

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”

UNIGRANRIO

BEATRIZ DE BRITO LADEIRA

**EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E
FUNCIONAL DO MUTANTE C135S DO FATOR NEUROTROFICO DOPAMINA
CEREBRAL (CDNF)**

RIO DE JANEIRO

2025

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”
UNIGRANRIO

BEATRIZ DE BRITO LADEIRA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza
Herdy”, como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Dr^a Debora Foguel
Coorientador: M^e Antonio dos Santos Silva

RIO DE JANEIRO

2025

BEATRIZ DE BRITO LADEIRA

**EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E
FUNCIONAL DO MUTANTE C135S DO FATOR NEUROTROFICO DOPAMINA
CEREBRAL (CDNF)**

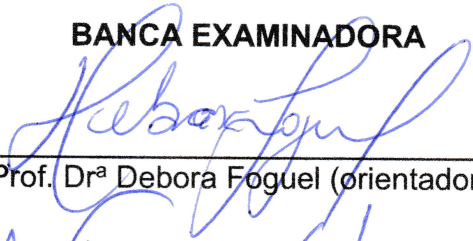
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Grande Rio "Prof. José de Souza
Herdy", como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Dr^a Debora Foguel
Coorientador: M^e Antonio dos Santos Silva

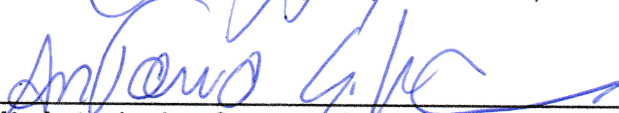
Aprovada em:

Duque de Caxias, 28 de novembro de 2025.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr^a Debora Foguel (orientadora)



M^e. Antonio dos Santos Silva (coorientador)

Documento assinado digitalmente

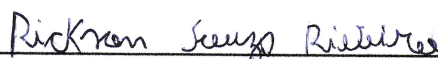


MONIQUE DE SOUZA ZEZZA RAMALHO

Data: 01/12/2025 12:31:04-0300

Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Monique de Souza Zezza Ramalho



M^e. Rickson Souza Ribeiro

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à minha família, que esteve comigo diante de toda a minha jornada da Universidade, me apoiando e me amparando em meus momentos de fraqueza, mesmo quando eu queria desistir, só consegui chegar até aqui por conta de vocês.

Agradeço à minha mãe Carla por me acolher nos meus momentos de choro, quando pensei que daria tudo errado. Ela não foi capaz de concluir seus estudos, mas eu estou aqui por conta dela, que não me deixou cair quando achei que ninguém estaria lá para mim.

Ao meu pai Alexandre por me apoiar em todas as minhas decisões, me levar para o caminho certo e me incentivar a seguir o meu caminho, sem ele nada disso teria sido possível.

Agradeço à minha vó Maria, que foi um ponto de conforto durante minhas dificuldades, sempre me aconselhando e me fazendo seguir meu caminho com a cabeça erguida, sem seu carinho e seus conselhos eu nunca teria sido capaz de chegar até aqui.

Aos meus amigos, que também foram meu apoio durante todo o caminho que segui dentro da faculdade, sem suas risadas, piadas e sem o afeto de vocês estes quatro anos teriam sido um pouco mais escuros para mim. Agradeço sempre por todos os surtos e os dias de estudo que me fizeram seguir em frente.

A todos os integrantes do Laboratório de Agregação de Proteínas e Amiloidoses, que foram durante três anos pessoas de luz no meu caminho, que me acolheram imensamente e me fizeram sentir pertencente àquele lugar, são pessoas que quero levar para a vida toda, não importa o caminho que será seguido.

À minha orientadora Dr^a Debora Foguel, pela infinita paciência que teve comigo durante toda minha participação da equipe do laboratório, obrigada por me permitir fazer parte de uma coisa tão importante como o desenvolvimento da ciência no Brasil, por conta de você, muitas mentes se sentem inspiradas a seguir este caminho.

Um agradecimento em especial para meu coorientador M^º Antonio da Silva Santos, que durante meus três anos de laboratório me ensinou tudo que eu sei sobre Bioquímica. Sem seu apoio nada disso teria sido possível, apesar de todos os tropeços diante do caminho.

E, por fim, gostaria de agradecer a Deus, por ter estado presente diante de todas as dificuldades, mesmo quando acreditei que não conseguiria sempre tive alguém olhando por mim, e me amparando nos momentos difíceis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo estrutural de MANF.....	12
Figura 2 – Estrutura da proteína CDNF, com seus domínios N-terminal e C-terminal definida por RMN.....	14
Figura 3 – Modelo da proteína CDNF com seu resíduo de retenção no RE e seu domínio CXXC	14
Figura 4 - Representação da sequência primária de aminoácidos do constructo de C135S.	25
Figura 5- Gel de poliacrilamida para verificação da expressão da proteína mutante	26
Figura 6 - 1ª Etapa da purificação do mutante C135S: cromatografia de afinidade.....	27
Figura 7- 3ª Etapa da purificação do CDNF-C: clivagem com TEV	28
Figura 8 - Análise da purificação de C135S por espectrometria de massas.....	28
Figura 9 - Caracterização da estrutura secundária de CDNF-C por dicroísmo circular.	29
Figura 10 - Fluorescência intrínseca de C135S	30
Figura 11 Fluorescência extrínseca de Bis-ANS	30
Figura 12 - Espectros de RMN 2D de C135S.	31
Figura 13 - Acompanhamento da desnaturação de C135S induzida por ureia por meio de BIS-ANS	32
Figura 14 - Acompanhamento da desnaturação de C135S induzida por ureia por dicroísmo circular	33
Figura 15 Desnaturação do CNDF-C induzida por ureia acompanhada por RMN	34
Figura 16 Ensaio de viabilidade celular de LDH de células H9C2.....	35
Figura 17 Ensaio de viabilidade celular de MTT de células N2a	36
Figura 18 Experimentos de viabilidade celular de LDH e MTT com C135S E CDNF-C.....	39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Fatores Neurotróficos.....	10
1.1.1. Fator Neurotrófico Derivado De Astrócitos Mesencefálicos (MANF) ...	11
1.1.2. Fator Neurotrófico Dopamina Cerebral (CDNF).....	12
1.2. Atividade Biológica de MANF/CDNF	14
1.2.1. Atividade de MANF/CDNF no estresse do RE.....	15
1.3. Estudos do domínio C-Terminal de Manf/CDNF	18
1.3.1. O papel da interação dissulfeto no domínio C-terminal	18
2. METODOLOGIA.....	19
2.1. Desenho da proteína.....	19
2.2. Transformação e expressão da proteína mutante C135.....	20
2.3. Expressão da amostra ¹⁵ N- C135S.....	21
2.4. Purificação do mutante C135S	21
2.5. Eletroforese SDS-PAGE	22
2.1.1. Eletroforese SDS-PAGE para expressão	22
2.1.2. Eletroforese SDS-PAGE para purificação.....	22
2.6. Espectroscopia de Fluorescência	23
2.6.1. Emissão de fluorescência intrínseca do resíduo de triptofano e de fluorescência extrínseca da sonda Bis-Ans.....	23
2.7. Dicroísmo Circular.....	23
2.8. Ressonância Magnética Nuclear	24
2.9. Ensaios de viabilidade celular.....	24
3. RESULTADOS	24
3.1. Expressão e purificação do mutante C135S	24
3.2. Caracterização estrutural do mutante C135S	28
3.3. Papel da ponte dissulfeto na estabilidade do mutante C135S diante da desnaturação por Uréia	31
3.4. Avaliação do funcionamento do mutante C135S por meio de experimentos de LDH e MTT	34
4. DISCUSSÃO	36
5. CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	41

EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DO MUTANTE C135S DO FATOR NEUOTRÓFICO DOPAMINA CEREBRAL (CDNF)

Beatriz de Brito Ladeira ¹

Antonio dos Santos Silva ²

Debora Foguel ³

RESUMO

Fatores Neurotróficos (FNs) são proteínas cruciais para o desenvolvimento e a manutenção de neurônios e de outras células. O CDFN é um FN não convencional, conhecido por seu papel na mitigação do estresse do retículo endoplasmático (RE), particularmente em neurônios dopaminérgicos que são danificados na doença de Parkinson (DP). O CDFN inteiro (CDFN-FL) é composto por 161 aminoácidos, organizados em 7 alfa-hélices e 4 pontes dissulfeto e apresenta dois domínios conectados por uma região flexível (linker). O domínio N-terminal (CDFN-N) inclui os primeiros 100 aminoácidos, com 5 alfa-hélices e 3 pontes dissulfeto. O domínio C-terminal (CDFN-C) contém os 57 aminoácidos restantes, com 2 alfa-hélices, uma hélice 3¹⁰ e uma única ponte dissulfeto. Ultimamente, nossos esforços demonstraram que CDFN-C é o domínio citoprotetor de CDFN. Eesmaa e colaboradores, usando a proteína inteira, demonstrou que a troca da cisteína, resíduo 135, por uma serina (FL-C135S), desfazendo a ponte dissulfeto, diminui significativamente seu potencial citoprotetor. Assim, esse trabalho teve por objetivo expressar, purificar e caracterizar estruturalmente (através de técnicas de fluorescência, dicroísmo circular e RMN) e funcionalmente (por meio de culturas de células modelo da DP) o papel da ponte dissulfeto do domínio CDFN-C isolado, utilizando o mutante CDFN-C /C135S.

Palavras-chave: Fatores neurotróficos, estrutura, ponte dissulfeto, citoproteção, estresse de retículo endoplasmático.

¹ Graduando(a) do curso de Biomedicina na Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO.

² Mestre em Química Biológica – UFRJ.

³ Doutora em Bioquímica - UFRJ.

ABSTRACT

Neurotrophic Factors (NFs) are essential proteins for the development and maintenance of neurons and other cells. CDNF is an unconventional NF, known for its role in mitigating the endoplasmic reticulum (ER) stress, particularly in dopaminergic neurons that are damaged in Parkinson's' Disease (PD). Full-length CDNF (CDNF-FL) consists of 161 amino acids, organized into 7 alpha-helix and 4 disulfide bonds and it presents two domains connected by a flexible region (linker). The N-terminal domain (CDNF-N) includes the first 100 amino acids, with 5 alpha-helix and 3 disulfide bonds. The C-terminal domain (CDNF-C) contains the last 57 amino acids with 2 alpha-helices, a 3¹⁰ helix and a single disulfide bond. Lately our efforts showed that the CDNF-C domain is the cytoprotective domain of CDNF. Another group, using the full-length protein, demonstrated that replacing the cysteine at residue 135 with serine (FL-C135S) severing the disulfide bond reduces significantly its cytoprotective potential. Therefore, this work aims to express, purify and characterize structurally (using fluorescence techniques, circular dichroism and NMR) and functionally (through PD model cell cultures) the role of the disulfide bond of the isolated CDNF-C domain, using the CDNF-C/C135S mutant.

Keywords: Neurotrophic factors, structure, disulfide bond, cytoprotective, endoplasmic reticulum stress.

1. INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson (DP) é uma desordem caracterizada principalmente por seus sintomas motores como o tremor em repouso, rigidez muscular e lentidão nos movimentos (bradicinesia) que pode ter seu início, precocemente, a partir dos 30 anos de idade, até idades mais avançadas. No entanto, antes da presença dos sintomas motores, os pacientes podem apresentar, na maioria dos casos, distúrbios não motores como disfunção olfatória, constipação, problemas no sono e depressão ou ansiedade (Obeso *et al*, 2017). O aumento da expectativa de vida e aumento do envelhecimento populacional estão fazendo com que ocorra um aumento na ocorrência de doenças relacionadas à idade, incluindo a DP, que afeta 1% da população mundial acima de 60 anos (Lindholm; Saarma, 2021).

A principal causa apontada para o desenvolvimento da DP é a perda de neurônios dopaminérgicos localizados na substância *nigra*, que ocorre devido a presença de Corpos de Lewy, agregados proteicos formados majoritariamente pela proteína alfa-sinucleína, em regiões específicas do sistema nervoso central (Halliday *et al*, 2011). O acúmulo destes agregados no interior dos neurônios gera efeitos adversos, sendo um deles o estresse do retículo endoplasmático (RE) (Ghemrawi, Khair, 2020).

O RE é uma organela importante para a homeostase celular e é a responsável pela síntese, enovelamento, modificação e transporte de proteínas de membrana e proteínas secretoras (Oakes; Papa, 2015). O estresse do RE, desencadeado pelo acúmulo de proteínas mal enoveladas, ativa inicialmente a Resposta à Proteínas Mal Enoveladas (UPR, do inglês *Unfolded Protein Response*), que é um conjunto de mecanismos de defesa que agem inicialmente como uma resposta adaptativa para restaurar o equilíbrio do RE, porém quando a perturbação não é resolvida a UPR pode levar à morte celular por apoptose (Liu *et al.*, 2017).

Atualmente as terapias aplicadas para a DP são baseadas na reposição de dopamina utilizando levodopa (l-3,4- dihidroxifenilalanina) ou agonistas da dopamina (Lindholm; Saarma, 2010). O tratamento oral com levodopa é o tratamento mais eficaz contra os sintomas motores da DP, porém ele apresenta limitações, como seu baixo tempo de vida, fazendo com que o paciente necessite de no mínimo três doses ao dia, e a variação na biodisponibilidade do medicamento. Além disso, ao longo do tempo, o tratamento a longo prazo com e a perda progressiva de neurônios dopaminérgicos

podem levar a complicações como a flutuação entre sintomas motores e não motores em resposta a cada dose do medicamento, o que torna necessária a administração de maiores doses de levodopa ou a ingestão do medicamento em menores intervalos de acordo com a progressão da doença. (Teymourian *et al.*, 2022).

