

Joana Catarina Pereira de Sousa

Estudo do complexo
LIMP-2/ β -Glucocerebrosidase
Identificação de interactores da LIMP-2



Mestrado em Medicina e Oncologia Molecular
Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Outubro 2012

Joana Catarina Pereira de Sousa

Estudo do complexo

LIMP-2/ β -Glucocerebrosidase

Identificação de interactores da LIMP-2



**Dissertação submetida à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto para
obtenção do grau de mestre em Medicina e Oncologia Molecular**

Orientador – Doutora Maria Clara Pereira de Sá Miranda

Categoria – Investigadora do Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto

Afiliação – Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto

Co-orientador – Doutora Andrea Balreira da Silva Duarte

Categoria – Investigadora no Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto

Afiliação – Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto

**Em especial, para o Romeu...
Aos meus pais e marido...
Pois os que mais nos apoiam são sempre
os que passam despercebidos.**

Este trabalho foi inserido no projecto (PTDC/SAU-GMG/105334/2008) financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT).

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar à Doutora Clara de Sá Miranda pela confiança demonstrada em mim o que possibilitou a realização deste trabalho no seio do seu grupo, e pela oportunidade de me iniciar numa carreira científica.

Agradeço também ao Prof. Doutor Henrique Almeida, coordenador deste mestrado, pela oportunidade que me proporcionou, bem como, pela disponibilidade demonstrada ao longo de todo o curso.

À Andrea pela orientação e apoio que me deu em toda a dissertação e que nunca baixou os braços perante todas as adversidades.

À Filipa pelo tempo dispensado, ensinamento e orientação sem a qual a dada altura não seria possível prosseguir.

À Anabela pelo apoio e crença incondicional de que todo este trabalho seria possível e valeria a pena.

À Seixas por me ouvir divagar sobre lisossomas e imunoprecipitações ao pequeno-almoço.

Ao Prof. Doutor Jorge Azevedo pela generosidade e criticismo essenciais à prática científica.

À UniLiPe e OBF pelas instalações e material disponibilizado que tornaram possível a realização deste projecto.

Agradeço ao Dr. Hugo Ósorio e à unidade de proteómica do IPATIMUP pela análise de identificação de proteínas por espectrometria MALDI-TOF/TOF.

Aos meus pais que mesmo não sabendo do que estou a falar sempre me ouviram e me deram os melhores conselhos.

Ao Toni... que sempre teve toda a paciência do mundo para me ouvir dramatizar sobre o que não corria bem e me via em êxtase com o que corria bem. Que me ouviu ler esta dissertação vezes sem conta e que sempre dizia “Apesar de não perceber nada desses nomes estranhos, parece-me bastante bem”. Sem ti nada disto seria possível!

Ao Romeu, com profundo amor, que apesar de tão pequenino não se importou de partilhar a mamã com os seus deveres (desde que com a barriguinha cheia!) e que se esforçou por dormir razoavelmente as noites todas deixando-me com energia suficiente para terminar esta jornada.

Em último, a todos aqueles que apesar de não estarem discriminados, sempre me ouviram, discutiram e partilharam a sua opinião fazendo do conhecimento não uma arma mas um presente.

Com carinho especial, agradeço ao meu avô que sempre me achou capaz de tudo e que sempre me fez sentir especial, dando algo de si para que todo este processo começasse e me tornasse em algo que hoje sou. Apesar de já não se encontrar comigo, sei que seria de grande orgulho para ele o fim deste ciclo.

O meu muito Obrigado.

Resumo

A LIMP-2 (*Lysosomal Integral Membrane Protein type 2*) é uma proteína da membrana lisossomal sintetizada e glicosilada no retículo endoplasmático (RE), responsável pelo endereçamento da β -Glucocerebrosidase (GCCase) para o lisossoma¹.

