11 Efeito do pH sobre a interação entre nanocristais de CdSe/ZnS com emissão no verde e a proteína HcRed1

A formação do complexo entre os nanocristais e a HcRed1 também é dependente do pH, tal qual foi observado entre a GFP5 e os nanocristais com emissão no vermelho. Em pH 10, a introdução da proteína HcRed1 em solução contendo nanocristais, não provoca a supressão da fluorescência destes, e também não se observa o efeito de emissão sensitizada, tal como pode ser observado na figura 16. Vale acrescentar que a intensidade da fluorescência da HcRed1, quando excitada diretamente, se mantém praticamente constante em pH's entre 5 e 8,5 (dados do fornecedor Clontech).

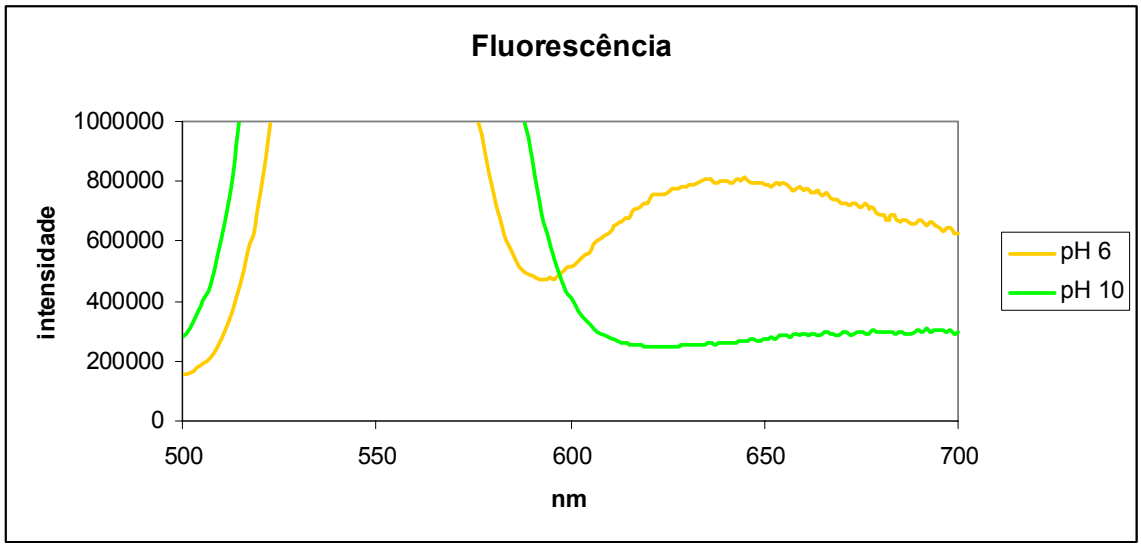


Figura 16. Efeito do pH sobre a emissão sensitizada. Nas duas curvas a concentração de nanocristais de CdSe/ZnS com emissão no verde é de 100 nM e a concentração de HcRed1 é de 50 nM. Espectro de emissão sendo a amostra excitada em 425 nm.

A dependência com relação ao pH aponta para uma interação eletrostática entre os nanocristais e a HcRed1, bem como demonstra que a emissão sensitizada somente ocorre quando existe a formação do complexo entre estes compostos.

4.12 Eficiência de FRET, distância de Förster e distância entre fluoróforos para o par envolvendo nanocristais de CdSe/ZnS com emissão no verde e a proteína HcRed1

Tal como foram anteriormente calculados os parâmetros de FRET para o par GFP5 e nanocristais com emissão no vermelho, pôde-se também obter os valores para o par HcRed1 e nanocristais com emissão no verde. Procedendo de forma equivalente, obteve-se os valores para a eficiência do FRET (E), distância de Förster (R_0) e distância entre fluoróforos (r). Utilizando-se para κ^2 o valor de 2/3, valor que é apropriado para uma média randômica entre os ângulos dos dipolos do doador e do receptor (Lakowicz

2006a), assumindo o índice de refração (n) como sendo 1,4 e utilizando o valor de 30% para a eficiência quântica dos nanocristais com emissão no verde (Dabbousi *et al.* 1997) e calculando o valor da integral de sobreposição (J) a partir das curvas presentes na figura 11, obteve-se:

$J = 8{,}90 \times 10^{15}\ M^{-1}cm^{-1}nm^4$

$E = 36\%$

$R_0 = 46$ Å

$r = 50$ Å

É interessante observar que apesar dos nanocristais com emissão no verde terem um diâmetro menor, cerca de 3 nm (Dabbousi *et al.* 1997), a distância entre fluoróforos é maior do que a obtida para o caso da GFP5 e os nanocristais com emissão no vermelho, que havia sido estimada em 42 Å.

4.13 Efeito da transferência de energia sobre a anisotropia da HcRed1

Tanto a GFP5 quanto a HcRed1, quando excitadas com luz polarizada, emitem luz polarizada. A anisotropia, no entanto, pode ser diminuída por transferência de energia por ressonância (FRET), isto é, a anisotropia da emissão sensitizada é menor do que a anisotropia proveniente da emissão direta (Lakowicz 2006b). Na figura 17 pode-se verificar o efeito dos nanocristais com emissão no verde sobre a anisotropia da HcRed1.