Neste momento, nenhuma das estratégias terapêuticas existentes para a DP podem inibir ou diminuir a degeneração de neurônios dopaminérgicos ou até mesmo induzir a recuperação destes neurônios. Nesse caso, encontrar novas terapias que atenuem o estresse do RE evitando a morte dos neurônios se torna importante. (Lindholm; Saarma, 2010).

1.1. Fatores Neurotróficos

Uma das alternativas terapêuticas estudadas na atualidade para sobrevivência dos neurônios dopaminérgicos é o uso de Fatores Neurotróficos (FNs), que são um grupo de proteínas secretoras que promovem a sobrevivência, o crescimento e a diferenciação de neurônios durante o desenvolvimento. Além disso, eles também possuem ação neuroprotetora, recuperando neurônios maduros lesionados promovendo reparo dos neurônios e regeneração axonal (Zhang *et al.*, 2018).

Os FNs afetam subpopulações neuronais específicas que são geneticamente competentes para responder aos estímulos, como por exemplo expressando receptores cognatos em suas superfícies, que, ao se ligarem aos FNs, desencadeiam cascatas de sinalização para a transcrição de proteínas neuroprotetoras (Lindholm; Saarma, 2010).

Existem três famílias tradicionais de FNs: a família das Neurotrofinas, descoberta inicialmente por Levi-Montalcini em 1949, que é composta por NGF, BDNF, neurotrofina-3 (NT-3) e NT-4; a família dos Ligantes das Células da Glia, identificada em 1993 que contém o fator neurotrófico derivado das células da glia (GNDF), a neurturina (NRTN), a artemina (ARTN) e a persefina (PSPN) e a família das citocinas, caracterizadas inicialmente como componentes da resposta imune em 1970 (Bauer; Kerr; Patterson, 2007), também conhecida por família da interleucina-6 (IL-6) possui a IL-6, o fator neurotrófico ciliar (CNTF) e a cardiotrofina-1 (CT-1). Existe também uma quarta família, recentemente descrita, composta por dois fatores neurotróficos: o fator neurotrófico dopamina cerebral (CDNF) e o fator neurotrófico derivado de astrócitos mesencefálicos (MANF), que apresentam estruturas diferentes dos demais FNs, definindo uma nova família de FNs (Lindholm; Saarma, 2010).

A família MANF/CDNF além de apresentar estrutura distinta das demais famílias de FNs, também apresentam um novo mecanismo de ação, pois os FNs desta família são residentes do RE e possuem um papel importante na manutenção da homeostase do RE, ajudando na diminuição da agregação de proteínas e diminuindo inflamação (Löhela; Saarma; Airavaara, 2024).

1.1.1. Fator Neurotrófico Derivado De Astrócitos Mesencefálicos (MANF)

O MANF é uma proteína que possui 158 aminoácidos em sua forma madura, que foi inicialmente descrita como uma variante da Proteína Humana Rica em Arginina (hARP) devido à sua semelhança com a sequência primária de hARP, porém foi observado que MANF possui similaridade a partir do resíduo 56 de hARP e que dos 55 resíduos ausentes de MANF, 22 deles eram argininas, uma das principais características de hARPs, o que descartou a possibilidade de MANF ser da família de hARPs. MANF foi inicialmente caracterizado como um fator neurotrófico em cultura de neurônios dopaminérgicos embrionários e foi inicialmente descrita como uma proteína que protege seletivamente neurônios dopaminérgicos. (Petrova et al., 2003)

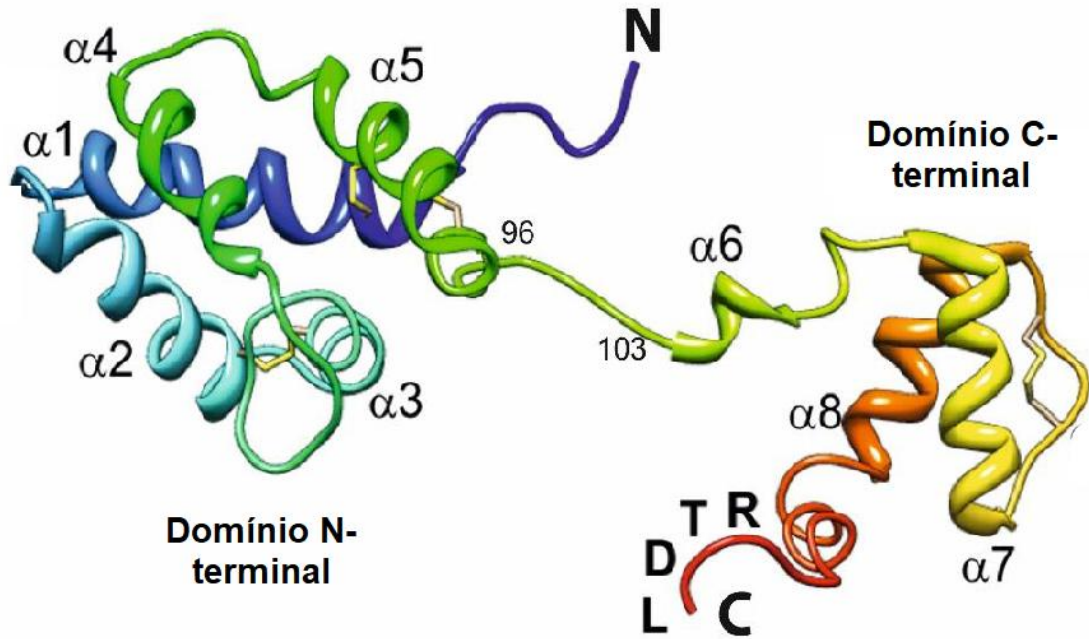
A primeira estrutura de MANF foi obtida em 2009 por cristalografia por raio-x, com resolução de 1,9 Å (Parkash V., *et al*, 2009). Em 2010, foi confirmada a estrutura desta proteína através de ressonância magnética nuclear (RMN) em 3D da proteína MANF (Hellman, M, *et al*. 2010). MANF é uma proteína composta por dois domínios, o domínio N-terminal (resíduos 1 – 95), com 5 α -hélices, uma hélice 3¹⁰ e 3 pontes dissulfeto, ligado ao seu domínio C-terminal (resíduos 104-158), que possui 3 α -hélices, uma ponte dissulfeto, e a região de retenção no RE ¹⁵⁴RTDL¹⁵⁸, por um *linker* flexível de 8 aminoácidos (resíduos 96 - 103) (**Figura 1**) (Lindhal et al, 2017).

MANF é expresso endogenamente em neurônios e em tecidos não neuronais, com altos níveis de expressão no córtex cerebral, no hipocampo e em células de Purkinje do cerebelo. Foi observado que ocorre o aumento da expressão de MANF em situações de isquemia e de estresse do retículo endoplasmático.

O MANF se localiza no lúmen do RE e é secretado por neurônios e outros tecidos não neuronais como pâncreas, ovários e estômago (Petrova, *et al*. 2003; Danilova, *et al*. 2019). Foi demonstrado que a deleção de MANF em ratos faz com que células beta pancreáticas produtoras de insulina desenvolvam estresse de RE severo, levando à diminuição da proliferação de células beta pancreáticas e a morte celular.

Demonstrando que MANF apresenta um papel na regulação/diminuição do estresse do RE. (Airavaara, M et al., 2010; Danilova, et al. 2019).

Figura 1 - Modelo estrutural de MANF.



A proteína divide-se em dois domínios ligados por um *linker* flexível. Em amarelo as pontes dissulfeto que estabilizam a proteína. Em destaque, sinal de retenção no RE composto pelos aminoácidos RTDL. (Adaptação de LINDHAL et al, 2017).

1.1.2. Fator Neurotrófico Dopamina Cerebral (CDNF)

O CDFN é uma proteína composta por 161 aminoácidos, em sua forma madura, que foi primeiramente identificada por meio da bioinformática e então caracterizado bioquimicamente (Lindholm, Saarna, 2010). CDFN é uma proteína paróloga específica de MANF em animais vertebrados, elas apresentam 59% de similaridade em suas sequências humanas (Lindholm *et al.*, 2007).

A expressão de RNA mensageiro (RNAm) de CDFN foi caracterizada por meio de RT-PCR em cérebros de ratos em desenvolvimento e em vários tecidos de ratos adultos. CDFN transcrito foi encontrado no cérebro em estágios embrionários e em neonatos, e também em regiões adultas do cérebro como o estriado e também foram observados altos níveis de RNAm em tecidos como o coração, músculos esqueléticos e os testículos de ratos. Foi demonstrado que CDFN é capaz de exercer efeitos protetores e restauradores em neurônios dopaminérgicos maduros em ratos de

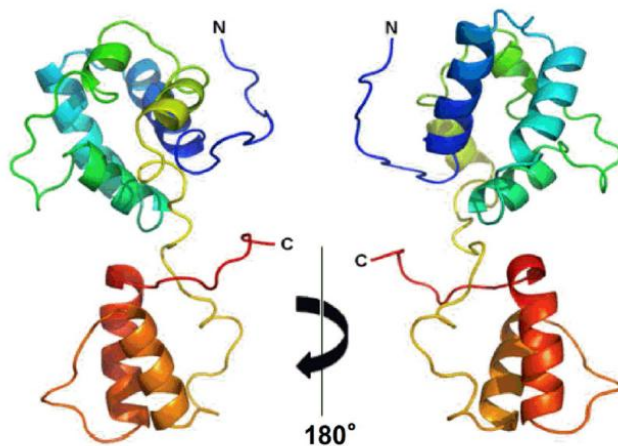
modelo de DP, induzidos por 6-Hidroxidopamina (6-OHDA), pela injeção da proteína anterior à injeção da neurotoxina. Também foi verificado que a injeção quatro semanas após a administração da droga previne a morte de neurônios da substância *nigra*, indicando que o CDNF apresenta potencial terapêutico para a DP (Lindholm *et al.*, 2007).

O CDNF foi inicialmente caracterizado estruturalmente por Parkash *et al.* 2009 através da técnica de cristalografia de raio-x, em que foi possível obter a estrutura do domínio N-terminal da proteína. Mais tarde, em 2015, Latgé, *et al.*, caracterizou estruturalmente por técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) a estrutura completa da proteína CDNF (**Figura 2**). Nesse trabalho do nosso grupo, observou-se que a proteína apresenta dois domínios bem enovelados ligados por um linker flexível. O domínio N-terminal é composto por 5 α -hélices (α 1: 13-29; α 2: 34- 48; α 3: 51- 59; α 4: 70- 80; α 5: 83- 94) e uma hélice 3^{10} (resíduos 96 a 103) e estabilizado pela presença de três pontes dissulfeto; e o domínio C- terminal que é composto pelos últimos 58 aminoácidos da proteína tendo em sua construção duas α -hélices (α 6: 121 a 128 e α 7: 137 a 152) estabilizadas por uma única ponte dissulfeto, presente no motivo CXXC (132 CRAC 135), que também aparece na porção C-terminal de MANF (**Figura 3**) (Parkash *et al.*, 2009; Latgé *et al.*, 2015).

O domínio N-terminal de MANF e CDNF é um domínio descrito como sendo do tipo saposina, que são proteínas ricas em cisteína que interagem com lipídeos e membranas plasmáticas e o domínio C- terminal é homólogo aos domínios SAP de diversas proteínas, como a proteína anti-apoptótica Ku70, que se liga à proteína pró-apoptótica BCL2 associada ao X (Bax), principal responsável pela ativação da apoptose em neurônios, inibindo sua ação, por meio do motivo 578 VPMLKE 583 . Ambas as proteínas MANF e CDNF apresentam motivos homólogos nos resíduos 113 VKELKK 118 e 118 VAELKQ 123 , respectivamente. (Hellman *et al.*, 2011; Mei, Niu, 2014; Latgé *et al.*, 2015).

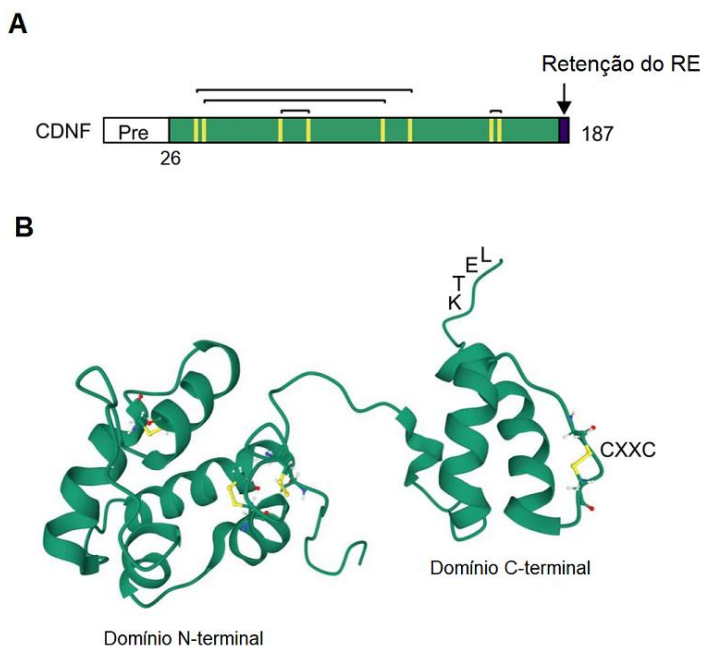
Foi demonstrado que na região C-terminal de MANF e CDNF é apresentada em seus últimos quatro aminoácidos uma sequência RTDL/KTEL, que se assemelha à sequência KDEL de retenção de sinal do RE (**Figura 3**), que possui alta afinidade por receptores KDEL (KDEL-R) (Henderson *et al.*, 2013; Latgé *et al.*, 2015) e é uma sequência que se apresenta em diversas proteínas residentes do RE, como a proteína regulada por glicose 78 (GRP78), a calreticulina e a proteína dissulfeto isomerase (PDI). (Maciel *et al.*, 2021; Oh-Hashi *et al.*, 2011; Huttunen, Saarma, 2019).