Mutações em homozigotia ou heterozigotia composta no gene que codifica a LIMP-2, o SCARB2, foram já descritas como causa da Epilepsia Mioclónica Progressiva do tipo 4 (EPM4 - *Epilepsy, progressive myoclonic 4*) (MIM#254900). Esta síndrome apresenta uma heterogeneidade sintomática, à qual pode estar associada falência renal, sendo conhecida como síndrome de Mioclonias de Acção com Falência Renal (AMRF – *Action Myoclonus-Renal Failure*)²⁻⁴ e se caracteriza por mioclonias de acção progressivas, disartria, ataxia, convulsões e atrofia cerebelosa sem comprometimento cognitivo. Nos casos em que o envolvimento renal está presente, a falência renal requer na maioria das vezes diálise/transplante renal.

Dada a importância da LIMP-2 na biogénese e manutenção do sistema endossoma/lisossoma⁵, no presente estudo procedemos à identificação e estabelecimento da estequiometria relativa do complexo LIMP-2/GCCase em diferentes órgãos de ratinho (*Mus musculus*) que se revelou ser diferente entre os órgãos analisados, que se poderá dever à reciclagem da LIMP-2 para o retículo endoplasmático ou complexo de Golgi; ao *turnover* diferencial da LIMP-2 e GCCase e/ou às múltiplas funções da LIMP-2 na célula.

Além da descrição das condições favoráveis de obtenção de LIMP-2 solúvel após tratamento da membrana lisossomal com agentes solubilizantes (Digitonina e Triton X-100) e das condições favoráveis à imunoprecipitação dos complexos formados pela LIMP-2, são apresentadas três proteínas como potenciais interactores da LIMP-2. A identificação e estudo dos possíveis novos interactores, permitiria aprofundar o conhecimento das funções desta proteína, que além do conhecimento biológico básico, por si só, permitiria também compreender melhor a patofisiologia dos doentes com alterações nesta proteína.

Abstract

LIMP-2 (Lysosomal Integral Membrane Protein type 2) is a lysosomal membrane protein synthesized and highly glycosylated in the endoplasmic reticulum, that is responsible for the lysosomal sorting of β -glucocerebrosidase (GCCase)¹.

Alterations in SCARB2 gene, both in homozygosity or in compound heterozygosity, have been described as cause of progressive myoclonic epilepsy type 4 (EPM4) (MIM#254900). This syndrome presents heterogeneity of symptoms, that can be associated with renal failure and is known as action myoclonus-renal failure syndrome (AMRF)²⁻⁴ characterized by progressive action myoclonus, dysarthria, ataxia, seizures and cerebellar atrophy without cognitive impairment. In those cases where kidney involvement is observed, the kidney failure requires dialysis/renal transplantation in the vast majority of the cases.

Given the importance of LIMP-2 in the biogenesis and maintenance of the endosome/lysosome system⁵, in this study we proceeded to identification and establishment of the relative stoichiometry of the complex LIMP-2/GCCase in different organs of mice (*Mus musculus*) that proved to be different throughout the organs analyzed which should result from the recycling of LIMP-2 to the endoplasmic reticulum or Golgi apparatus; the differential turnover of LIMP-2 and GCCase and/or the multiple functions of LIMP-2 in the cell.

Besides the description of the favorable conditions for obtaining soluble LIMP-2 after treatment with the lysosomal membrane solubilizing agents (Digitonin and Triton X-100) and favorable conditions for immunoprecipitation of the complexes formed by LIMP-2, three proteins are presented as possible interactors of LIMP-2. The identification and the study of new LIMP-2 partners would allow the deepening of our knowledge, not only on its basic biological function, but also, would give new insights on the pathophysiology of this rare and yet poorly understood disorder.