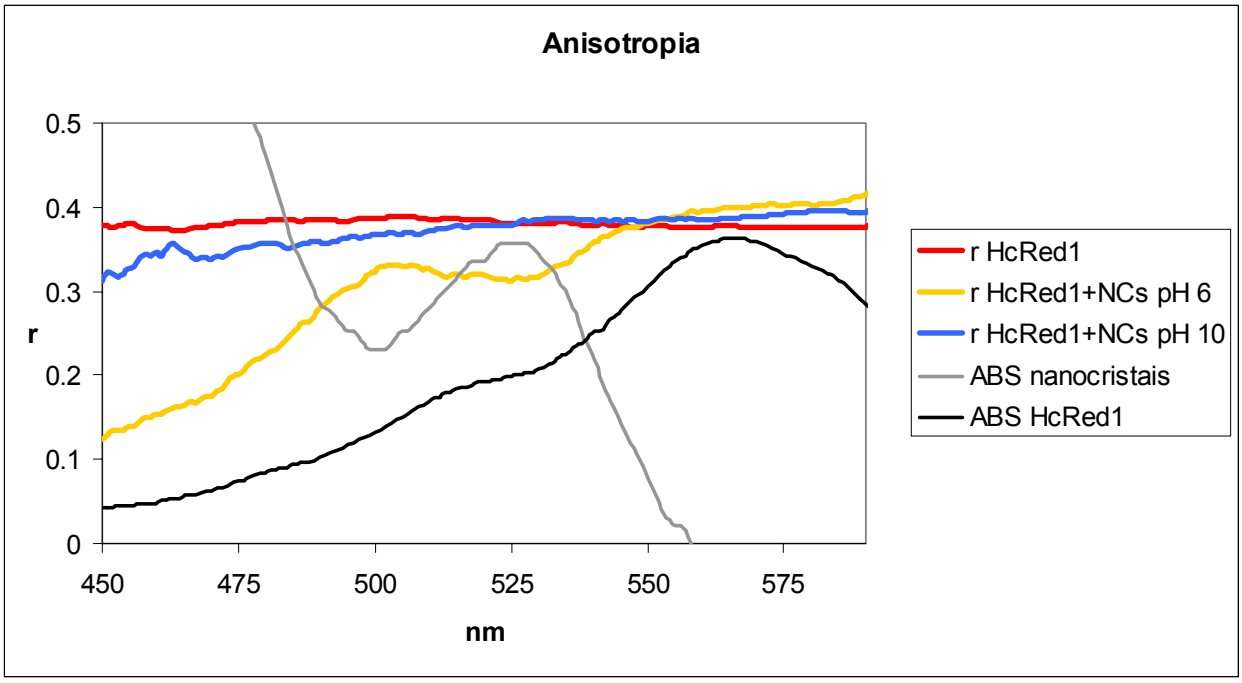


Figura 17. Espectro de anisotropia de excitação da proteína HcRed1 na ausência e na presença de nanocristais (NCs) de CdSe/ZnS com emissão no verde, em pH 6 e 10. Emissão em 642 nm. As curvas em cinza e preto ilustram a absorção dos nanocristais e da HcRed1.

Na figura 17, comparando-se as curvas em vermelho (anisotropia da HcRed1) e a curva em amarelo (anisotropia da HcRed1 na presença de nanocristais em pH 6), se observa que a anisotropia da HcRed1 é diminuída em toda a região do gráfico onde a absorção dos nanocristais é relevante. A partir de 540 nm, a absorção dos nanocristais declina substancialmente e a absorção da proteína aumenta, de modo que o valor da anisotropia retorna ao valor observado para a proteína livre (curva em vermelho). Em pH 10 (curva em azul), praticamente não ocorre a ligação entre a HcRed1 e os nanocristais, o que leva esta curva de anisotropia a ser ssemelhante a da proteína livre (curva em vermelho). Outra característica presente na figura 17 está relacionada ao entrelaçamento da curva em amarelo (HcRed1 + nanocristais em pH6) com a curva em cinza (absorbância dos nanocristais) na região entre 490 nm a 540. Nesta região se pode observar que quando a absorbância dos nanocristais é mais elevada, a anisotropia da proteína diminui, e quando a absorbância dos nanocristais diminui, a

anisotropia da HcRed1 aumenta. Tal característica dá consistência a este resultado, pois evidencia que quando a anisotropia é proveniente da emissão sensitizada ela é menor, e quando a anisotropia é proveniente da excitação direta da HcRed1, ela é maior.

