

## BIOSENSORIAMENTO ESTOCÁSTICO VIA NANOPORO PROTEICO INDIVIDUAL NO DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS ANALÍTICAS

Juliana P. Aguiar, Janilson J. S. Júnior, Dijanah C. Machado, Maria C. A. Melo e Cláudio G. Rodrigues\*

Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife – PE, Brasil

### Estrutura dos nanoporos proteicos biológicos

**Anthrax:** Depois de se ligar aos receptores na membrana plasmática da célula alvo e sofrer uma ativação proteolítica, o componente antígeno protetor da toxina do antraz formar um pré-poro heptamérico como na Figura 1S. O pré-poro sofre uma conversão dependente do pH que permite a translocação dos fatores de edema e letal para o citosol.<sup>1</sup>

**Aerolisina:** O poro da aerolisina tem um formato de cogumelo com um domínio extramembranar que varia entre 10-17 Å.<sup>2</sup> O comprimento dos poros da aerolisina e da alfatoxina é aparentemente o mesmo, mas o diâmetro é menor na aerolisina do que na alfatoxina, muito provavelmente pela ausência do domínio vestibular no poro formado pela aerolisina, resultando em um modelo semelhante a um rebite,<sup>3</sup> como indicado na Figura 2S.

### Limitações e estratégias de melhorias do nanoporo proteico da alfatoxina

Os nanoporos da alfatoxina podem ser modificados utilizando a técnica de mutagênese, na qual é introduzido, geneticamente, algum dos vinte aminoácidos naturais no poro proteico gerando uma variedade de cadeias laterais de diferentes tamanhos, formas, polaridade e reatividade química. Também pode ser realizadas mutagêneses introduzindo aminoácidos com configuração D não usualmente encontrados nos mamíferos superiores como na Figura 3S.<sup>5</sup>

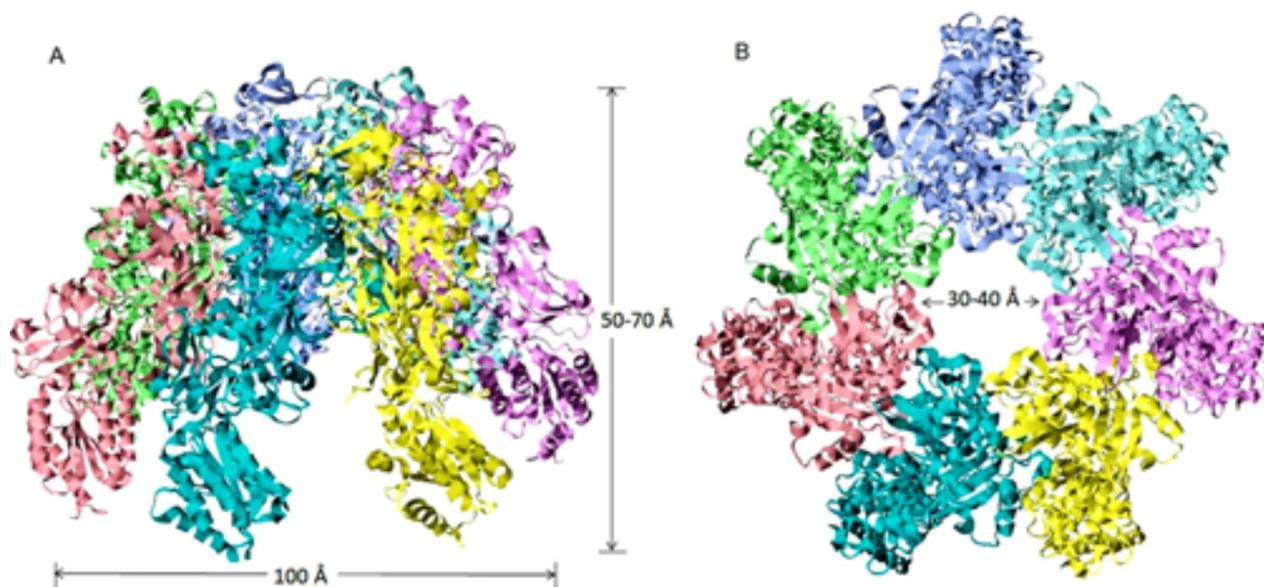
Outra forma de melhorar a detecção do nanoporo é a utilização de adaptadores moleculares como a  $\beta$ -ciclodextrina como visto na Figura 3S, que apesar de ser muito utilizada, não apresenta seletividade específica para moléculas pequenas por isso, para sua melhor utilização é necessário também à mutação do nanoporo proteico, o que torna essa interação (ciclodextrina-nanoporo)  $\sim 10^4$  vezes mais forte que com o nanoporo na sua forma selvagem.<sup>6,7</sup>