Índice

Agradecimentos	1
Resumo	3
Abstract.....	4
Índice	5
Lista de Abreviaturas.....	7
I. Introdução	9
1. Lisossoma	9
1.1. Biogénese do lisossoma	11
1.2. Síntese e transporte de enzimas lisossomais	12
1.3. Lysosomal Integral Membrane Protein type 2.....	14
2. Doenças lisossomais de sobrecarga	16
2.1. Epilepsia mioclónica progressiva do tipo 4	19
2.1.1. Manifestações clínicas.....	19
2.1.2. Genética Molecular	20
II. Objectivos.....	23
III. Material e Métodos.....	25
3.1. Material Biológico	25
3.2. Preparação da Amostra	25
3.3. Ensaio enzimáticos.....	26
3.4. Electroforese em gel de poliacrilamida desnaturante	27
3.5. Isolamento de fracções subcelulares.....	28
3.6. Solubilização de proteína.....	29
3.7. Electroforese em gel nativo de poliacrilamida	29
3.8. Imunoprecipitação da LIMP-2.....	30

3.9. Identificação de proteína	30
3.10 Estatística	31
IV. Resultados	33
Estequiometria relativa do complexo LIMP-2/ β -Glucocerebrosidase	33
Distribuição da LIMP-2 nas diferentes fracções organelares	36
Condições de solubilização da LIMP-2	37
Avaliação dos complexos formados pela LIMP-2.....	46
Imunoprecipitação da LIMP-2.....	47
Análise das proteínas que co-precipitam com a LIMP-2.....	49
V. Discussão e Conclusões	53
Bibliografia.....	57

Lista de Abreviaturas

- 4-MU – 4-metilumbeliferona
- AMRF – *Action Myoclonus-Renal Failure* (Mioclonias de acção com falência renal)
- APS – Persulfato de Amonia
- CBE – Conduritol β Epoxido
- CD-MPR – Receptor de Manose-6-fosfato dependente de catiões
- CI-MPR – Receptor de Manose-6-fosfato independente de catiões
- CIP – Cocktail de inibidores de proteases
- DLS – Doenças Lisossomais de Sobrecarga
- DTT – Ditionotretitol
- EDTA – Ácido Etilenodiamino tetra-Acético
- EPM4 – *Epilepsy, Progressive Myoclonic 4* (Epilepsia mioclónica progressiva do tipo 4)
- EV71 – Enterovirus 71
- GCCase – β -Glucocerebrosidase
- GERL – *Golgi apparatus-Endoplasmic Reticulum-Lysosome* (Aparelho de Golgi-Reticulo Endoplasmático-Lisossoma)
- GLB – *Gel Loading Buffer*
- Glc – Glucose
- GlcNac – N-acetilglucosamina
- HDL – *High Density Lipoprotein* (Lipoproteína de alta densidade)
- HFMD – *Hand-foot-and mouth disease* (Doença de mão-pé e boca)
- LIMP-2 – *Lysosomal Integral Membrane Protein type 2* (Proteína da membrana integral do lisossoma de tipo 2)
- M6P – Manose-6-fosfato
- Man – Manose
- MPR – Receptor de Manose-6-fosfato
- MPS – Mucopolissacaridose
- MVB – Corpos multivesiculares
- PMSF – Fluor de fenilmetilsulfonilo
- RE – Retículo Endoplasmático
- SCARB2 – *Scavenger Receptor Class B, Member 2* (Receptor Scavenger de classe B, membro 2)

SDS – Dodecil-Sulfato de sódio

TEMED – Tetrametiletilenodiamina

TGN – *Trans-Golgi Network*

I. Introdução

1. Lisossoma

Os lisossomas são organelos membranares, presentes em todas as células eucariotas à excepção dos glóbulos vermelhos maduros⁶.

O lisossoma é o principal compartimento digestivo da célula, sendo o último organelo do sistema endossoma-lisossoma. É um organelo ácido envolvido na degradação de macromoléculas por acção das hidrolases. Os lisossomas são essenciais para a maturação dos fagossomas em fagolisossomas durante a fagocitose, o que é importante na defesa da célula contra patogénicos. Está também associado à macroautofagia e à morte celular mediada pela catepsina⁷. Para além destas funções o lisossoma participa na exocitose e reparação da membrana plasmática, intervém na homeostase do colesterol e também na apresentação de antígenos pelo complexo maior de histocompatibilidade classe II (MHCII) (Figura 1)⁷.