5. Discussão

O interesse por sistemas envolvendo proteínas e nanocristais surgiu, primeiramente, a partir de experimentos envolvendo o citrocromo *c* e nanocristais de TiO2. Topoglidis *et al.* (2000) demonstraram que o citocromo *c* pode ser imobilizado em filmes nanoporosos de TiO2 e ter seu estado redox modulado através da tensão elétrica aplicada ao filme. Dada a experiência do laboratório em investigações envolvendo o citocromo *c*, buscou-se caracterizar o efeito de biomoléculas que interagissem com o citocromo *c*, sobre a interação deste com os nanocristais de TiO2. Resultados preliminares apontaram para a capacidade do ATP e ADP, em concentrações milimolares, de impedirem a transferência de carga entre o TiO2 e o citrocromo *c*. Paralelamente a estes ensaios, buscou-se verificar se outras proteínas também interagiriam com o TiO2. Foi neste momento que a GFP5 foi introduzida na pesquisa. Após proceder com a obtenção do plasmídio codificando a GFP5 e efetivar a expressão e purificação desta, observou-se que a GFP5 não se complexava com o TiO2 e, se creditou este comportamento ao fato da GFP5 ter seu ponto isoelétrico (pi) próximo ao do TiO2, isto é, em torno de 5 (Mazzola *et al.* 2006, Macnamee *et al.* 2005), diferentemente do citocromo *c*, cujo pi é próximo a 10 (Choi *et al.* 2006). Deste modo, creditou-se ao fator eletrostático a não interação entre a GFP5 e os nanocristais de TiO2. Posteriormente iniciou-se a síntese de outros nanocristais no laboratório, dentre estes, nanocristais de ZnS recobertos com 2-mercaptoetanol. A introdução destes nanocristais em solução contendo a GFP5, em pH próximo à neutralidade, permitia observar a formação de um complexo entre estes compostos. Além disto, iluminação com luz UV permitiu verificar que a proteína complexada com os nanocristais de ZnS

mantinha seu caráter fluorescente. A síntese de nanocristais fluorescentes, através da dopagem do ZnS, ou através da utilização de outros materiais semicondutores, requer um processo experimental bastante cuidadoso e especializado, de modo que se optou pela aquisição de nanocristais de CdSe/ZnS de terceiros para dar prosseguimento ao estudo da interação entre a GFP5 e estes compostos. Tinha-se a consciência de que dois compostos fluorescentes interagentes, que apresentassem sobreposição dos espectros de emissão e absorção, poderiam manifestar efeitos de transferência de energia. Sendo assim, foram adquiridos nanocristais de CdSe/ZnS com diferentes cores de emissão, objetivando a verificação da interação destes com a GFP5. Pôde-se prontamente detectar que nanocristais de CdSe/ZnS recobertos com MUA e que apresentassem absorção na região de emissão da GFP5, tinham a capacidade de suprimir a fluorescência desta proteína. Em particular nanocristais com emissão no vermelho causam um efeito de supressão da fluorescência bastante intenso, pouco acima de 90%. Apesar das características e parâmetros envolvendo o fenômeno de supressão apontarem para uma transferência de energia por ressonância, precisou-se verificar a hipótese de que outro fenômeno estivesse causando tal efeito. Através da utilização de baixas concentrações tanto de GFP5 quanto de nanocristais, descartou-se a possibilidade de algum efeito de filtro interno. A modulação da interação em função do pH também deu consistência à refutação de se ter algum fenômeno trivial como agente causador da supressão da fluorescência. A manutenção da estrutura secundária, observada através do dicroísmo circular, descartou a hipótese da supressão da fluorescência ser motivada pela desnaturação da proteína. Ainda assim, e tendo em vista que o intervalo de excitação dos nanocristais sobrepõe o intervalo de excitação da GFP5, a possibilidade de se verificar a emissão sensitizada estava frustrada. Tentou-se

verificar a alteração no tempo de vida do estado excitado da GFP5 na presença dos nanocristais ou verificar o aumento da anisotropia da GFP5 quando complexada com os nanocristais de CdSe/ZnS com emissão no vermelho (Jares-Erijman e Jovin 2006, 2003). Porém, a elevada supressão da fluorescência motivada pelos nanocristais obrigava a se trabalhar com concentrações elevadas dos dois compostos para atingir o intervalo de sensibilidade do fluorímetro com resolução temporal ou do fluorímetro estático munido de polarizadores. Porém, em concentrações acima 100 nM, em pH 6, os nanocristais com emissão no vermelho sofrem precipitação, de modo que dificuldades no arranjo experimental levaram a abandonar, num primeiro instante, a tentativa de comprovar o FRET através de medidas que envolvessem a caracterização da fluorescência da GFP5 complexada com os nanocristais. A análise da anisotropia do receptor, neste caso os nanocristais com emissão no vermelho, também se não mostrou um caminho adequado, por terem os nanocristais esféricos anisotropia próxima a zero, o que impedia verificar o efeito da emissão sensitizada de reduzir o valor da anisotropia. Cogitou-se a respeito de experimentos mais sofisticados para comprovar a natureza da supressão da fluorescência sofrida pela GFP5, porém antes de partir para arranjos experimentais complexos, buscou-se uma solução mais natural, isto é, de utilizar os nanocristais como doadores, de modo a tirar proveito do seu extenso intervalo de excitação, em resumo, se inverteria o par doador-receptor. Para tanto, empreendeu-se a aquisição de gene codificando proteína homóloga à GFP5, porém com emissão no vermelho, a HcRed1. A HcRed1 tem um elevado coeficiente de extinção molar, 125.000 $cm^{-1}M^{-1}$ em 570 nm, e emissão em torno de 640 nm. A introdução desta proteína em solução contendo nanocristais, com emissão no verde em particular, promoveu a supressão da fluorescência destes. Tomou-se o cuidado de

caracterizar a supressão da fluorescência dos nanocristais sob concentrações reduzidas de HcRed1, de modo a excluir o efeito filtro como motivador da supressão. Neste novo sistema, pôde-se comprovar a manifestação da transferência de energia por ressonância através de duas maneiras, além da promoção da supressão da fluorescência. A primeira delas foi a observação de emissão sensitizada, e a segunda a redução da anisotropia do receptor, a HcRed1, motivada pela transferência de energia.