Figura 2 – Estrutura da proteína CDNF, com seus domínios N-terminal e C-terminal definida por RMN



O domínio N-terminal da proteína se apresenta em azul e o domínio C-terminal se apresenta em vermelho. Fonte: Latgé et al., 2015

Figura 3 – Modelo da proteína CDNF com seu resíduo de retenção no RE e seu domínio CXXC



Fonte: Adaptado de Lindholm.; Saarma. 2021

1.2. Atividade Biológica de MANF/CDNF

Como observado anteriormente, na região C-terminal de MANF e CDNF é apresentada uma sequência RTDL/KTEL, semelhante à KDEL, que possui alta

afinidade pelo KDEL-R (**Figura 3**). O KDEL-R está envolvido no resgate de proteínas do complexo de Golgi para o RE, evitando a secreção destas. A presença de degeneração das sequências do tipo KDEL em MANF e CDFN sugere que sua afinidade pelo KDEL-R é diminuída, aumentando a secreção destas proteínas. A deleção da sequência RTDL de MANF em neurônios mesencefálicos de ratos leva a sua secreção, constatando que estas proteínas são residentes do RE (Oh-Hashi *et al.*, 2011; Huttunen, Saarma, 2019).

Embora os mecanismos de ação de MANF e CDFN não sejam completamente compreendidos, o alívio do estresse do RE é descrito como uma de suas principais atividades e, diferente de outras proteínas envolvidas no estresse do RE, MANF e CDFN são secretados para o meio extracelular para exercerem suas funções. Estudos demonstram que a deleção de MANF e, potencialmente, de CDFN, desregula o funcionamento do RE, como no estudo realizado por Lindahl *et al* com ratos sem o gene de transcrição para MANF que apresentaram em seu desenvolvimento o aumento da ativação de genes e proteínas envolvidos na UPR em células da ilhota pancreática, implicando que o estresse do RE não resolvido foi a principal causa para a morte das células (Maciel *et al.*, 2021; Liu, Tang, Gong, 2015; Lindahl *et al.*, 2014).

1.2.1. Atividade de MANF/CDFN no estresse do RE

O RE é uma organela que possui diversos papéis em uma célula, como a síntese, transporte e enovelamento de proteínas, a síntese de carboidratos e esteroides, o metabolismo de carboidratos e o armazenamento de cálcio. (Schwarz; Blower, 2015). O RE é sensível a mudanças que afetam sua estrutura, integridade e função. O equilíbrio dos processos envolvidos na síntese proteica é chamado de proteostase do RE, quando este equilíbrio é perturbado ocorre um distúrbio no enovelamento das proteínas, levando ao estresse do RE que pode gerar dano celular (Arancibia *et al*, 2018; Uddin *et al.*, 2020; Ghemrawi, Khair, 2020).

Quando o enovelamento de uma proteína não é efetuado de maneira correta, gerando uma proteína mal enovelada(PME), esta PME é translocada para o citosol da célula e marcada para a degradação pelo proteassoma, conhecida como degradação associada ao RE (ERAD, do inglês *ER-associated degradation*). Na presença de PME em excesso na célula, o RE apresenta dificuldade em lidar com a quantidade excessiva de proteínas, fazendo com que ocorra o estresse do RE. Para lidar com

este estresse e minimizar o dano celular as células ativam a via de UPR, um conjunto de mecanismos adaptativos capazes de gerar redução do estresse do RE (Ghemrawi, Khair, 2020; Uddin *et al.*, 2020).

A via de UPR é controlada por três proteínas sensoras, a proteína quinase de retículo endoplasmático quinase semelhante a RNA (PERK, do inglês *protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*), a enzima que requer inositol (IRE1, do inglês *inositol-requiring enzyme*) e o fator de transcrição de ativação 6 (ATF6, do inglês *activating transcription factor 6*). Essas proteínas estão localizadas na membrana do RE e são constituídas por um domínio voltado para o citosol, uma região transmembrana e outro domínio voltado para o lúmen do RE. Em condições normais estas proteínas se encontram associadas a GRP78 (78-kDa glucose regulated protein), também chamada de BiP (immunoglobulin heavy chain-binding protein). Porém em condições de estresse as PMEs limitam a interação GRP78/ BiP com os sensores, se ligando a elas e fazendo com que se desliguem das proteínas sensoras iniciando a via de sinalização de UPR (Ghemrawi, Khair, 2020; Chen, Brandizzi, 2013; Uddin *et al.*, 2020).

A via de sinalização de PERK apresenta um papel fundamental na indução da apoptose da célula. PERK é uma proteína transmembrana do RE de tipo I, contendo um domínio quinase serina/treonina voltado para o citoplasma da célula. A ativação de PERK, após sua autofosforilação e dimerização, induz a fosforilação da subunidade α do fator de iniciação de transcrição eucariótica (eIF2 α). A fosforilação de eIF2 α reduz a síntese de proteínas e promove a tradução do fator de transcrição de ativação 4 (ATF4). ATF4 aumenta a expressão de genes relacionados à apoptose, incluindo o fator pró-apoptótico CHOP. Células que não apresentam ativação ou expressão de PERK, ATF4 ou eIF2 α , não apresentam capacidade de induzir CHOP durante o estresse do retículo (Ghemrawi, Khair, 2020).

IRE1 também é uma proteína transmembrana do RE de tipo I que possui quinase serina/treonina, e também atividades de endonuclease. O genoma de mamíferos codifica duas isoformas de IRE1: IRE1 α e IRE1 β , sendo a maioria dos estudos sobre UPR conduzidos utilizando IRE1 α . O acúmulo de PMEs no RE estimula a dimerização e autofosforilação de IRE1, ativando a atividade de endoribonuclease permitindo a clivagem de uma sequência de 26 nucleotídeos, denominada *splicing*, do RNA mensageiro (RNAm) da proteína 1 de ligação à X-box (Xbp1, do inglês *Xbox-binding protein-1*), formando um fator de transcrição ativo denominado XBP1s (XBP1

spliced), que é translocado para o núcleo da célula onde se liga ao seu alvo nas regiões que regulam os genes de chaperonas induzindo sua transcrição. Em situações de estresse prolongado, IRE promove a morte da célula pela ativação da quinase de sinalização apoptótica 1 (ASK1, do inglês *apoptotic-signaling kinase-1*), seguida da ativação de seguida da ativação de quinases negativamente reguladas: quinase N-terminal Jun-c (JNK, do inglês *Jun-N-terminal kinase*) e a proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p38 MAPK, do inglês *p38 mitogen-activated protein kinase*), levando à apoptose. Além disso a atividade de Rnase de IRE1 está envolvida no decaimento regulado dependente de IRE1 (RIDD, do inglês *regulated IRE1 dependent decay*) conhecido por degradar seletivamente RNAm associados ao RE que codificam proteínas secretoras ou de membrana, com o objetivo de aliviar a carga de proteínas do RE (Yoshida *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003; Ghemrawi, Khair, 2020; Chen, Brandizzi, 2013).

Por fim, a ATF6, que também é um mediador transmembrana de UPR, é uma proteína transmembrana do RE de tipo II. Também possui duas isoformas: ATF6 α e ATF6 β . ATF6 α apresenta uma maior atividade transcricional se comparada a ATF6 β . Em situações de estresse do RE ATF6 é translocada para o complexo de Golgi onde é clivada pela serina protease local 1 (S1P) e pela metaloprotease local 2 (S2P). ATF6 ativa é transferida para o núcleo onde se liga a promotores para induzir a transcrição de genes envolvidos na UPR, como XBP1 e CHOP e também no aumenta a expressão da chaperona do RE BiP, que é a principal responsável pela ativação da UPR (Wu *et al.*, 2007; Ghemrawi, Khair, 2020).

O principal fator apontado como responsável pela ativação da via de UPR é o desligamento de BiP das proteínas transmembrana do RE, e foi demonstrado que o domínio C-terminal da proteína MANF interage com BiP/ GRP78 quando ligada à adenosina difosfato (ADP), o que faz com que a cascata de sinalização de UPR iniciada pela dissociação de BiP não seja ativada (Yan *et al.*, 2019). Recentemente foi demonstrado que o domínio C-terminal de CDNF também apresenta interação com BiP/GRP78, indicando que esta possa ser uma das ações de CDNF na regulação da UPR (Eesmaa *et al.* 2022).

1.3. Estudos do domínio C-Terminal de MANF/CDNF

A fim de estudar a função do domínio C-terminal de MANF (MANF-C) no estresse de RE, foi visto que, em células do tipo HEK293 e em cultura de células do gânglio cervical superior (SCG) com estresse causado por taspigargina e tunicamicina, respectivamente, MANF-C regula o estresse interagindo diretamente com o receptor IRE1 α através dos resíduos K96, K128, C130, R155. Esta interação impede a hiperoligomerização e autofosforilação de IRE1 α , o que impede a ativação da cascata de sinalização que leva à morte celular por apoptose, reduzindo a morte induzida por estresse do RE. (Kovaleva, *et al.* 2023).

Foi demonstrado também que o uso do domínio C-terminal de MANF isolado apresenta efeito protetor em neurônios do gânglio cervical superior, semelhante à proteína inteira, atribuindo a função citoprotetora a esse domínio (Hellman *et al.* 2011). Em um estudo sobre o auxílio do CDNF na neuritogênese de células do gânglio da raiz dorsal foi visto que o uso do indutor clássico de neuritogênese, o Fator de Crescimento Nervoso (NGF), estimula o alongamento de neuritos em cultura de células de raiz do gânglio dorsal dissociadas, obtendo neuritos longos de aproximadamente 450 μ m. De maneira semelhante ao uso de NGF, a adição CDNF na cultura de células fez com que elas também desenvolvessem neuritos longos atingindo o tamanho de aproximadamente 390 μ m. No entanto a utilização de CDNF- Δ KTEL, um construto sem a presença da sequência KTEL no C terminal, não foi observado o mesmo crescimento destes neuritos, chegando a comprimentos de menos 200 μ m. De maneira semelhante, também foi observada que a presença de NGF e CDNF na cultura de células resulta em maior sobrevivência celular, o que não acontece quando há presença de CDNF- Δ KTEL, indicando que, pela presença da sequência KTEL, a porção C de CDNF é a porção funcional da proteína (SANTOS *et al.*, 2025). Ainda não é completamente demonstrado que o mesmo ocorre com o domínio C-terminal isolado de CDNF (CDNF-C), porém já existem pesquisas em andamento sobre a atividade de CDNF-C.

1.3.1. O papel da interação dissulfeto no domínio C-terminal

Estudos tem buscado entender o papel do motivo CXXC presente na porção C-terminal de MANF e CDNF. É um domínio comum em proteínas oxirredutoras, o que pode indicar ação de oxirredução das proteínas, porém esta ação ainda não foi

observada para as proteínas. Porém já foi observado que uma mutação neste motivo em MANF elimina completamente seu efeito protetor, demonstrando que é essencial para o funcionamento de MANF (Mätlik *et al.*, 2015).

Recentemente foi visto que a mutação deste motivo na proteína CDFN, substituindo o resíduo de cisteína 135 por uma serina ($^{131}\text{CRAC}^{135}$), gerando a sequência $^{131}\text{CRAS}^{135}$, diminuiu, não completamente, os efeitos antiapoptóticos de CDFN no estresse do RE em células do gânglio cervical superior estressadas com tunicamicina. O proposto é que a importância do motivo CXXC na atividade neuroprotetora vem do seu possível papel em estabilizar a estrutura de CDFN em uma forma favorável à sua ação antiapoptótica. (Eesmaa *et al.* 2022).

Considerando que a ponte dissulfeto pode apresentar um papel importante na estrutura e no funcionamento da proteína CDFN-C este trabalho tem como objetivo expressar e purificar a proteína mutante C135S, estabelecendo um novo protocolo de expressão e purificação, caracterizar estruturalmente a proteína e avaliar a estabilidade estrutural diante da presença de agentes caotrópicos utilizando as técnicas de Fluorescência, Dicroísmo Circular e Ressonância Magnética e avaliar as o papel da interação dissulfeto na atividade citoprotetora desta proteína.