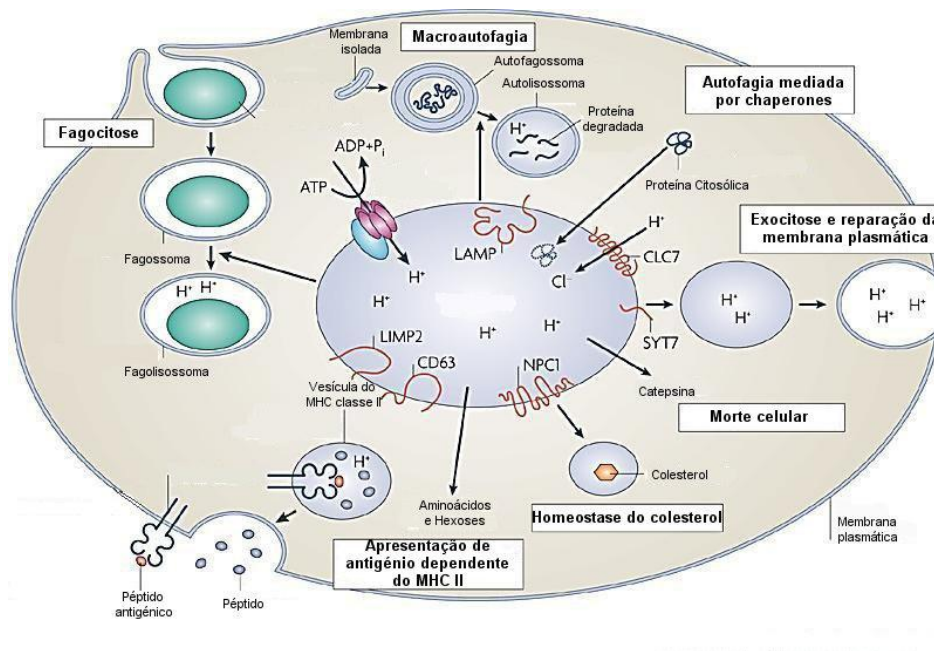


Figura 1 – Funções do lisossoma
Adaptado de Saftig and Klumperman, 2009⁷

O lisossoma foi descrito pela primeira vez em 1955, por Christian de Duve durante a realização de estudos de fraccionamento celular com o objectivo de clarificar a acção da insulina no fígado. Nesse estudo, descobriram que a enzima fosfatase ácida se encontrava associada a um grupo de partículas específicas na altura não identificadas, mas que se sabia não serem mitocôndrias nem microssomas. O aprofundar dos protocolos de fraccionamento subcelular permitiu-lhes isolar uma nova fracção particularmente rica nas novas partículas, às

quais inicialmente chamaram “L” de *Light mitochondria*. O estudo pormenorizado da fracção L conduziu à identificação de outras enzimas concentradas nesta fracção, que apesar de actuarem sobre diferentes substratos, tinham em comum o facto de serem hidrolases cujo pH óptimo é ácido, sugerindo já nessa altura uma função digestiva para este organelo.

Actualmente o lisossoma não é visto apenas como um organelo isolado, responsável pela degradação de macromoléculas, mas como parte integrante do sistema endossoma-lisossoma.

Este sistema do qual fazem parte endossomas primários, localizados na periferia da célula, endossomas maduros, com localização perinuclear, e lisossomas constitui uma cadeia de extrema importância no tráfego e digestão de moléculas endocitadas, sendo os endossomas extremamente importantes no endereçamento e reciclagem de proteínas⁸.

Nas células eucarióticas superiores, o processo de endocitose, tanto de proteínas como de lípidos, é mediado por ligação específica do ligando ao seu receptor. Após esta ligação, as vesículas revestidas por clatrina são internalizadas e o seu conteúdo eficientemente depositado em endossomas primários. O pH pouco ácido deste organelo proporciona a dissolução do complexo ligando/receptor, sendo estes dois componentes separados e os receptores reciclados, continuando os ligandos, bem como receptores que necessitem de serem degradados, a via degradativa encabeçada pelos endossomas maduros⁸.