No trabalho de Zhao e colaboradores foi investigado a translocação de peptídeos aromáticos através do nanoporo proteico formado pela alfatoxina, como mostrado na Figura 4S. O nanoporo sofreu modificações aromáticas em suas paredes internas com o objetivo de aumentar a afinidade de ligação dos peptídeos com o nanoporo, aumentando assim a sensibilidade do nanoporo. Demonstrou-se a detecção de vários peptídeos incluindo aqueles que diferiam em apenas um aminoácido, além de oferecer uma técnica potencial para o sequenciamento de proteínas.<sup>8</sup>

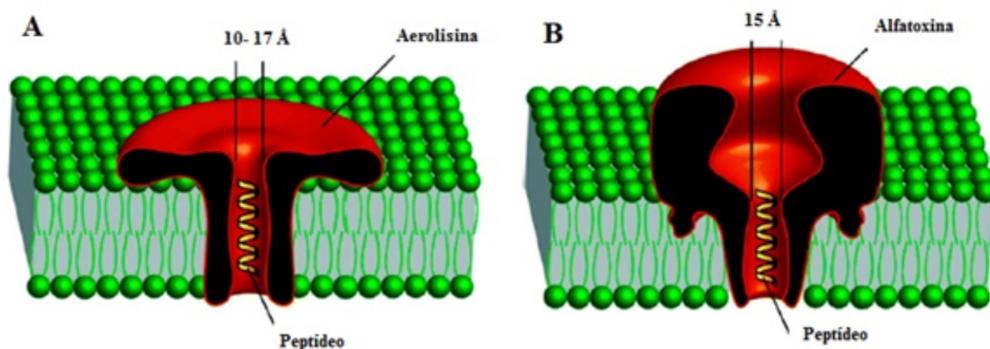
### Aplicações do nanoporo da alfatoxina

#### Monitoramento de microcistinas na água

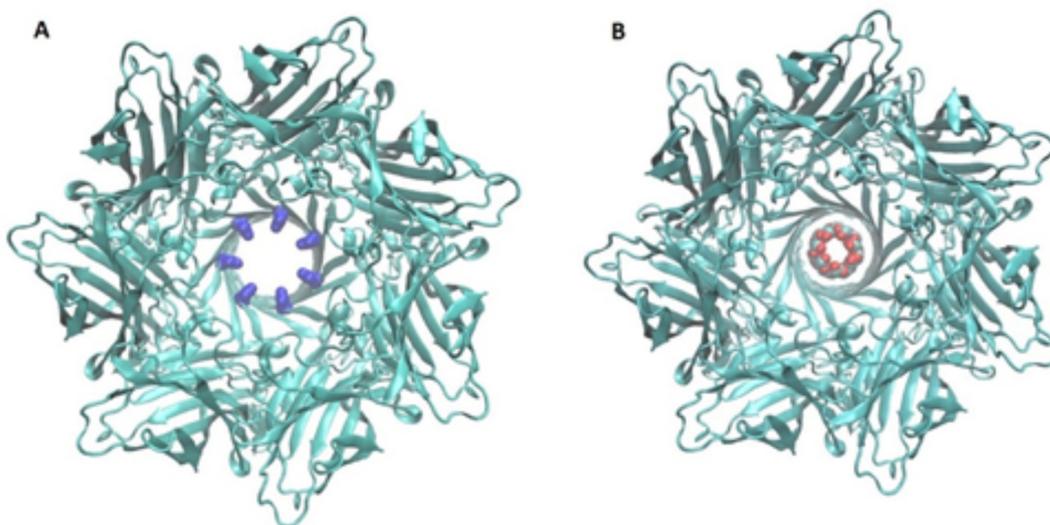
Os métodos atualmente disponíveis para detecção e caracterização de cianotoxinas na água, como cromatografia líquida de alta performance, ressonância magnética nuclear e a espectroscopia de massa, são muito trabalhosos para implementação do monitoramento