2. METODOLOGIA

2.1. Desenho da proteína

Para a realização dos experimentos de purificação empregados nesse trabalho foi necessário o remodelamento do domínio C135S, uma vez que em pH 7,0 a proteína apresenta carga neutra, o que prejudica a purificação da proteína por afinidade. Então para facilitar sua purificação por afinidade, foram adicionadas seis histidinas no início da proteína. Além disso, foi incluído na região N-terminal o segmento B1 da proteína G de *Streptococcus* (GB1), uma sequência reconhecida por fatores de transcrição da célula e amplamente conhecida por aumentar a expressão de proteínas ligadas a ela, uma vez que GB1 é extremamente hidrossolúvel e capaz de solubilizar proteínas associadas a ela.

Além disso, para a separação as histidinas e a porção GB1, foi adicionada uma sequência de clivagem reconhecida pela protease do *Tobacco Etch Virus* (TEV), o que permite a recuperação do mutante C135S sem outros segmentos.

2.2. Transformação e expressão da proteína mutante C135

A expressão da proteína mutante C135S foi feita por meio do plasmídeo pET-25b contendo o gene que codifica a proteína e é resistente ao antibiótico ampicilina, sintetizado pela Genscript Inc. (Piscataway, NJ - EUA). Para a transformação do plasmídeo, foi utilizada a estratégia de choque térmico em células bacterianas *Escherichia coli* da linhagem Rosetta Gami B (DE3) (Stratagene - Piscataway, NJ - EUA), que foram então plaqueadas e incubadas a 37°C entre 12 e 16 horas. Após a transformação estas células bacterianas foram transferidas para erlenmeyers pequenos de 150 mL contendo 25 mL de meio *Luria Broth* (LB) (20 g/L) para serem cultivadas overnight a 37°C sob agitação de 150 rpm na presença de ampicilina 100 µg /mL e cloranfenicol 34 µg /mL. Após o crescimento no meio essas células foram passadas para erlenmeyers de 2L contendo 800 mL de meio LB na presença dos antibióticos utilizados anteriormente e colocadas novamente sob agitação à 150 rpm a 37°C observando a densidade óptica (DO) a 600 nm em um espectrofotômetro até que seja alcançada a DO 0,6.

Quando atingida a DO, é coletada uma alíquota de 1mL e a expressão é induzida com a adição de 0.5M de IPTG em 800 mL de meio. Novas alíquotas são coletadas a cada 1 hora durante 4 horas de expressão, a fim de verificar posteriormente, em uma eletroforese feita em gel de poliacrilamida, a expressão da proteína mutante. Após o fim da expressão, o conteúdo dos erlenmeyers é transferido para tubos grandes que são centrifugados em uma rotação de 8030 rpm por 15 minutos. São recolhidos 30 mL de meio para ressuspender o *pellet* bacteriano formado, e o sobrenadante é descartado. Depois de ressuspendidas, as bactérias são novamente centrifugadas em tubos falcon de 50 mL em uma rotação de 9000 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante é descartado e o pellet formado é congelado a -20°C para posterior purificação.

2.3. Expressão da amostra ^{15}N - C135S

A metodologia utilizada para a expressão da proteína C135S marcada seguiu o protocolo descrito acima substituindo o meio rico de cultura LB pelo meio mínimo de cultura M9.

A expressão da proteína C35S marcada com ^{15}N foi obtida através do cultivo das células em meio mínimo de cultura M9 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , NaCl , NH_4Cl , MgSO_4 , glicose, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, tiamina, enriquecida com YNB) contendo $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Cambridge Isotope) como a única fonte de nitrogênio.

2.4. Purificação do mutante C135S

Para o início da purificação o pellet previamente obtido na etapa de expressão foi ressuspendido em 30 mL de tampão de lise (NaCl 150mM, NaN_3 5mM, Imidazol 20mM, pH 7,0) juntamente com um tablete de inibidor de protease (Complete, EDTA-free Tabs - Roche).

Após este processo essa solução é movida para um banho de gelo e passará pelo processo de sonicação com ciclos de 5 segundos ligado e 5 segundos desligado por uma hora (Sonicador Misonix (MicrosonTM) para promover a lise celular. Após a sonicação, essa solução é centrifugada a 16000 RPM, a 4°C por 15 min para a remoção dos detritos celulares. O sobrenadante é recuperado e filtrado em uma membrana de 0,22 μm .

Este sobrenadante contendo as proteínas solúveis passa por um processo de cromatografia por afinidade em uma coluna HisTrap SP de 5mL previamente equilibrada com a solução A (NaCl 150mM, NaN_3 5mM, pH 7,0). A proteína foi eluída com gradiente linear utilizando tampão B (NaCl 150mM, NaN_3 5mM, Imidazol 500mM, pH 7,0). A presença da proteína foi verificada por SDS-Page e as frações contendo a proteína purificada foram submetidas a clivagem com a enzima TEV, na concentração 1:20, por 48h em temperatura ambiente. A clivagem é confirmada por SDS-Page, após a confirmação a amostra passará por uma nova cromatografia por afinidade em uma coluna HisTrap SP de 5mL previamente equilibrada com solução A para a separação das porções com C135S e HGB1. A porção HGB1 fica ligada a coluna e o *flowthrough* contendo o C135S foi coletado.

A amostra foi concentrada por ultrafiltração em sistema Vivaspín com membrana de exclusão de 3 kDa. A concentração das amostras de C135S foi estimada através da medida da absorbância a 280nm.

2.5. Eletroforese SDS-PAGE

2.5.1. Eletroforese SDS-PAGE para expressão

As proteínas foram separadas segundo seu tamanho molecular por meio de um gel de separação de poliacrilamida 15% contendo acrilamida 30%; Tris-HCl 1,5 M. pH 8,8; SDS 10%; persulfato de amônio (PSA) 10%; TEMED 10%; e água destilada. Após a polimerização do gel de separação, foi realizado e inserido o gel stacking contendo Tris-HCl 0,5 M, Ph 6,8; água destilada; acrilamida 30%; SDS 10%; PSA 10% e TEMED 10%.

As amostras foram colocadas em tampão de amostra (Tris-HCl 40 mM, pH 6,8; glicerol 8 %; SDS 10%; DTT 100 mM; azul de bromofenol 0,1%), e fervidas a 100 °C durante 5 minutos e então aplicadas no gel. O gel foi submetido a uma voltagem de 150 V em tampão de corrida (Tris-Cl 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1 %; água MilliQ, pH 8,3).

2.5.2. Eletroforese SDS-PAGE para purificação

As proteínas foram separadas segundo seu tamanho molecular. Através de um gel de separação de poliacrilamida 18% contendo acrilamida 30%; Tris-HCl 1,5 M. pH 8,8; SDS 10%; persulfato de amônio (PSA) 10%; TEMED 10%; e água destilada. Após a polimerização do gel de separação, foi realizado e inserido o gel stacking contendo Tris-HCl 0,5 M, Ph 6,8; água destilada; acrilamida 30%; SDS 10%; PSA 10% e TEMED 10%.

O procedimento para a corrida do gel seguiu o protocolo descrito anteriormente

2.6. Espectroscopia de Fluorescência

2.6.1. Emissão de fluorescência intrínseca do resíduo de triptofano e de fluorescência extrínseca da sonda Bis-Ans

Para a caracterização estrutural da proteína foram realizadas as medidas da fluorescência intrínseca do mutante C135S da proteína CDNF-C utilizando o resíduo de triptofano (128W) presente em sua estrutura, e da fluorescência extrínseca utilizando a sonda Bis-ANS, uma sonda extrínseca que se liga a cavidades hidrofóbicas de proteínas em estados de enovelamento intermediários conhecidos como “molten globule”, usando uma concentração de 15 μ M da proteína e avaliando seu centro de massa.

O método de espectroscopia de fluorescência também pode ser utilizado para a avaliação das mudanças na estrutura de proteínas quando expostas a agentes químicos e físicos.

Assim, foram realizados experimentos de resistência química por ureia, monitorando a ligação da proteína à Bis-ANS. A proteína foi previamente incubada com concentrações diferentes de ureia (0 a 8M) por 18h.

As medidas de fluorescência intrínseca do triptofano foram realizadas a partir da excitação a 280 nm e o monitoramento da emissão de 300 nm a 420 nm, enquanto, para o Bis-ANS, a medida da fluorescência foi realizada a partir da excitação em 385 nm e o monitoramento da emissão de fluorescência de 435 nm a 580 nm.

Os experimentos foram executados usando o espectrofluorímetro ISS PC (ISS Inc, Champaign, IL).

2.7. Dicroísmo Circular

O dicroísmo circular foi realizado no equipamento Jasco J1500 para a avaliação da estrutura secundária do mutante C135S, bem como para a avaliação da estabilidade de sua estrutura secundária diante do estresse químico por ureia. As amostras foram acondicionadas em cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho óptico. Cada medida é o resultado da média de quatro aquisições individuais com resolução de 0.2 nm e velocidade de aquisição de 50 nm/min.

A faixa de varredura espectral foi de 260 nm a 200 nm, acompanhando as estruturas em hélice α , que apresentam dois picos negativos em 208 e 222 nm. As

amostras de C135S foram diluídas em tampão A (MES 25 mM, pH 6,0) para uma concentração final de 100 μ M.

2.8. Ressonância Magnética Nuclear

Os experimentos de RMN foram realizados no espectrômetro Bruker 800 MHz Avance III equipado com sonda de tripla ressonância.

A amostra de C135S marcada uniformemente com ^{15}N foi expressa e purificada conforme o protocolo descrito anteriormente. O experimento de RMN irá investigar o processo de desnaturação de C135S na presença de ureia. Os espectros de ^1H - ^{15}N -HSQC foram obtidos utilizando a proteína marcada solubilizada em tampão MES (MES 25 mM, pH 6,0), Água deuterada (D_2O) 10% e Trimetilsililpropanossulfonato de sódio (DSS) 0,1%, na concentração final de 100 μ M com concentrações crescentes de ureia. Para cada condição, espectros heteronucleares de ^1H - ^{15}N -HSQC foram coletados com 1.024 pontos para a dimensão ^1H e 104 pontos para a dimensão ^{15}N usando 32 leituras. As perturbações no deslocamento químico e as intensidades de cada pico foram analisadas comparando o sinal de cada concentração de ureia com o sinal inicialmente atribuído a leitura de ^1H - ^{15}N -HSQC.

2.9. Ensaios de viabilidade celular

Células dos tipos H9c2 (cardiomiócitos) e N2a (neurônios) foram cultivadas em uma quantidade de 2×10^4 células por poço em uma placa de 96 poços e incubadas a 37°C por 24 horas antes de receberem o tratamento. Após a incubação as células foram tratadas com C135S e incubadas novamente com o tratamento por mais 1 hora a 37°C. Ao final do tempo de tratamento as células H9C2 foram estressadas com taspigargina e as células N2A foram estressadas com 6-OHDA por 20 horas. Após o fim do procedimento a viabilidade celular foi medida utilizando os ensaios de LDH (Promega G#1781) e MTT (Sinapse K#017), seguindo as instruções dos fabricantes.

3. RESULTADOS

3.1. Expressão e purificação do mutante C135S

A expressão e purificação do mutante C135S da proteína CDNF seguiu o protocolo originalmente utilizado no artigo de Latge *et al*, porém, como a proteína mutante possui uma cisteína livre, a fim de evitar a formação de dímeros por interação

cisteína-cisteína, foi adicionado o agente redutor ditioneitol (DTT), que é conhecido por reduzir pontes dissulfeto em proteínas, durante o processo de purificação da proteína (GOKUL G; SINGH, 2022; LATGE et al., 2015). Sendo assim, foi solicitada à Genescript Inc. (Pitascaway, NJ, USA), a produção do plasmídeo pET-25b com a sequência de DNA para codificação da proteína com inserção entre os sítios NdeI e Xho. Contudo, como o domínio C135S em pH 7,0 apresenta carga neutra, foram adicionadas seis histidinas para facilitar sua purificação por afinidade. Além disso, foi incluído na região N-terminal o segmento B1 da proteína G de *Streptococcus* (GB1), sequência reconhecida por fatores de transcrição da célula e amplamente conhecida por aumentar a expressão de proteínas fusionadas a ela, uma vez que GB1 é extremamente hidrossolúvel e capaz de solubilizar proteínas a ela ligada.

Para a separação das histidinas e do segmento GB1, foi adicionada uma sequência de clivagem reconhecida pela protease do *Tobacco Etch Virus* (TEV), o que permite a recuperação do mutante C135S sem outros segmentos. A **Figura 4** demonstra a sequência que utilizada para a obtenção da proteína C135S pura.