Tanto para a GFP5 e nanocristais com emissão no vermelho, quanto para os nanocristais com emissão no verde e a HcRed1, foi possível calcular o raio de Förster e a distância entre fluoróforos. Nos dois casos, a distância entre fluoróforos se mostrou compatível com as dimensões das proteínas e dos nanocristais, sendo da ordem de 50 ângstrons.

Experimentos envolvendo o efeito da variação do pH sobre a eficiência da supressão da fluorescência em ambos os sistemas, GFP5 e nanocristais com e missão no vermelho, e HcRed1 e nanocristais com emissão no verde, permitiu verificar que a interação entre as proteínas e os nanocristais é motivada por atração eletrostática, de forma semelhante a outros casos descritos na literatura, envolvendo nanocristais de CdSe/ZnS e outras proteínas (Klostranec e Chan 2006, Mattoussi et al. 2000).

6. Conclusões

A caracterização de dois conjuntos formados por proteínas fluorescentes e nanocristais fluorescentes de CdSe/ZnS permite, em princípio, generalizar o conceito de que tais compostos formam pares nos quais ocorre a supressão não trivial da fluorescência do elemento figurante como doador, sendo que quando tal elemento é um nanocristal, pode-se prontamente demonstrar que a motivação da supressão da fluorescência é dada pela transferência de energia por ressonância (FRET).

Em resumo, se têm que nanocristais de CdSe/ZnS e proteínas fluorescentes pertencentes à família das GFPs, formam complexos motivados por interação eletrostática, sendo que a formação de tais complexos pode ser monitorada pela supressão da fluorescência do doador ou até mesmo, por outras manifestações reveladoras da transferência de energia por FRET. Sendo assim, abre-se um extenso conjunto de possíveis pares, dado que as proteínas da família das GFPs tem inúmeras variantes, nativas ou mutantes, com diferentes propriedades de absorção, emissão, sensibilidade a pH, a íons, fotocromicidade, etc. e situação semelhante se dá com os nanocristais, que tendo suas propriedades óticas moduladas pelo diâmetro da partícula, criam uma família de elementos semelhantes, com vastas propriedades espectrais.

Munidos de diversos pares, cuja interação é de fácil verificação e revela aproximações a distâncias da ordem de 50 ângstrons, se tem um conjunto de sondas à disposição, não apenas para aprofundar a caracterização da interação entre os seus elementos, mas também para utilização em experimentos, quiçá no âmbito da Biologia Celular, isto é, *in vivo*.

7. Referências

Ando, R., H. Mizuno and A. Miyawaki (2004) Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting. *Science* **306**, 1370–1373.

Barondeau, D. P., C. D. Putnam, C. J. Kassmann, J. A. Tainer and E. D. Getzoff (2003) Mechanism and energetics of green fluorescent protein chromophore synthesis revealed by trapped intermediate structures. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100, 12111–12116.

Barondeau, D. P., C. J. Kassmann, J. A. Tainer and E. D. Getzoff (2005) Understanding GFP chromophore biosynthesis: controlling backbone cyclization and modifying post-translational chemistry. Biochemistry 44, 1960–1970.

Benson, D. E., D. W. Conrad, R. M. de Lorimer, S. A. Trammell,H. W. Hellinga (2001) Design of Bioelectronic Interfaces by Exploiting Hinge-Bending Motions in Proteins. *Science.* **293**, 1641-1644.

Brooks, S. (2005) The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *Journal of Microscopy* **217**, 1–2.

Bruchez, M., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos (1998) Semiconductor nanocrystals as flourescent biological labels. *Science.* **281**, 2013-2015.

Choi, J. W., Y. S. Nama, S. C. Jeonga, W. H. Leea and M. C. Petty (2006) Molecular rectifier consisting of cytochrome c/GFP heterolayer by using metal coated optical fiber tip. *Current Applied Physics.* 6, 839-843.

Chon, J. W. M., M. Gu, C. Bullen and P. Mulvaney (2004) Three-photon excited band edge and trap emissionof CdS semiconductor nanocrystals. *Appl. Phys. Lett.* **84**, 4472-4474.

Chudakov, D. M., A. V. Feofanov, N. N. Mudrik, S. Lukyanov and K. A. Lukyanov (2003) Chromophore environment provides clue to ‘‘kindling fluorescent protein’’ riddle. *J. Biol. Chem.* **278**, 7215–7219.

Chudakov, D. M., V. V. Verkhusha, D. B. Staroverov, E. Souslova, S. Lukyanov and K. A. Lukyanov (2004) Photoswitchable cyan fluorescent protein for protein tracking. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1435–1439.

Clapp, A. R., I. L. Medintz, J. M. Mauro, B. R. Fisher, M. G. Bawendi and H. Mattoussi (2004) Fluorescence Resonance Energy Transfer Between Quantum Dot Donors and Dye-Labeled Protein Acceptors. J. Am. Chem. Soc. **126**, 301-310.

Clegg, R. M. (1996) *Fluorescence imaging spectroscopy and microscopy*. Wiley, 179-252.

Cody, C. W., D. C. Prasher, W. M. Westler, F. G. Prendergast and W. W. Ward (1993) Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein. *Biochemistry* **32**, 1212–1218.

Coe, S., W. K. Woo, M. G. Bawendi and V. Bulovic (2002) Electroluminescence from single monolayers of nanocrystals in molecular organic devices. *Nature*. **420**, 800-803.