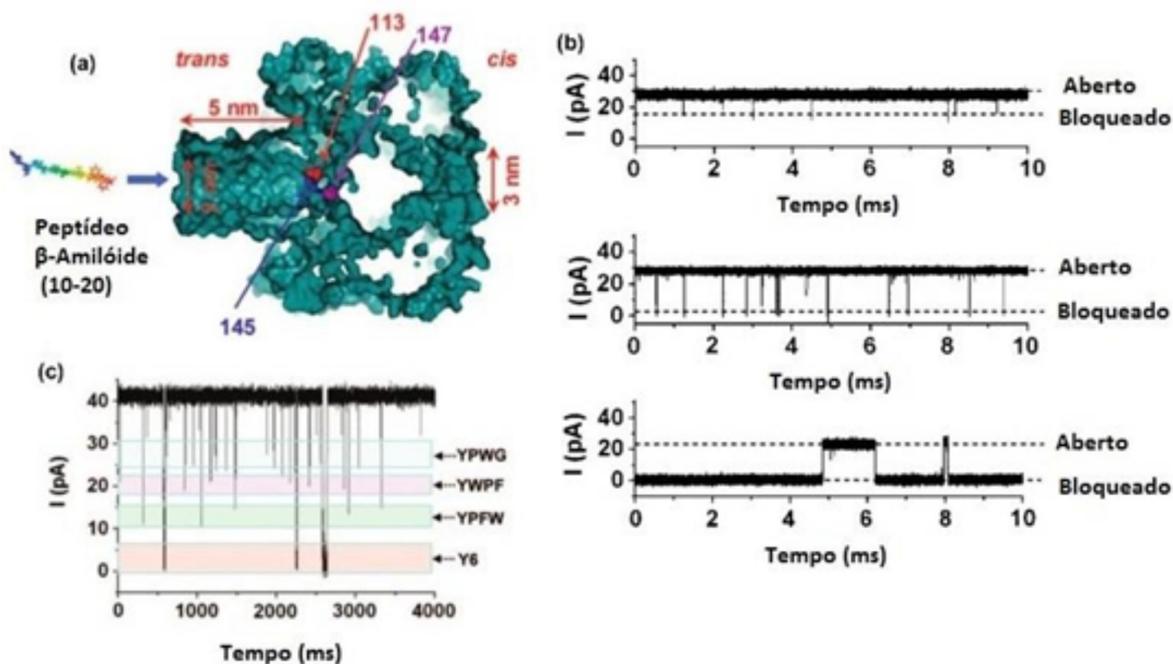
**Figura 1S.** Estrutura do nanoporo Antrax. O nanoporo formado pela toxina do *Bacillus anthracis* é formado por sete subunidades. Uma visão lateral é apresentada em A e uma visão do topo do nanoporo é mostrada em B. Retirado do Protein Data Bank (pdb), código 1TZN