Figura 4 - Representação da sequência primária de aminoácidos do constructo de C135S.

```

      10      20      30      40      50      60
MSHHHHHHSS GTYKLILNGK TLKGETTTEA VDAATAEKVF KQYANDNGVD GEWTYDDATK

      70      80      90      100     110     120
TFTVTEGSGE NLYFQSKYEK TLDLASVDLR KMRVAELKQI LHSWGEECRA SAEKTDYVNL

      130
IQELAPKYAA THPKTEL

```

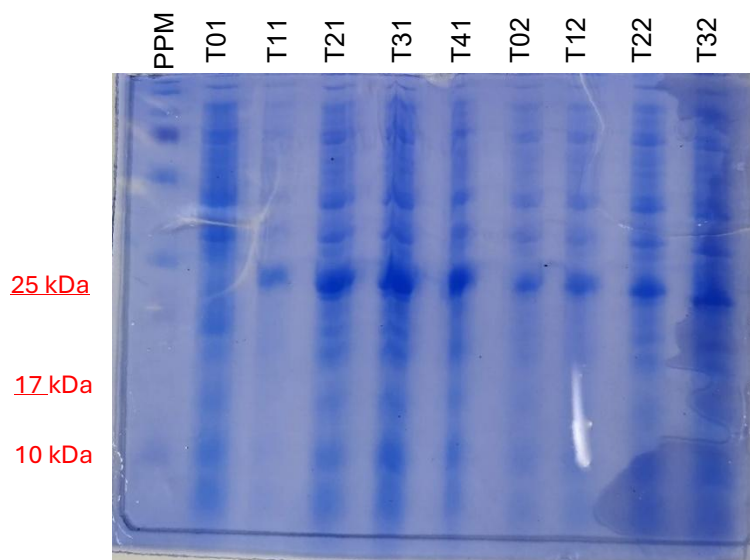
Em preto, a cauda de histidina; em amarelo, a sequência correspondente a GB1; em verde, a sequência de clivagem por TEV; em vermelho, *linker* flexível do mutante C135S que conecta do N domínio ao C domínio; em azul, a sequência correspondente ao mutante C135S de nosso interesse; em rosa a serina que substitui a cisteína da proteína C135S. (Fonte: própria).

O plasmídeo contendo a sequência para expressão do mutante C135S foi transformado em células da bactéria *E. coli* de linhagem Rosetta Gami B (DE3). Após a transformação estas células foram cultivadas em 150mL de meio LB overnight a 37°C sob agitação de 150 rpm na presença de ampicilina 100 µg /mL e cloranfenicol 34 µg /mL, e depois do crescimento destas células elas foram transferidas para 800 mL de meio LB na presença dos antibióticos utilizados anteriormente e colocadas novamente sob agitação à 150 rpm a 37°C observando a densidade óptica (DO) a 600

nm em um espectrofotômetro até que seja alcançada a DO 0,6 para indução da expressão da proteína pela adição de 0.5M de IPTG no meio.

Na **Figura 5** é possível verificar, pela utilização da técnica de eletroforese SDS-PAGE, que houve expressão da proteína mutante.

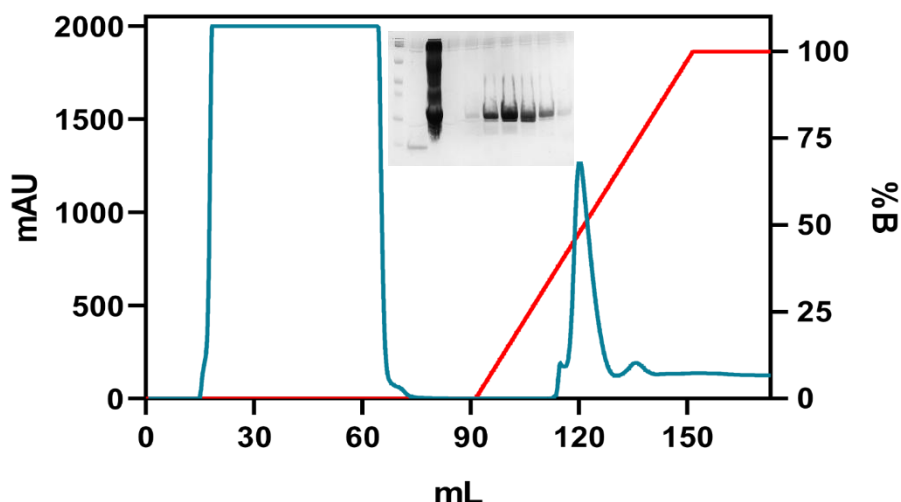
Figura 5- Gel de poliacrilamida para verificação da expressão da proteína mutante



Gel de poliacrilamida contendo as alíquotas coletadas no T0, T1, T2, T3 e T4 da expressão, demonstrando que houve expressão da proteína mutante que é marcada aproximadamente no valor de 25Kd

Para a purificação da proteína, as células foram ressuspensas em 25mL de tampão de lise (NaCl 150 mM, DTT 2,5 mM, NaN₃ 5 mM, imidazol 20 mM, pH 7,0) juntamente com um tablete de inibidor de protease (Complete, EDTA-free Tabs - Roche), lisadas com ajuda de um sonicador, centrifugadas e o sobrenadante, filtrado utilizando um filtro de 0,22 µm, foi aplicado na coluna de cromatografia por afinidade com resina de níquel de 5mL previamente equilibrada com tampão A (NaCl 150 mM, NaN₃ 5 mM, DTT 2,5 mM; pH 7,0). A proteína foi eluída com gradiente de imidazol de 0 – 0,5M, conforme visto na **Figura 6**, que mostra que a proteína é eluída em torno de 50% de tampão B (NaCl 150 mM, NaN₃ 5 mM, Imidazol 500 mM, DTT 2,5 mM; pH 7,0).

Figura 6 - 1ª Etapa da purificação do mutante C135S: cromatografia de afinidade

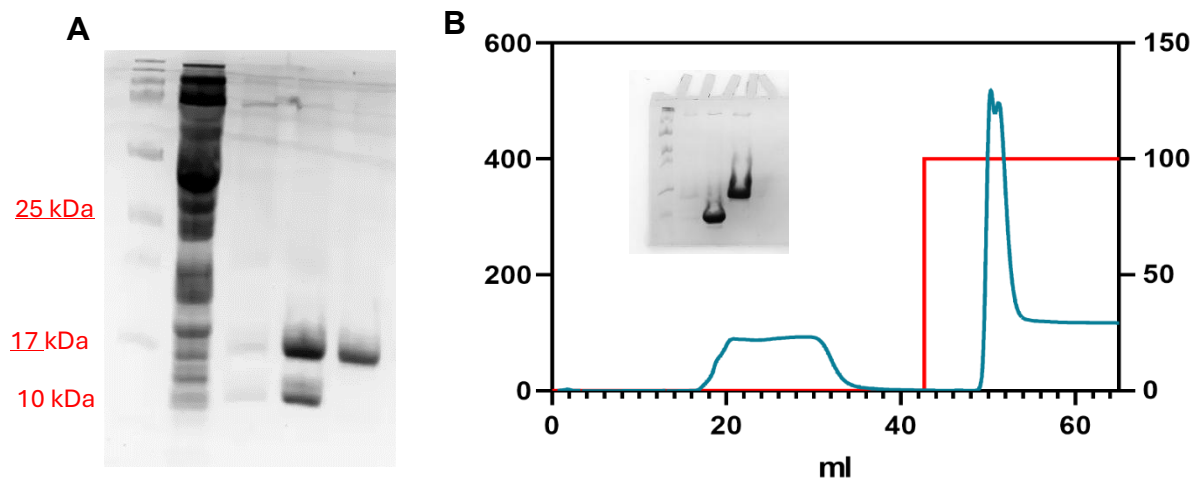


A proteína C135S foi purificada a partir do sobrenadante filtrado da cultura de *E. coli* por cromatografia de afinidade. A coluna foi equilibrada em tampão A, e o C135S eluído em um gradiente de 0 – 0,5 M de imidazol (Tampão B). O inserto apresenta um gel de eletroforese SDS-PAGE correspondente ao pico majoritário que aparece na eluição, onde a coluna 1 do gel é o padrão de peso molecular; a coluna 3 representa a parcela da amostra que não interage com a coluna; e as colunas 4-10 representam as frações de eluição da cromatografia. (Fonte: própria).

Com a proteína purificada, solúvel e em estado monomérico, foi feita a clivagem da proteína com uso de TEV (1 unidade/ μ L) na concentração 1:30. A clivagem foi realizada em temperatura ambiente por 48h. Após esse período, analisamos por gel SDS-PAGE 18% a eficiência da clivagem (**Figura 7A**). Uma vez confirmada a clivagem, uma nova cromatografia por afinidade com resina de níquel equilibrada com tampão A foi realizada. Uma vez que nessa etapa o mutante C135S não apresentava as histidinas, o que torna a proteína incapaz de ligar-se à coluna de afinidade, coletamos o *flowthrough* – **Figura 7B**

Ao final desse processo, a proteína foi dosada por meio da utilização de um espectrofotômetro (UVmini-1240 - SHIMADZU) e obtivemos o C135S puro.

Figura 7- 3ª Etapa da purificação do CDNF-C: clivagem com TEV

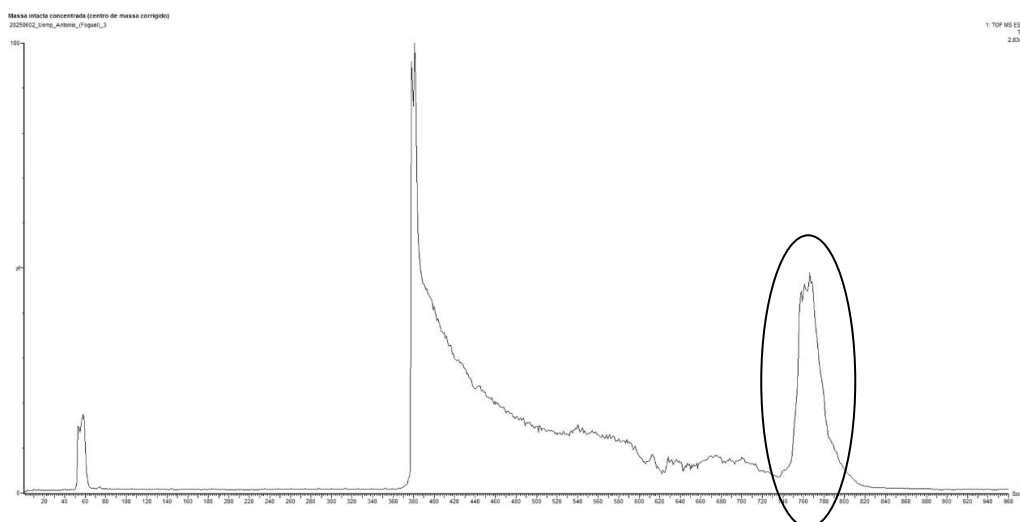


A. A proteína foi clivada com TEV por 48h. Uma alíquota de cada fração foi aplicada em um gel SDS-PAGE. A coluna 1 do gel apresenta o padrão de peso molecular, a coluna 2 apresenta o *flowthrough* da purificação, a coluna 3 apresenta o C135S clivado diluído, a coluna 4 apresenta o C135S clivado 10x concentrado e a coluna 5 apresenta o C135S não clivado. **B.** Cromatografia por afinidade após clivagem de C135S. As frações de C135S depois de clivadas foram aplicadas na coluna His-Trap FF equilibrada com tampão A. A figura apresenta o gel de eletroforese SDS-PAGE que possui em sua primeira coluna o padrão de peso molecular, em sua terceira coluna a fração de proteína não clivada e em sua quarta coluna a fração que não interagiu com a coluna. (Fonte: própria).

3.2. Caracterização estrutural do mutante C135S

Para confirmação da massa molecular do mutante C135S purificado, foi realizada uma análise por espectrometria de massa da amostra que mostrou um pico, com massa de 7.700Da, que condiz com a massa originalmente esperada para esta proteína (**Figura 8**)

Figura 8 - Análise da purificação de C135S por espectrometria de massas

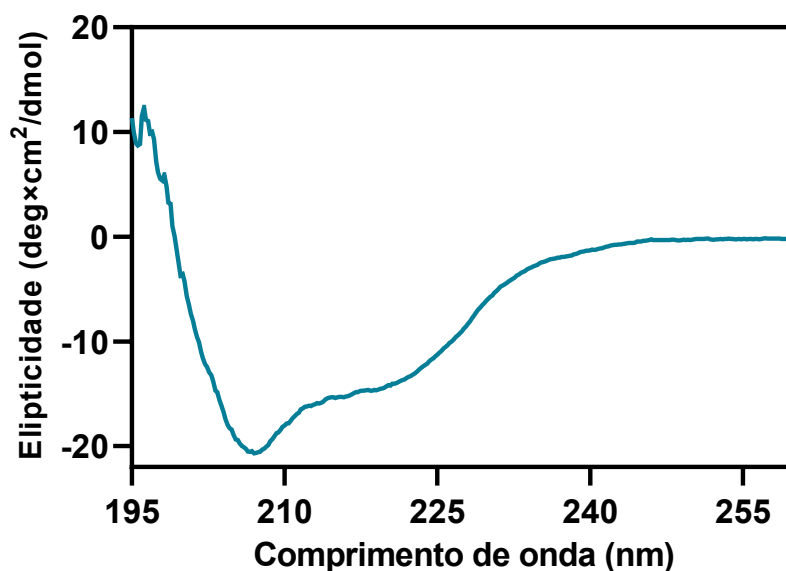


A amostra de C135S, após todos os passos de purificação, foi analisada por TIC - (*Total Ion Chromatogram*). O pico destacado da figura representa o monômero de C135S com massa molecular de aproximadamente 7,1 kDa. (Fonte: própria).

Com a massa molecular da proteína, foi feita a caracterização das estruturas secundárias e terciárias do mutante, pelas técnicas de dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência, respectivamente.

O espectro de dicroísmo circular (**Figura 9**) mostrou um pico positivo em 196 nm e dois picos negativos (208 nm e 222 nm), característico de proteínas enriquecidas em α -hélices, a análise do espectro de dicroísmo circular mostra um conteúdo de 57,4% de α -hélice, 42,4% de estrutura randômica e 0% de folha- β .