As moléculas a serem degradadas são encontradas em corpos multivesiculares (MVB) que se fundem com os endossomas maduros, nos quais uma pequena degradação destas moléculas pode ocorrer. No entanto, apenas o pH mais ácido proporcionado pelo lisossoma permite a acção efectiva das hidrolases com a consequente digestão das moléculas endocitadas^{8,9}. O pH crucial na acção do lisossoma é mantido pela H⁺-ATPase lisossomal, uma bomba de prótons vacuolar presente na membrana deste organelo¹⁰.

Os endossomas parecem ser organelos fundamentais na reciclagem de receptores para a membrana plasmática ou para o complexo de Golgi. Após deixarem os endossomas primários, as moléculas recicladas são encontradas em estruturas tubulares que correspondem a endossomas de reciclagem. Este tipo de endossomas não possui receptores e ligandos que seguem a via de degradação, são menos ácidos do que os endossomas primários e encontram-se, em alguns mas não em todos os tipos celulares, perto dos centríolos. O transporte ao longo da via de reciclagem é dependente da actina do citoesqueleto e motores de miosina não convencionais, que terão um papel mecânico fundamental na dinâmica e biogénese dos túbulos⁸.

Apesar de muito incompleta, ainda nos dias de hoje, a proteómica do lisossoma tem sido caracterizada ao longo das últimas décadas. Além das hidrolases descritas inicialmente por de Duve, outras proteínas de extrema importância para este organelo localizam-se tanto na membrana lisossomal como no seu lúmen.

Um dos grupos de proteínas existentes no lisossoma são as proteínas activadoras ou saposinas (SAP), que são cofactores indispensáveis para a actividade de determinadas enzimas lisossomais, como GCCase, galactosilceramidase e β -N-acetil-hexosaminidase, responsáveis pela degradação de esfingolípido. Existem dois genes que codificam proteínas activadoras. Um codifica a proteína activadora GM1 e o outro codifica a Prosaposina (ProSAP) que quando processada dá origem a quatro saposinas homologas (A,B,C e D)⁹.

A membrana lisossomal apresenta várias funções incluindo acidificação da matriz lisossomal, sequestro de enzimas lisossomais, mediação de eventos de fusão do lisossoma com outros organelos e transporte de produtos degradados para o citoplasma. As proteínas da membrana lisossomal são, normalmente, altamente glicosiladas na sua face luminal, sendo as mais abundantes a LAMP-1, LAMP-2 e a LIMP-2. Outras proteínas, embora menos abundantes, são essenciais para processos de secreção de produtos para o citoplasma como a NPC1, a Sialina e a Cistosina, responsáveis pelo transporte de colesterol, ácido siálico e cistina respectivamente.

1.1. Biogénese do lisossoma

O conceito inicialmente proposto sobre a biogénese do lisossoma foi introduzido por Novikoff. Este conceito de GERL (Golgi apparatus – Endoplasmic Reticulum – Lysosome) propõe que enzimas hidrolíticas seriam sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso (RE) e empacotadas em vesículas (lisossomas primários) que através de túbulos contíguos ao RE e intimamente ligados ao complexo de Golgi levariam estas vesículas a fundirem-se com lisossomas já existentes, que teriam iniciado processos hidrolíticos (lisossoma secundário). No entanto esta definição foi substituída pelo conceito de TGN (*Trans-Golgi Network*). A chave da mudança de conceito prendeu-se com a evidência do transporte intracelular de enzimas lisossomais acontecer via receptores específicos e através de compartimentos pré-lisossomais⁶.

1.2. Síntese e transporte de enzimas lisossomais

As enzimas lisossomais são sintetizadas com uma sequência de 20 a 25 aminoácidos no *N*-terminal que permite o deslocamento do polipéptido nascente através da membrana do RE. Após a remoção do péptido sinal, oligossacarídeos tipicamente compostos por 3 resíduos de glucose (Glc), 6 resíduos de manose (Man) e 2 resíduos de *N*-acetilglucosamina (GlcNac) – $\text{Glc}_3\text{Man}_6\text{GlcNac}_2$ – são transferidos pela oligossacariltransferase para determinados resíduos de asparagina que fazem parte de um motivo de *N*-glicosilação Asn-X-Thr/Ser da proteína nascente.