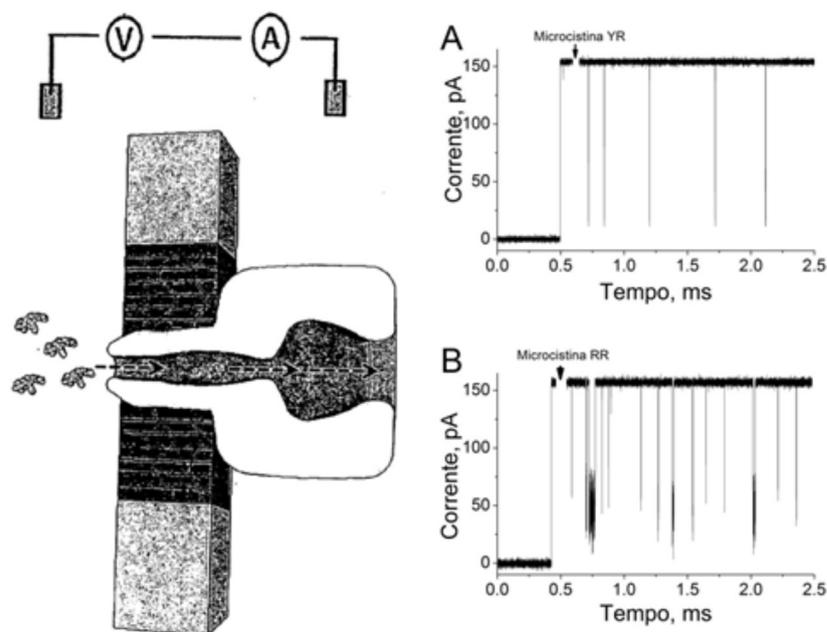
**Figura 2S.** Representação esquemática do nanoporo da aerolisina (A) e da alfatoxina (B) incorporados em bicamadas lipídicas planas. Ambos os nanoporos apresentam diâmetro que permite a translocação de peptídeos. Adaptado da Ref. 4



**Figura 3S.** Exemplos de nanoporos da alfatoxina adaptados: (A) poro geneticamente modificado. Os resíduos dos aminoácidos são inseridos próximo à região mais estreita do poro (resíduos em azul); (B) poro contendo uma β-ciclodextrina como adaptador molecular próximo à região de constricção



**Figura 4S.** (a) Representação molecular do nanoporo proteico da alfatoxina. As três posições de mutação (113, 145 e 147), utilizadas para detecção de peptídeos estão indicadas em vermelho, azul e roxo, respectivamente. Os nanoporos modificados receberam a denominação de (WT)7, (M113F)7, (2FN)7 de acordo com a localização da mutação (b) Registros típicos, bem como a corrente residual da interação do peptídeo Y6 com os três nanoporos (WT)7, (M113F)7, (2FN). E em (c) o perfil de bloqueios na corrente iônica através do nanoporo na presença simultânea de quatro peptídeos: Y6, YPFW, YWPF, e YPWG. Adaptado da Ref. 8



**Figura 5S.** Representação esquemática do nanoporo da alfatoxina incorporada em um suporte resistivo à esquerda. Representação dos registros de bloqueios na corrente iônica características da detecção de dois tipos de microcistinas (A) microcistina YR em (B) microcistina RR. Adaptado da Ref. 9

em tempo real de microcistinas. Na tentativa de melhorar a identificação dessas cianotoxinas, o método baseado no nanoporo proteico foi desenvolvido para detecção, quantificação e caracterização de microcistinas em meios aquosos como visto na Figura 5S. Ele é dotado de elevada sensibilidade, permitindo um monitoramento dessas moléculas em tempo real.<sup>9,10</sup>

## REFERÊNCIAS

- Lacy, D. B.; Wigelsworth, D. J.; Melnyk, R. A.; Harrison, S. C.; Collier, R. J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 13147.
- Parker, M. W.; Feil, S. C.; *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2005**, *88*, 91.
- Renner, S.; Bessonov, A.; Simmel, F. C.; *Appl. Phys. Lett.* **2011**, *98*, 83701.
- Nestorovich, E. M.; Bezrukov, S. M.; *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 6388.
- Mohammad, M. M.; Movileanu, L.; *Methods Mol. Biol.* **2012**, *870*, 21.
- Banerjee, A.; Mikhailovaa, E.; Cheley, S.; Gub, L. Q.; Montoyac, M.; Nagaokaa, Y.; Gouauxd, E.; Bayley, H.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 8165.
- Kawano, R.; Osaki, T.; Sesaki, H.; Takinoue, M.; Yoshizawa, S.; Takeuchi, S.; *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8474.
- Zhao, Q.; Jayawardhana, D. A.; Wang, D.; Guan, X. J.; *Phys. Chem.* **2009**, *113*, 3572.
- Rodrigues, C. G.; Chevtchenko, S. F.; Krasilnikov, O. L.; Machado, D. C.; Aguiar, J. A.; Silva, J. J.; *BR pat 000322 2012 (WO 2013/026123 A1)*.
- Silva, J. J. J.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 2011.