Figura 9 - Caracterização da estrutura secundária de CDNF-C por dicroísmo circular.

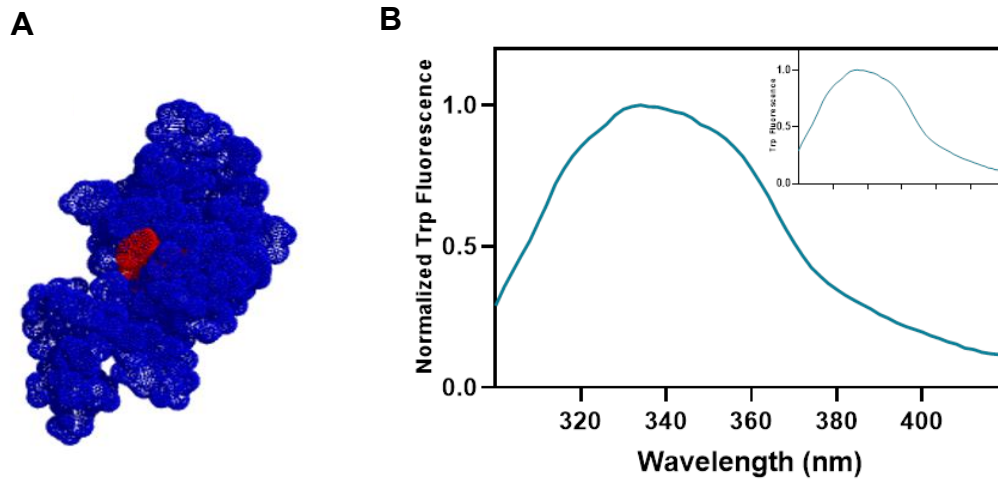


O experimento foi realizado a 25°C em NaCl 100 mM; pH 7,0. [ptn] = 100µM. As varreduras foram feitas de 260 a 190 nm a 0.2 nm. (Fonte: própria).

Nos experimentos de fluorescência, foram avaliadas a fluorescência intrínseca, que avalia a exposição do resíduo de triptofano presente na proteína, e extrínseca, que avalia a ligação à sonda Bis-ANS, do mutante.

A proteína mutante, igualmente à proteína CDNF-C presente na **Figura 10 A**, apresenta somente um resíduo de triptofano na posição 32. O espectro de emissão de fluorescência intrínseca mostrou um valor de centro de massa espectral em 345,5 nm (**Figura 10**), indicando que o triptofano se encontra exposto ao solvente.

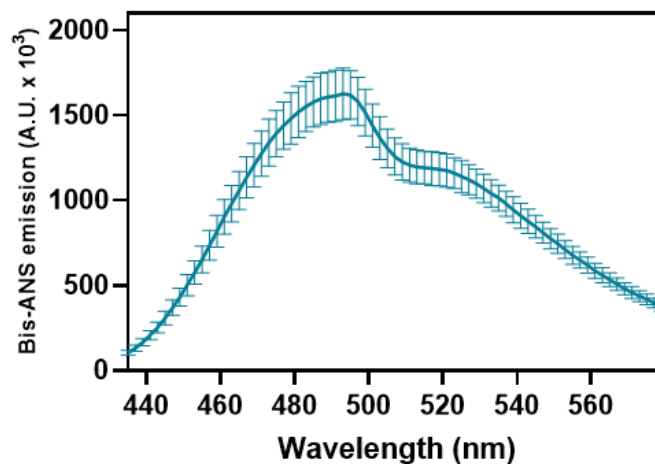
Figura 10 - Fluorescência intrínseca de C135S



A. Representação da estrutura do CDNF-C com destaque ao único resíduo de triptofano da posição 32 (PDB 4BIT de CDNF-FL) em vermelho (Silva, A. *et al*, 2023) **B.** Espectro de fluorescência de C135S realizado a 25°C em tampão MES 25 mM; pH 6,0 [ptn] = 15 μ M. Excitação em 280 nm. (Fonte: própria).

Na avaliação da fluorescência extrínseca pela ligação à sonda Bis-ANS (**Figura 11**) foi possível observar que o mutante C135S, apresenta ligação com a sonda o que indica que a proteína possui um domínio com estrutura flutuante como aquela observada em proteínas conhecidas como *molten globule* (Shi L., *et al*. 1994).

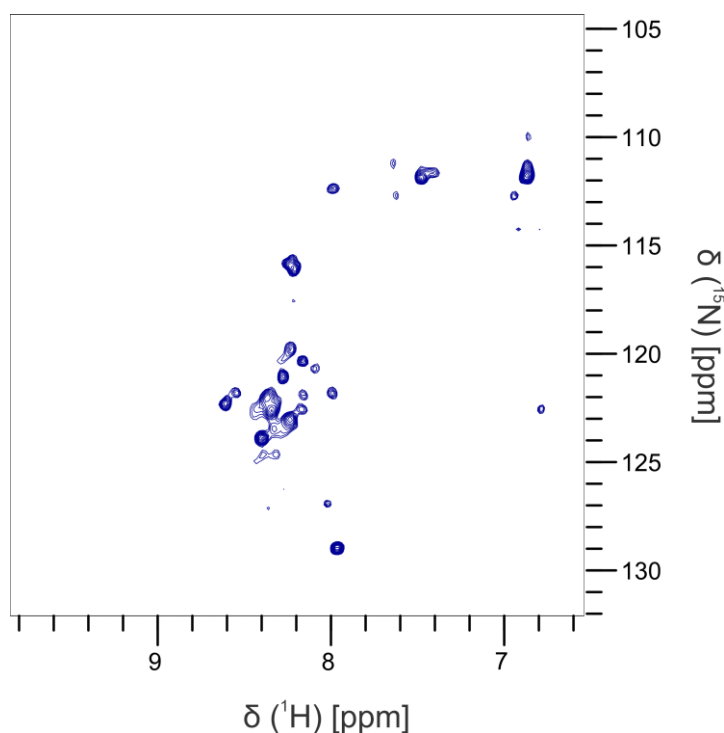
Figura 11 Fluorescência extrínseca de Bis-ANS



Espectro de fluorescência de Bis-ANS realizado a 25°C em tampão MES 25 mM; pH 6,0 [ptn] = 15 μ M. Excitação em 385 nm. (Fonte: própria).

Como último experimento para caracterização estrutural do C135S (**Figura 12**), foi utilizada a RMN, uma vez que a estrutura do CDFN-FL já foi determinada por RMN (Latgé, *et al* 2015). A intenção da RMN era a comparação dos espectros de C135S com o espectro de deslocamento químico da estrutura do CDFN-C isolado. Porém devido à baixa concentração da proteína mutante não foi possível a obtenção de um bom espectro para comparação.

Figura 12 - Espectros de RMN 2D de C135S.



Espectro de RMN 2D de C135S (N^{15}). O experimento foi realizado a 25°C (NaCl 100 mM, NaN_3 5 mM; pH 7,0). [ptn] = 190 μ m. (Fonte: própria)

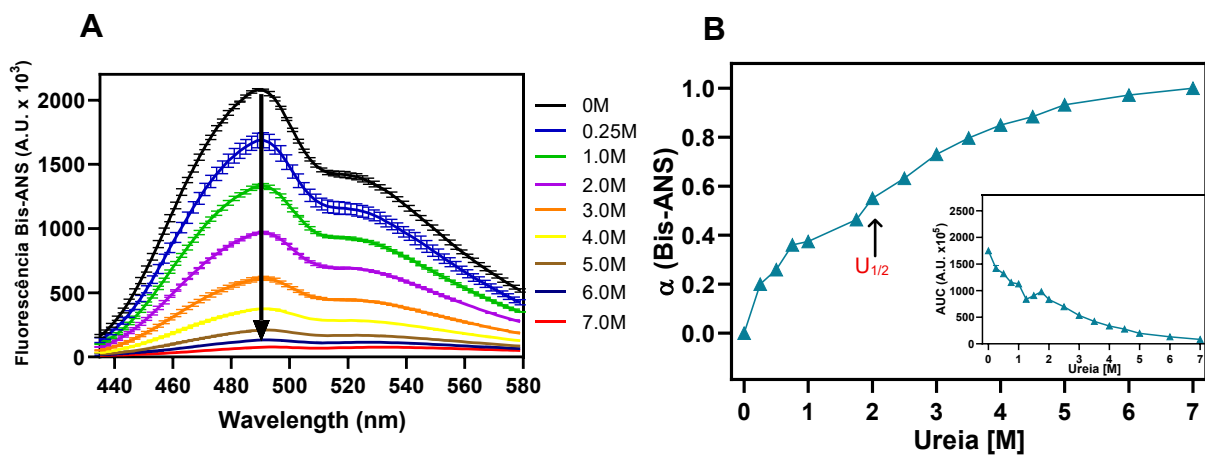
3.3. Papel da ponte dissulfeto na estabilidade do mutante C135S diante da desnaturação por Ureia

Após a obtenção da estrutura da proteína, foram feitos novos experimentos de fluorescência, para avaliação da fluorescência extrínseca (ligação ao Bis-ANS), e dicroísmo circular para a avaliação da estabilidade da proteína mutante diante da adição de Ureia como agente desnaturante. Para avaliar a estabilidade do C135S frente a ureia, a proteína foi incubada por 18h em concentrações crescentes de 0M – 8M de ureia.

Acompanhando o efeito da ureia na ligação do Bis-ANS ao mutante C135S é possível observar na **Figura 13 A** que em todas as concentrações de Ureia o Bis-ANS

perde da ligação com a proteína, mediante aumento de ureia, ocorre o desligamento de Bis-ANS e perda total de sua fluorescência. Isto indica completa desnaturação do domínio em altas concentrações de ureia. Assumimos que a proteína perde a sua estrutura terciária com aumento da ureia, sendo que em 4 M o processo se completa. O **painel B** mostra o α (% de desnaturação em cada concentração de ureia) obtido a partir dos dados apresentados no painel B. Nota-se que o $U_{1/2}$ (concentração de ureia que fornece 50% de desnaturação) foi de 1,8 M ureia.

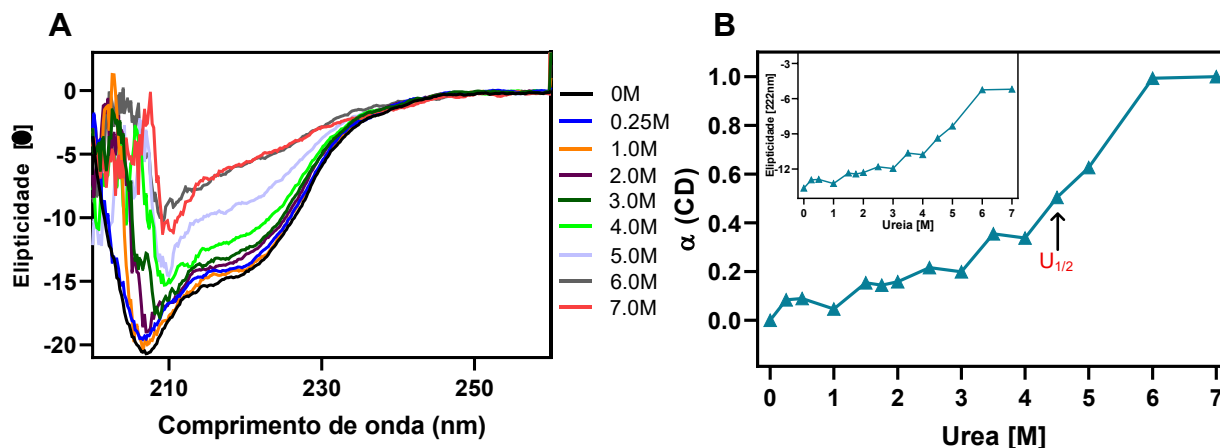
Figura 13 - Acompanhamento da desnaturação de C135S induzida por ureia por meio de BIS-ANS



A. Espectro de fluorescência de Bis-ANS na presença de ureia realizado a 25°C em tampão MES 25 mM; pH 6,0 [ptn] = 15 μ M [Bis-ANS] = 2 μ M [Ureia] = 0 – 8M. Excitação em 385 nm. B. Grau de desnaturação (α) calculado a partir dos dados de variação da área sob a curva dos espectros apresentados no painel A, mostrados no inserto da Figura B. (Fonte: própria).