Cubitt, A. B., R. Heim, S. R. Adams, A. E. Boyd, L. A. Gross and R. Y. Tsien (1995) Understanding, improving, and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 448–455.

Dabbousi B. O, J. Rodriguez-Viejo, F. V. Mikulec, J. R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. F. Jensen and M. G. Bawendi* (1997) (CdSe)ZnS Core-Shell Quantum Dots: Synthesis and Characterization of a Size Series of Highly Luminescent Nanocrystallites. *J. Phys. Chem. B.* **101**, 9463-9475.

Delehanty, J. B., I. L. Medintz, T. Pons, F. M. Brunel, P. E. Dawson and H. Mattoussi (2006) Self-Assembled Quantum Dot-Peptide Bioconjugates for Selective Intracellular Delivery. *Bioconjugate Chem.* **17**, 920-927.

Dooley, C. M., T. M. Dore, G. T. Hanson, W. C. Jackson, S. J. Remington and R. Y. Tsien (2004) Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. *J. Biol. Chem.* **279**, 22284–22293.

Dove, S. G., O. Hoegh-Guldberg and S. Ranganathan (2001) Major colour patterns of reef-building corals are due to a family of GFP-like proteins. Coral Reefs 19, 197–204.

Elsliger, M. A., R. M. Wachter, G. T. Hanson, K. Kallio and S. J. Remington (1999) Structural and spectral response of green fluorescent protein variants to changes in pH. *Biochemistry* **38**, 5296–5301.

Förster, Th. (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* **2**, 55-75.

Goldman E. R., I. L. Medintz, A. Hayhurst, G. P. Anderson, J. M. Mauroa, B. L. Iverson, G. Georgiou and H. Mattoussi (2005) Self-assembled luminescent CdSe–ZnS quantum dot bioconjugates prepared using engineered poly-histidine terminated proteins. *Analytica Chimica Acta*. **534**, 63–67.

Gross, L. A., G. S. Baird, R. C. Hoffman, K. K. Baldridge and R. Y. Tsien (2000) The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 11990–11995.

Guo, W., J. J Li, Y. A. Wang, X. Peng (2003) Conjugation Chemistry and Bioapplications of Semiconductor Box Nanocrystals Prepared via Dendrimer Bridging. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 3901-3909.

Gurskayaa, N. G, A. F. Fradkova, A. Terskikhb, M. V. Matza, Y. A. Labasc, V. I. Martynova, Y. G. Yanushevicha, K. A. Lukyanova, S. A. Lukyanovav (2001) GFP-like chromoproteins as a source of far-red fluorescent proteins. *FEBS Letters* **507**, 16-20.

Hanson, G. T., R. Aggeler, D. Oglesbee, M. Cannon, R. A. Capaldi, R. Y. Tsien and S. J. Remington (2004) Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *J. Biol. Chem.* **279**, 13044–13053.

Hao, Z. H., H. M. Gong, J. B. Han, Y. Y. Zhai and Q. Q. Wang (2006) One- and two-photon excited fluorescence of CdSe and CdSe/ZnS quantum dots in n-hexane. *Chin. Phys. Lett.* **23**, 2859-2862.

Heim R., D. C. Prasher and R. Y. Tsien (1994) Wavelength mutations and post-translational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**,12501–12504.

Heim, R and R. Y. Tsien (1996) Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Current Biology* **6**, 178–182.

Heim, R., D. C. Prasher and R. Y. Tsien (1994) Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 12501–12504.

Henderson, J. N. and S. J. Remington (2005) Crystal structures and mutational analysis of amFP486, a cyan fluorescent protein from Anemonia majano. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102, 12712–12717.

Hu, J., L. S. Li, W. Yang, L. Manna, L. W. Wang and A. P. Alivisatos (2001) Linearly polarized emission from colloidal semiconductor quantum rods. *Science*, **292**, 2060-2063.

Hua, X. F, T. C. Liu, Y. C. Cao, B. Liu, H. Q. Wang, J. H. Wang, Z. L. Huang and Y. D. Zhao (2006) Characterization of the coupling of quantum dots and immunoglobulin antibodies. *Anal. Bioanal. Chem.* **386**, 1665–1671.

Huynh, W. U., J. J. Dittmer and A. P. Alivisatos (2002) Hybrid Nanorod-Polymer Solar Cells. *Science*. **295**, 2425-2427.

Ip, D. T., S. H. Chan, M. D. Allen, M. Bycroft, D. C. Wan and K. B. Wong (2004) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a novel orange fluorescent protein from the Cnidaria tube anemone Cerianthus sp. Acta Cryst. D Biol. Crystallogr. 60(Pt2), 340–341.

Iqbal, S. S., M. W. Mayo, J. G. Bruno, B. V. Bronk, C. A. Batt and J. P. Chambers. (2000) A review of molecular recognition technologies for detection of biological threat agents. *Biosens. Bioelectron.* **15**, 549-578.

Jablonski A. (1970) Anisotropy of fluorescence of molecules excited by excitation transfer. *Acta Phys. Pol. A.* **38**, 453-458.

Jares-Erijman, E. A. and T. M Jovin (2006) Imaging molecular interactions in living cells by FRET microscopy. *Current Opinion in Chemical Biology.* **10**, 409–416.

Jares-Erijman, E. A. and T. M. Jovin (2003) Fret imaging. Nature Biotech. 21, 1387-1395.