Na avaliação da estrutura secundária da proteína diante da adição de Ureia por meio do dicroísmo é possível observar na **Figura 14 A** que a estrutura da proteína perde sua conformação a partir de 0,25M de Ureia. Na **Figura 14 B** temos o α obtido a partir dos dados apresentados. Nota-se que o $U_{1/2}$ foi de 4,5 M de Ureia

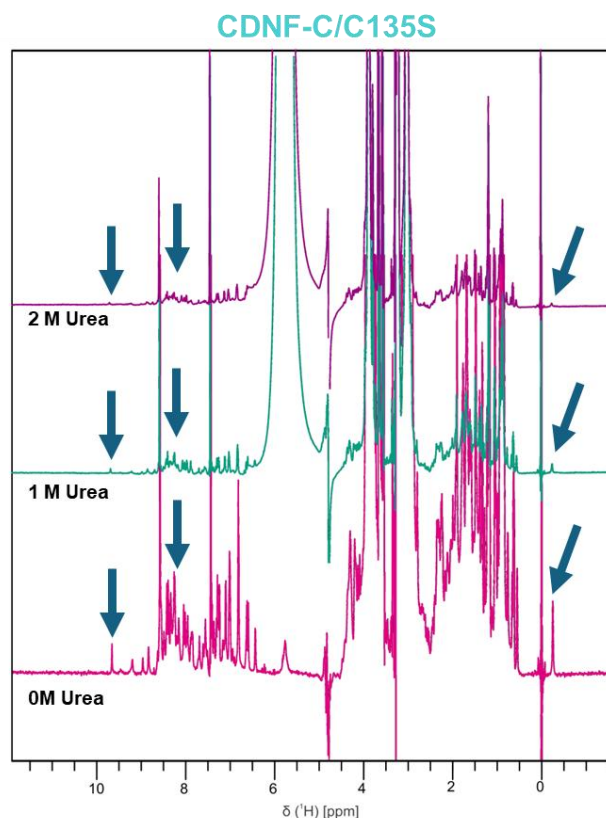
Figura 14 - Acompanhamento da desnaturação de C135S induzida por ureia por dicróismo circular



A. Espectro de dicróismo circular de C135S na presença de ureia. O experimento foi realizado a 25°C em MES 25 mM; pH 7,0. [ptn] = 100μM [Ureia] = 0-8M. As varreduras foram feitas de 260 a 190 nm a 0.2 nm B. Grau de desnaturação (α) calculado a partir dos dados de variação da área sob a curva dos espectros apresentados no painel A, mostrados no inserto da Figura B (Fonte: própria).

Apesar de pouco informativo, realizamos experimentos unidimensionais (^1H) de RMN (**Figura 15**). Nesse experimento é possível observar apenas os átomos de hidrogênio que compõem os resíduos de aminoácidos das proteínas, incluindo suas cadeias laterais. Quanto menos blindados, isto é, prótons perto de átomos eletronegativos (O, N), sofrem maior influência do campo magnético externo, consequentemente, seus sinais aparecem deslocados para baixo campo, que é representado por maior valor de δ em ppm (ex.: indol do triptofano – valor próximo a 10 ppm; hidrogênio amídico (da ligação peptídica): 7 – 10 ppm), hidrogênios ligados aos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina apresentam blindagem intermediária, cujos sinais variam entre 6,5 – 8 ppm. Já hidrogênios ligados a núcleos mais blindados, sentem menor influência do campo magnético e ressonam em um campo menor de valor de δ em ppm (ex: $\text{H}\alpha$ – próximo a carbonila – 3.5 – 5 ppm, já cadeias laterais alifáticas são altamente blindadas, CH, CH₂ variam entre 1 – 3,5, enquanto CH₃ - +0,5 – 1) (Zarycz; Guerra, 2018). Com isso, avaliamos o impacto global da adição de ureia ao sinal de H^+ da proteína. Observa-se que diante do aumento da concentração de ureia ocorre uma diminuição dos picos de sinais de proteína, o que indica que ocorre desnaturação da proteína diante da presença de ureia, embora não possamos afirmar quais aminoácidos são afetados pela presença do agente desnaturante.

Figura 15 Desnaturação do CNDF-C induzida por ureia acompanhada por RMN



Espectro de 1D (¹H) na presença de diferentes concentrações de ureia (Fonte: própria).

3.4. Avaliação do funcionamento do mutante C135S por meio de experimentos de LDH e MTT

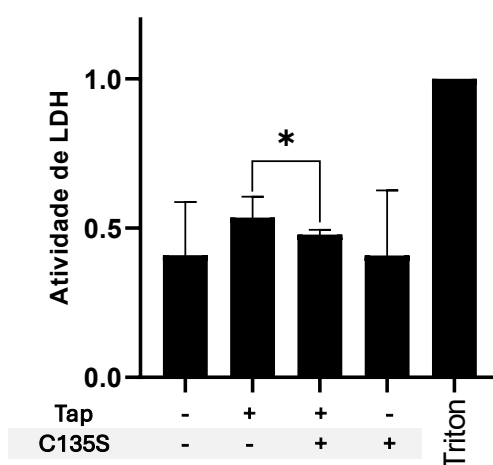
Após a obtenção dos dados estruturais da proteína foram realizados experimentos com modelos celulares de neuroblastomas de camundongos (N2A) e de mioblastomas de camundongos (H9C2) para observar se a proteína com mutação na ponte dissulfeto seria capaz de proteger as células diante do estresse por agentes químicos que mimetizam o estresse presente na DP.

O experimento de LDH foi realizado com o sobrenadante de células de linhagem H9C2, que foram cultivadas em placas de 96 poços, sendo incubadas a 37°C por 24h, e passaram pelo tratamento prévio com o mutante C135S, sendo incubadas a 37°C por 1h com a proteína. Após o tempo de tratamento foi realizado o estresse com taspigargina, que foi novamente incubada a 37°C por 20h. Ao final do tempo de experimento o sobrenadante foi coletado e foram passados 50μL deste sobrenadante para uma nova placa de 96 poços, em seguida foram adicionados 50 μL do reagente presente no kit em cada poço. A placa foi coberta com papel alumínio

e incubada a 37°C por 30 minutos. Ao fim do tempo de 30 minutos foram adicionados 50 µL de *stop solution* para parar a reação. A placa foi lida em um leitor de placas a 495nm.

A análise do experimento, como visto na **Figura 16** demonstra que o tratamento prévio das células com a proteína mutante C135S diminui a atividade de LDH se comparado a atividade nas células estressadas com tapsigargina, porém esta diminuição não ocorre de maneira significativa.

Figura 16 Ensaio de viabilidade celular de LDH de células H9C2



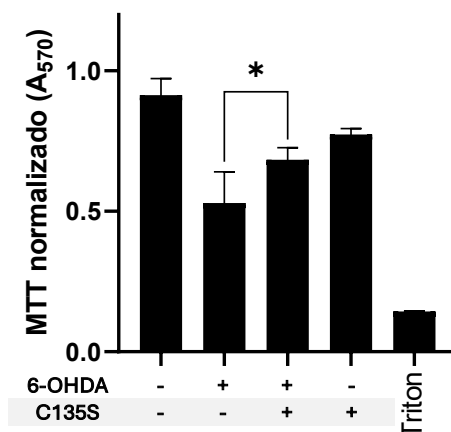
Os experimentos foram realizados utilizando a concentração de 2×10^4 células por poço utilizando meio de cultura DMEM high glucose enriquecido com soro fetal bovino e piruvato de sódio (Fonte: própria).

Já o experimento de MTT foi realizado utilizando células de linhagem neuronal N2A, que também foram cultivadas em uma placa de 96 poços e incubadas a 37°C por 24h e em seguida passaram pelo tratamento prévio com o mutante C135S, sendo incubadas a 37°C por 1h. Após o tempo de tratamento foi realizado o estresse com 6-HDOA, e a placa foi novamente incubada a 37°C por 20h. Ao final do tempo de estresse, com as células aderidas no fundo da placa, o meio de cultura foi removido e substituído por 100µL de meio fresco. Em seguida foram adicionados 10µL do reagente de MTT que foi incubado a 37°C por 4h. Após o tempo de 4h foram adicionados 100µL de solvente, para a dissolução dos cristais de MTT. A placa foi lida a 570nm

De maneira semelhante ao ensaio de LDH a análise do experimento de MTT (**Figura 17**) demonstrou que o uso de C135S no tratamento das células não fez com

que a sobrevivência das células aumentasse de maneira significativa se comparado às células estressadas sem tratamento.

Figura 17 Ensaio de viabilidade celular de MTT de células N2a



Os experimentos foram realizados utilizando a concentração de 2×10^4 células por poço utilizando meio de cultura DMEM/F12 enriquecido com soro fetal bovino (Fonte: própria).

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi observado o mutante C135S da proteína CDNF, um fator neurotrófico que possui 161 aminoácidos e é dividido em dois domínios, o domínio N-terminal e o domínio C-terminal (Parkash *et al.*, 2009). Juntamente com MANF o CDNF forma uma nova família de fatores neurotróficos por apresentarem uma estrutura diferente dos demais fatores neurotróficos (Lindholm; Saarma, 2010). Esta família de proteínas também apresenta um mecanismo de ação diferente por serem residente do RE e possuírem um papel importante na manutenção da homeostase do RE, ajudando na diminuição da agregação de proteínas e diminuindo inflamação (Löhela; Saarma; Airavaara, 2024). Recentemente foi observado pelo nosso grupo que o domínio funcional de CDNF é o domínio C-terminal, assim como sua proteína paróloga MANF, que apresenta em sua conformação um motivo CXXC (¹³²CRAC¹³⁵), que também aparece na porção C-terminal de MANF (**Figura 3**).

Foi observado por Mätlik *et al.* (2015) que o motivo CXXC é essencial para o funcionamento de MANF e recentemente foi observado por Eesmaa *et al.* (2022) que a mutação do mesmo motivo na proteína CDNF diminuiu, não completamente, os efeitos antiapoptóticos de CDNF no estresse do RE, propondo que a importância do

motivo CXXC na atividade protetora de CDNF vem do seu possível papel em estabilizar a estrutura de CDNF em uma forma favorável à sua ação antiapoptótica.

Visto que o experimento com a mutação da proteína foi realizado utilizando um construto de CDNF em seu tamanho íntegro e que a porção funcional da proteína é a fração C-terminal, foi produzido um novo construto da mutação apenas na porção C-terminal da proteína, seguindo a mudança feita por Eesma *et al.* (2022) gerando a proteína CDNF-C/C135S para a caracterização estrutural da proteína, a observação da estabilidade de sua estrutura e a avaliação de seu funcionamento na proteção de neurônios e cardiomiócitos diante do estresse no RE. Para a caracterização estrutural da proteína foram feitos experimentos de Dicroísmo Circular, Fluorescência intrínseca e extrínseca e Ressonância Magnética. E para a avaliação do funcionamento do mutante foram feitos experimentos de LDH e MTT.

Para a realização destes experimentos foi necessário o estabelecimento de um novo protocolo para expressão e purificação do mutante C135S, que foi baseado no protocolo utilizado para a expressão e purificação da proteína CDNF utilizado no trabalho de Latgé, et al. (2015). Como o mutante C135S possui a presença de uma cisteína livre, foi adicionada aos tampões utilizados para a purificação o foi adicionado o agente redutor DTT, para evitar a formação de dímeros por interações entre as cisteínas livres das proteínas, a fim de obtermos a proteína em seu estado puro e monomérico.

Inicialmente foi feita a caracterização estrutural da estrutura secundária da proteína por meio do experimento de Dicroísmo Circular. Em experimentos de DC existem curvas padrão que representam os tipos de estruturas secundárias presentes na formação de proteínas, e proteínas com predominância de alfa-hélices em sua formação apresentam um pico positivo em 196nm e dois picos negativos, um em 208nm e um em 222nm. Como podemos observar na **Figura 9** nosso gráfico apresenta esta exata conformação, indicando que o mutante é uma proteína rica em alfa hélices, assim como a proteína CDNF-C em sua conformação nativa, como visto na dissertação de mestrado de Antonio dos Santos Silva (Silva, A, *et al.* 2023), o que indica que a ponte dissulfeto não interfere na formação da estrutura secundária da proteína.

Ao analisarmos a estrutura terciária da proteína utilizando experimento de fluorescência intrínseca (**Figura 10**) pela observação da molécula de triptofano presente na proteína foi observado um centro de massa de 345,5nm, o que indica que

o triptofano se encontra exposto ao solvente, de maneira semelhante à proteína CDNf-C em seu estado natural, como foi observado na dissertação de Mestrado de Antonio dos Santos Silva (Silva, A, *et al.* 2023). E a análise da fluorescência extrínseca da proteína, utilizando a sonda Bis-ANS, mostra que há ligação da sonda à proteína, indicando que a proteína possui uma estrutura flutuante como observada em proteínas do tipo *molten globule* ou glóbulo fundido, que apresentam estrutura heterogênea, onde uma porção da molécula é mais organizada e semelhante à nativa e outras porções menos organizadas. No estado de glóbulo fundido, a proteína apresenta grande parte de sua estrutura secundária já definida, mas ainda há falta de uma estrutura terciária rígida. (ARAI, M, *et al.* 2000; PTITSYN. 1995).

No experimento de RMN, que é a melhor forma de identificar as mudanças na estrutura de proteínas por permitir a análise de cada resíduo da proteína, observamos no espectro bidimensional da **Figura 12** que a proteína não apresenta sinais claros, não nos dando muita informação acerca de sua estrutura.

Após a obtenção de dados acerca da estrutura da proteína, foram realizados experimentos para análise da estabilidade estrutural da proteína diante da desnaturação química por ureia, utilizando dicroísmo circular, espectroscopia de fluorescência, apenas por fluorescência extrínseca, e RMN.

No experimento de Bis-ANS foi possível observar (Figura 9) que mesmo o mínimo nível de concentração de ureia (0,25M) faz com que Bis-ANS perca sua ligação com a proteína, indicando perda da estrutura secundária da proteína. À medida que se aumenta a concentração do desnaturante, Bis-ANS se desliga completamente da proteína sugerindo completa perda da estrutura secundária e terciária.