Jayaraman, S., P. Haggie, R. M. Wachter, S. J. Remington and A. S. Verkman (2000) Mechanism and cellular applications of a green fluorescent protein-based halide sensor. *J. Biol. Chem.* **275**, 6047–6050.

Ji, X., J. Zheng, J. Xu, V. K. Rastogi, T. C. Cheng, J. J. DeFrank and R. M. Leblanc (2005) (CdSe)ZnS Quantum Dots and Organophosphorus Hydrolase

Bioconjugate as Biosensors for Detection of Paraoxon. *J. Phys. Chem. B*. **109**, 3793-3799.

Karasawa, S., T. Araki, M. Yamamoto-Hino and A. Miyawaki (2003) A green-emitting fluorescent protein from Galaxeidae coral and its monomeric version for use in fluorescent labeling. J. Biol. Chem. 278, 34167–34171.

Khosravi, A. A., M. Kundu, and B. A. Kuruvilla (1995) Manganese doped zinc sulphide nanoparticles by aqueous method. *Appl. Phys. Lett.* **67**, 2506-2508.

Kirkpatrick, S. M., R, R. Naik and M. O. Stone (2001) Nonlinear Saturation and Determination of the Two-Photon Absorption Cross Section of Green Fluorescent Protein. *J. Phys. Chem. B.* **105**, 2867-2873.

Klostranec, J. M. and Warren W. C. W. (2006) Quantum Dots in Biological and Biomedical Research: Recent Progress and Present Challenges. *Adv. Mater.* **18**, 1953–1964.

Lakowicz, J. R. (2006a) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer **3a. Edição**, 443-475.

Lakowicz, J. R. (2006b) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer **3a. Edição**, 353-382.

Lakowicz, J. R. (2006c) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer **3a. Edição**, 277-330.

Lakowicz, J. R. and Gryczynski I. (1997) Multiphoton excitation of biochemical fluorophores. *Topics in fluorescence spectroscopy.* Plenum press. **5**, 87-144.

Lippincott-Schwartz, J. and G. H. Patterson (2003) Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* **300**, 87–91.

Lukyanov, K. A., A. F. Fradkov, N. G. Gurskaya, M. V. Matz, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, M. L. Markelov, A. G. Zaraisky, X. Zhao, Y. Fang, W. Tan and S. A. Lukyanov (2000) Natural animal coloration can be determined by a nonfluorescent green fluorescent protein homolog. *J. Biol. Chem.* **275**, 25879–25882.

Ma J., J. Y. Chen, J. Guo, C. C. Wang, W. L. Yang, L. Xu and P. N. Wang (2006) Photostability of thiol-capped CdTe quantum dots in living cells: the effect of photo-oxidation. *Nanotechnology*. **17**, 2083–2089.

Mattoussi, H., J. M. Mauro, E. R. Goldman, G. P. Anderson, V. C. Sundar, F. V. Mikulec and M. G. Bawendi (2000) Self-Assembly of CdSe-ZnS Quantum Dot Bioconjugates Using an Engineered Recombinant Protein. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 12142-12150.

Matz, M. V., A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zaraisky, M. L. Markelov and S. A. Lukyanov (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat. Biotechnol.* **17**, 969–973.

Matz, M. V., K. A. Lukyanov and S. A. Lukyanov (2002) Family of the green fluorescent protein: journey to the end of the rainbow. *BioEssays* **24**, 953–959.

Mazzola, P. G., M. Ishii, E. Chau, O. Cholewa and T. C. V. Penna (2006) Stability of Green Fluorescent Protein (GFP) in Chlorine Solutions of Varying pH. *Biotechnol. Prog.* **22**, 1702-1707.

McNamee, C. E., Y. Tsujii and M. Matsumoto (2005) Physicochemical characterization of an anatase TiO2 surface and the adsorption of a nonionic surfactant: an atomic force microscopy study. *Langmuir.* **21**, 11283-11288.

Medintz I. L., A. R. Clapp, H. Mattoussi, E. R. Goldman, B. Fisher and J. M. MAURO (2003) Self-assembled nanoscale biosensors based on quantum dot FRET donors. *nature materials*. **2**, 630-638.

Medintz I. L., J. H. Konnert, A. R. Clapp, I. Stanish, M. E. Twigg, H. Mattoussi, J. M. Mauro, and J. R. Deschamps (2004) A fluorescence resonance energy transfer-derived structure of a quantum dot-protein bioconjugate nanoassembly. *PNAS*. **101**, 9612–9617.

Medintz, I., E. R. Goldman, M. E. Lassman and J. M. Mauro (2003) A Fluorescence Resonance Energy Transfer Sensor Based on Maltose Binding Protein. *Bioconjugate Chem.* **14**, 909-918.

Meyer, J. S., M. L. Katz and M. D. Kirk (2005) Stem cells for retinal degenerative disorders. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1049**, 135–145.

Mizuno, H., T. K. Mal, K. I. Tong, R. Ando, T. Furuta, M. Ikura and A. Miyawaki (2003) Photo-induced peptide cleavage in the green-tored conversion of a fluorescent protein. Mol. Cell 12, 1051–1058.

Murray, C. B., D. J. Norris and M. G. Bawendi (1993) Synthesis and Characterization of Nearly Monodisperse CdE (E = S, Se, Te) Semiconductor Nanocrystallites. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 8706-8715.