Na análise dos experimentos de desnaturação por ureia utilizando o dicroísmo circular foi possível observar que, de maneira semelhante à leitura de Bis-ANS, a proteína perde sua estrutura secundária na presença da concentração mínima de 0.25M de ureia, e conforme a concentração do desnaturante aumenta o espectro de alfa-hélices é perdido completamente, indicando perda total da estrutura secundária da proteína.

Nos estudos de RMN foi possível observar o processo de desnaturação do C135S induzido pelo agente químico, como é possível ver na **Figura 15**, sem a presença de ureia o espectro de RMN apresenta diversos picos bem definidos, demarcando a localização dos aminoácidos da conformação de sua estrutura, porém

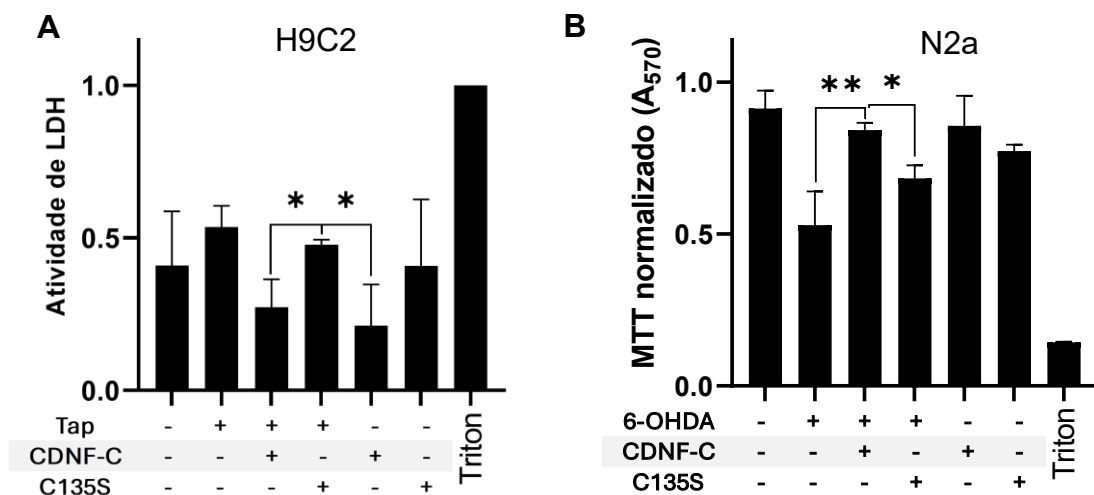
diante da adição de 2M de ureia a proteína perde o sinal de grande parte destes picos, indicando que sua estrutura está sendo perdida quase que completamente em baixas concentrações de ureia.

Após os experimentos de estabilidade estrutural, foram realizados ensaios de viabilidade celular com células H9C2 e N2a, que são grupos celulares protegidos do estresse do RE por CDNF-C em seu estado natural, na intenção de observar se mesmo sem a presença da ponte dissulfeto a proteína exerceria seu papel protetor.

Com as células H9C2 foi realizado o experimento de LDH para observar se a proteína mutante C135S a protegeria diante do estresse do retículo endoplasmático induzido por tapsigargina. Como é possível observar na **Figura 16** a presença de C135S anterior ao estresse da célula por tapsigargina não afeta a sobrevivência da célula, ao contrário do que pode ser visto na **Figura 18 A**, onde vemos que a proteína CDNF-C age diminuindo a atividade de LDH, ou seja, aumentando a sobrevivência das células diante do estresse do RE.

No experimento de MTT realizado com as células N2a (**Figura 17**) foi observado um comportamento semelhante ao do experimento realizado com cardiomiócitos. Diante do estresse das células com 6-OHDA observamos que a sobrevivência celular é diminuída e o uso de C135S como tratamento anterior ao estresse, embora aumente a sobrevivência celular, não o faz de maneira a retornar aos níveis normais. Ao contrário do CDNF-C (**Figura 18 B**), que faz com que as células sobrevivam em maior quantidade quando comparado às células estressadas sem tratamento prévio.

Figura 18 Experimentos de viabilidade celular de LDH e MTT com C135S E CDNF-C



Os experimentos foram realizados utilizando a concentração de 2×10^4 células por poço utilizando meio de cultura DMEM high glucose enriquecido com soro fetal bovino e piruvato de sódio, para as células H9C2 e meio DMEM/F12 enriquecido com soro fetal bovino para as células N2A (Fonte: própria).

5. CONCLUSÃO

Com base nos experimentos realizados é possível observar que a presença da ponte dissulfeto na proteína CDFN é essencial para a estabilidade de sua estrutura, visto que o mutante C135S perde sua forma diante de perturbações mínimas de agentes desnaturantes como a ureia. Observamos também que sua estrutura terciária se apresenta mais sensível à desnaturação com ureia que sua estrutura secundária perdendo sinal diante de concentrações menores do agente desnaturante.

Podemos dizer também que a presença da ponte dissulfeto na proteína CDFN é necessária para que a mesma exerça sua função citoprotetora e para o funcionamento de seus mecanismos de neuro e cardioproteção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRAVAARA, M et al. Widespread cortical expression of MANF by AAV serotype 7: Localization and protection against ischemic brain injury. **Experimental Neurology**, v. 225, n. 1, p. 104–113, 3 jun. 2010.
- APPENZELLER-HERZOG, C.; ELLGAARD, L. The human PDI family: Versatility packed into a single fold. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 4, p. 535–548, abr. 2008.
- ARAI, M; KUWAJIMA, K. **Role of the molten globule state in protein folding**. 2000. *Advances in protein chemistry*, v. 53, p. 209-282, 2000.
- ARANCIBIA, D.; ZAMORANO, P.; ANDRÉS, M. E. CDFN induces the adaptive unfolded protein response and attenuates endoplasmic reticulum stress-induced cell death. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1865, n. 11, p. 1579–1589, 23 ago. 2018.
- SILVA, Antonio dos Santos. **Caracterização da estabilidade estrutural do domínio C do Fator Neurotrófico Dopamina Cerebral (CDFN-C): implicações funcionais**. Orientadora: Dr^a Debora Foguel. 2023. Dissertação (Mestrado em Química Biológica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.
- CHEN, Y.; BRANDIZZI, F. IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. **Trends in Cell Biology**, v. 23, n. 11, p. 547–555, 21 jul. 2013.
- DANILOVA T, GALLI E, PAKARINEN E, PALM E, LINDHOLM P, SAARMA M, LINDAHL M. Mesencephalic Astrocyte-Derived Neurotrophic Factor (MANF) Is Highly Expressed in Mouse Tissues With Metabolic Function. (2019). **Front. Endocrinol.** 10:765. doi: 10.3389/fendo.2019.00765
- EESMAA, A. et al. CDFN Interacts with ER Chaperones and Requires UPR Sensors to Promote Neuronal Survival. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 16, p. 9489–9489, 22 ago. 2022.
- GHEMRAWI, R.; KHAIR, M. Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response in Neurodegenerative Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 6127–6127, 25 ago. 2020.
- HALLIDAY, G.; LEES, A.; STERN, M. Milestones in Parkinson's disease—Clinical and pathologic features. **Movement Disorders**, v. 26, n. 6, p. 1015–1021, 1 maio 2011.
- HELIKE LÖHELAID; SAARMA, M; AIRAVAARA, M. CDFN and ER stress: Pharmacology and therapeutic possibilities. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 254, p. 108594–108594, 28 jan. 2024.
- HELLMAN, M. et al. Mesencephalic Astrocyte-derived Neurotrophic Factor (MANF) Has a Unique Mechanism to Rescue Apoptotic Neurons. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 4, p. 2675–2680, jan. 2011.

HENDERSON, M. J. et al. Mesencephalic Astrocyte-derived Neurotrophic Factor (MANF) Secretion and Cell Surface Binding Are Modulated by KDEL Receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 6, p. 4209–4225, fev. 2013.

HUTTUNEN, H. J.; SAARMA, M. CDNF Protein Therapy in Parkinson's Disease. **Cell Transplantation**, v. 28, n. 4, p. 349–366, 1 abr. 2019.

MÄTLIK, K. et al. Role of two sequence motifs of mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor in its survival-promoting activity. **Cell Death and Disease**, v. 6, n. 12, p. e2032–e2032, 31 dez. 2015.

LATGE, C. et al. The Solution Structure and Dynamics of Full-length Human Cerebral Dopamine Neurotrophic Factor and Its Neuroprotective Role against α -Synuclein Oligomers. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 33, p. 20527–20540, ago. 2015.

LINDAHL, M. et al. MANF Is Indispensable for the Proliferation and Survival of Pancreatic β Cells. **Cell Reports**, v. 7, n. 2, p. 366–375, abr. 2014.

LINDAHL, M.; SAARMA, M.; LINDHOLM, P. Unconventional neurotrophic factors CDNF and MANF: Structure, physiological functions and therapeutic potential. **Neurobiology of Disease**, v. 97, p. 90–102, 17 jul. 2016.

LINDHOLM, P. et al. Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. **Nature**, v. 448, n. 7149, p. 73–77, jul. 2007.

LINDHOLM, P.; SAARMA, M. Novel CDNF/MANF family of neurotrophic factors. **Developmental Neurobiology**, v. 70, n. 5, p. 360–371, 22 fev. 2010.

LINDHOLM, P.; SAARMA, M. Cerebral dopamine neurotrophic factor protects and repairs dopamine neurons by novel mechanism. **Molecular Psychiatry**, v. 27, n. 3, p. 1310–1321, 14 dez. 2021.

LIU, H. et al. Cerebral dopamine neurotrophic factor protects H9c2 cardiomyocytes from apoptosis. **Herz**, v. 43, n. 4, p. 346–351, 25 abr. 2017.

LIU, H.; TANG, X.; GONG, L. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor and cerebral dopamine neurotrophic factor: New endoplasmic reticulum stress response proteins. **European Journal of Pharmacology**, v. 750, p. 118–122, 28 jan. 2015.

MACIEL, L. et al. New Cardiomyokine Reduces Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by PI3K-AKT Pathway Via a Putative KDEL-Receptor Binding. **Journal of the American Heart Association**, v. 10, n. 1, 5 jan. 2021.

MEI, J.; NIU, C. Effects of CDNF on 6-OHDA-induced apoptosis in PC12 cells via modulation of Bcl-2/Bax and caspase-3 activation. **Neurological Sciences**, v. 35, n. 8, p. 1275–1280, 15 mar. 2014.

OAKES, S. A.; PAPA, F. R. The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Human Pathology. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 10, n. 1, p. 173–194, 24 jan. 2015.

OBESO, J. A. et al. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. **Movement Disorders**, v. 32, n. 9, p. 1264–1310, 1 set. 2017.

OH-HASHI, K. et al. Intracellular trafficking and secretion of mouse mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 363, n. 1-2, p. 35–41, 27 nov. 2011.

PARKASH, V. et al. The structure of the conserved neurotrophic factors MANF and CDNF explains why they are bifunctional. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 22, n. 4, p. 233–241, 10 jan. 2009.

PETROVA, P. et al. MANF: a new mesencephalic, astrocyte-derived neurotrophic factor with selectivity for dopaminergic neurons. **Journal of molecular neuroscience: MN**, v. 20, n. 2, p. 173–188, 1 abr. 2003.

PTITSYN, O. B. Molten globule and protein folding. 1995. **Advances in protein chemistry**, v. 47, p. 83-229, 1995.

SANTOS, R. D. S. et al. Cerebral Dopamine Neurotrophic Factor (CDNF) Acts as a Trophic Factor Promoting Neuritogenesis in the Dorsal Root Ganglia (DRG) Neurons Through Activation of the PI3K Signaling Pathway. **Journal of Neurochemistry**, v. 169, n. 8, ago. 2025.

SCHWARZ, D. S.; BLOWER, M. D. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 1, p. 79–94, 3 out. 2015.

SHI L, PALLEROS DR, FINK AL. **Protein conformational changes induced by 1,1'-bis (4-anilino-5-naphthalenesulfonic acid):** preferential binding to the molten globule of Dna K. *Biochemistry*. 1994 Jun 21;33(24):7536-46. doi: 10.1021/bi00190a006. PMID: 8011619.

TEYMOURIAN, H. et al. Closing the loop for patients with Parkinson disease: where are we? **Nature Reviews Neurology**, v. 18, n. 8, p. 497–507, 1 ago. 2022.

UDDIN, M. S. et al. Molecular Mechanisms of ER Stress and UPR in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. **Molecular Neurobiology**, v. 57, n. 7, p. 2902–2919, 19 maio 2020.

WU, J. et al. ATF6 α Optimizes Long-Term Endoplasmic Reticulum Function to Protect Cells from Chronic Stress. **Developmental Cell**, v. 13, n. 3, p. 351–364, 1 set. 2007.

YAN, Y. et al. MANF antagonizes nucleotide exchange by the endoplasmic reticulum chaperone BiP. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 1 fev. 2019.

ZARYCZ, M. N. C.; GUERRA, C. F. NMR ^1H -Shielding Constants of Hydrogen-Bond Donor Reflect Manifestation of the Pauli Principle. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 9, n. 13, p. 3720–3724, 21 jun. 2018.

ZHANG, G. L. et al. Cerebral Dopamine Neurotrophic Factor (CDNF) Has Neuroprotective Effects against Cerebral Ischemia That May Occur through the

Endoplasmic Reticulum Stress Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, p. 1905–1905, 29 jun. 2018.