Nienhaus, K., B. Vallone, F. Renzi, J. Wiedenmann and G. U. Nienhaus (2003) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the red fluorescent protein eqFP611. Acta Cryst. D59, 1253–1255.

Nishiuchi, Y., T. Inui, H. Nishio, J. Bodi, T. Kimura, F. I. Tsuji and S. Sakakibara (1998) Chemical synthesis of the precursor molecule of the Aequorea green fluorescent

protein, subsequent folding, and development of fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 13549–13554.

Niwa, H., S. Inouye, T. Hirano, T. Matsuno, S. Kojima, M. Kubota, M. Ohashi and F. I. Tsuji (1996) Chemical nature of the light emitter of the Aequorea green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 13617–13622.

O'Connell, P. J and G. G Guilbault (2001) Future trends in biosensors research. *Anal. Lett.* **34**, 1063-1078.

Ormo, M., A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien and S. J. Remington (1996) Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. *Science* **273**, 1392–1395.

Peng, X., L. Manna, W. Yang, J. Wickham, E. Scher, A. Kadavanich and A. P. Alivisatos (2000) Shape control of CdSe nanocrystals. *Nature*. **404**, 59-61.

Peng, X., L. Manna, W. Yang, J. Wickham, E. Scher, A. Kadavanich and A. P. Alivisatos (2000) Shape control of CdSe nanocrystals. *Nature*. **404**, 59-61.

Petersen, J., P. G. Wilmann, T. Beddoe, A. J. Oakley, R. J. Devenish, M. Prescott and J. Rossjohn (2003) The 2.0 A crystal structure of eqFP611, a far-red fluorescent protein from the sea anemone Entacmaea quadricolor. J. Biol. Chem. 278, 44626–44631.

Prasher, D. C., V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast and M. J. Cormier (1992) Primary structure of the Aequorea Victoria green fluorescent protein. *Gene* **111**, 229–233.

Prescott, M., M. Ling, T. Beddoe, A. J. Oakley, S. Dove, O. Hoegh-Guldberg, R. J. Devenish and J. Rossjohn (2003) The 2.2 A crystal structure of a Pocilloporin pigment reveals a nonplanar chromophore conformation. Structure 11, 275–284.

Qu, L., Z. A. Peng, X. Peng, (2001) Alternative Routes toward High Quality Cdse Nanocrystals. *Nano Lett.* **1**, 333-337.

Reiss, P, J. Bleuse, A. Pron, (2002) Highly luminescent CdSe/ZnSe core/shell nanocrystals of low size dispersion. *Nano Lett.* **2**, 781-784.

Remington, S. J., R. M. Wachter, D. K. Yarbrough, B. P. Branchaud, D. C. Anderson, K. Kallio and K. A. Lukyanov (2005) zFP538, a yellow fluorescent protein from Zoanthus, contains a novel three-ring chromophore. Biochemistry 44, 202–212.

Rizzo, M. A. and D. W. Piston (2004) High-Contrast Imaging of Fluorescent Protein FRET by Fluorescence Polarization Microscopy. *Biophys. J.* **Biophys. Letters**. L14-L16.

Rosenow, M. A., H. A. Huffman, M. E. Phail and R. M. Wachter (2004) The crystal structure of the Y66L variant of green fluorescent protein supports a cyclization-–oxidation–dehydration mechanism for chromophore maturation. Biochemistry 43, 4464–4472.

Rosenow, M. A., H. N. Patel and R. M. Wachter (2005) Oxidative chemistry in the GFP active site leads to covalent cross-linking of a modified leucine side chain with a histidine imidazole: implications for the mechanism of chromophore formation. Biochemistry 44, 8303–8311.

Selényi, P. (1939) Wide-angle interferences and the nature of the elementary light sources. *Phys. Rev.* **56**, 477-479

Shaner, N. C., R. E. Campbell, P. A. Steinbach, B. N. G. Giepmans, A. E. Palmer and R. Y. Tsien (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from Discosoma sp. Red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1567–1572.

Shimomura, O. (1979) Structure of the chromophore of Aequorea green fluorescent protein. *FEBS Lett.* **104**, 220–222.

Siemering, K. R., R. Golbik, R. Sever and J. Haseloff (1996) Mutations that suppress the thermosensitivity of greenfluorescent protein. *Current Biology*. **6**, 1653–1663

Sniegowski, J. A., J. W. Lappe, H. N. Patel, H. A. Huffman and R. M. Wachter (2005) Base catalysis of chromophore formation in Arg96 and Glu222 variants of green fluorescent protein. J. Biol. Chem. 280, 26248–26255.

Sniegowski, J. A., M. E. Phail and R. M. Wachter (2005) Maturation efficiency, trypsin sensitivity, and optical properties of Arg96, Glu222, and Gly67 variants of green fluorescent protein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 332, 657–663.

Songa, L., E. A. Jares-Erijman, T.M. Jovin (2002) A photochromic acceptor as a reversible light-driven switch in fluorescence resonance energy transfer (FRET) J. Photochem. Photobiol. A. **150,** 177–185.

Sun, S. H., C. B. Murray, D. Weller, L. Folks, A. Moser (2000) Monodisperse FePt Nanoparticles and Ferromagnetic FePt Nanocrystal Superlattices. *Science*. **287**, 1989-1992.

Swaminathan R., C. P. Hoang and A. S. Verkman (1997) Photobleaching Recovery and Anisotropy Decay of Green Fluorescent Protein GFP-S65T in Solution and Cells: Cytoplasmic Viscosity Probed by Green Fluorescent Protein Translational and Rotational Diffusion. *Biophys. J.* **72**, 1900-1907.

Terskikh, A., A. F. Fradkov, G. Ermakova, A. Zaraisky, P. Tan, A. V. Kajava, X. Zhao, S. Lukyanov, M. Matz, S. Kim, I. Weissman and P. Siebert (2000) ‘‘Fluorescent timer’’: Protein that changes color with time. *Science* **290**, 1585–1588.

Thompson, R. B., I. Gryczynski and J. Malicka (2002) Fluorescence polarization standards for high-throughput screening and imaging. *Biotech.* **32**, 34-42.

Tsien, R. Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509–544.

Topoglidis ,E., T. Lutz, R. L. Willis, C. J. Barnett, A. E. G. Cass and J. R. Durrant (2000) Protein adsorption on nanoporous TiO2 films: a novel approach to studying photoinduced protein/electrode transfer reactions. *Faraday Discussions*, 35 – 46.

Tubbs, J. L., J. A. Tainer and E. D. Getzoff (2005) Crystallographic structures of Discosoma red fluorescent protein with immature and mature chromophores: Linking peptide bond trans-cis isomerization and acylimine formation in chromophore maturation. Biochemistry 44, 9833–9840.

Verkhusha, V. and K. A. Lukyanov (2004) The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins. *Nat. Biotechnol.* **22**, 289–296.

Wachter, R. M. (2006) The family of GFP-like proteins: structure function photophysics and biosensor applications. Introduction and perspective. *Photochemistry and Photobiology* **82**, 339–344.

Wachter, R. M. and S. J. Remington (1999) Sensitivity of the yellow variant of green fluorescent protein to halides and nitrate. *Curr. Biol.* **9**, R628–R629.

Wall, M. A., M. Socolich and R. Ranganathan (2000) The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 1133–1138.

Wilmann P. G., J. Petersen, A. Pettikiriarachchi, A. M. Buckle, S. C. Smith, S. Olsen, M. A. Perugini, R. J. Devenish, M. Prescott and J. Rossjohn (2005) The 2.1 A Crystal Structure of the Far-red Fluorescent Protein HcRed: Inherent Conformational Flexibility of the Chromophore. *J. Mol. Biol.* **349**, 223–237.

Yang, F., L. G. Moss and G. N. Phillips (1996) The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotech.* **14**, 1246–1251.

Yang, T. T., P. Sinai, G. Green, P. A. Kitts, Y. T. Chen, L. Lybarger, R. Chervenak, G. H. Pattersoni, D. W. Pistoni and S. R. Kain (1998) Improved Fluorescence and Dual Color Detection with Enhanced Blue and Green Variants of the Green Fluorescent Protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 8212–8216.

Yarbrough, D., R. M. Wachter, K. Kallio, M. V. Matz and S. J. Remington (2001) Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-A resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 462–467.

Zheng, J., Y. Xie, R. Campbell, J. Song, R. Q. Wang, R. Chiu, J. Berenson, M. Razi, S. Massachi, O. O. Yang, I. S. Y. Chen, and S. Pang (2006) gp120-Independent HIV Infection of Cells Derived From the Female Reproductive Tract, Brain, and Colon. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **43**, 127-133.

Zimmer, M. (2002) Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem. Rev.* **102**, 759–781.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Vitor Renaux Hering
Local e data de nascimento: Brusque - SC, 24/04/1971

EDUCAÇÃO

Colégio Porto Seguro, São Paulo, 1988

Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, 1989
Graduação em Física

Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, 1995
Mestrado em Bioquímica

OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado, FAPESP, 1995 - 1998

SAP do Brasil, consultor em tecnologia da informação, 1998 – 2000

Bolsista no Centro de Pesquisas Renato Archer (CenPRA), CNPQ/PCI, 2001- 2003

Numina Nanotecnologia Ltda., sócio fundador, 2003

PUBLICAÇÕES E PATENTES

Vitor Renaux Hering, Flat Panel Displays Arrangement, PCT/BR2005/000081 (patente).

Victor Pellegrini Mammana e Vitor Renaux Hering (2003) Displays de Emissão de campo ou FEDs, *IPESI- Eletrônica & Informática*. **maio/junho**, 36 – 42.

H. Buikema. V. R. Hering, V. P. Mammana, F. T. Degasperi e A. Pavani Filho (2001) Calculation of Deflection for Porous Polyimide membranes in FEDs, The 21st. International Display Research Conference and The 8th International Display Workshops - Asia Display/IDW´01, Japan, October 2001. **Outstanding Poster Paper Award**.

Victor P. Mammana, Alaide P. Mammana, Vitor R. Hering e Aristides Pavani Fo. (2001) Displays de Informação: Oportunidades para o Brasil. *IPESI – Eletrônica e Informática*. **Maio/Junho**, 55-58.

Carvalho-Alves P. C., V. R. Hering, J. M. S. Oliveira, R. K. Salinas and S. Verjovski-Almeida (2000) Requirement of the hinge domain for dimerization of `Ca POT. 2+´-ATPase large cytoplasmic portion expressed in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta Amsterdam*. **1467**, 73-84