Este precursor de glicoproteína passa por um extenso processo de maturação levado a cabo pela Glucosidase I e Glucosidase II até ser formada a glicoproteína madura.

A glicoproteína madura é depois translocada para o Golgi onde irá adquirir resíduos específicos dependendo do tipo de glicoproteína, tais como açúcares complexos e grupos sulfato, e onde será formado o marcador de reconhecimento na maioria das enzimas lisossomais, o resíduo manose-6-fosfato (M6P).

O resíduo de M6P é gerado pela acção sequencial de duas enzimas: inicialmente, a *N*-acetilglucosamina-1-fosfotransferase (GlcNac-fosfotransferase) catalisa a transferência de um resíduo GlcNac-1-fosfato da UDP-GlcNac para o resíduo terminal de manose da glicoproteína, depois a enzima *N*-acetilglucosamine-1-fosfodiester α -*N*-acetilglucosaminidase (fosfodiester α -GlcNacase) cliva o motivo GlcNac deixando exposto o resíduo M6P (Figura 2)¹¹⁻¹³.

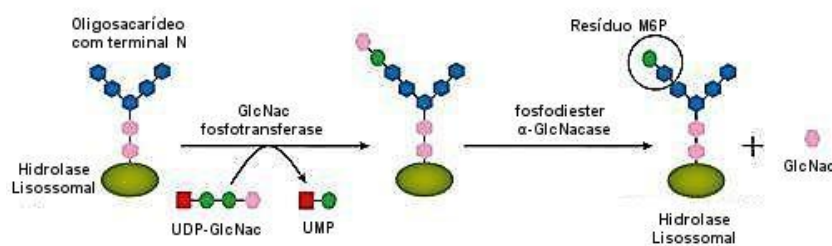


Figura 2 – Formação do marcador de reconhecimento manose-6-fosfato em enzimas lisossomais.
Adaptado de Kang, C, 2011¹⁴

Após a aquisição do resíduo M6P, as enzimas lisossomais são reconhecidas por receptores de M6P (MPR) que as endereçam para o lisossoma.

São conhecidos dois tipos de MPRs, os dependentes de catiões (CD-MPR) e os independentes de catiões (CI-MPR) (Figura 3). Estas duas glicoproteínas de membrana de tipo 1 estão localizadas maioritariamente no TGN onde ligam as proteínas lisossomais (com

motivo M6P) e transportam-nas para o lisossoma, apesar de também existirem em endossomas e na membrana plasmática.

As enzimas lisossomais depois de ligadas aos MPR no TGN são transportadas em vesículas para os endossomas com as quais se fundem e o pH ácido promove a dissociação do complexo enzima/MPR, sendo os MPRs reenviados para o TGN⁶.

Os MPRs que se encontram na membrana plasmática são responsáveis pela internalização de enzimas excretadas⁶.

No entanto sabe-se que nem todas as enzimas lisossomais adquirem resíduos de M6P sugerindo a existência de outros mecanismos de transporte alternativos. A existência destas enzimas independentes do transporte por MPR foi evidenciada em estudos com doentes com Mucopolidose II (MIM#252500). Nestes doentes, deficientes na enzima GlcNac-fosfotransferase, responsável pela primeira etapa da síntese do resíduo de M6P, todas as enzimas que requerem o resíduo M6P não são endereçadas para o lisossoma e são secretadas, verificando-se um aumento significativo da actividade enzimática destas no plasma e uma diminuição da actividade nas células. No entanto verificou-se que nem todas as enzimas lisossomais ou proteínas não-enzimáticas se apresentavam deficitárias em células destes doentes, como é o caso da GCCase¹⁵ e da Catepsina D¹⁶. Estudos complementares em células mutadas para os MPR ou deficientes na enzima GlcNac-fosfotransferase, confirmaram que a GCCase¹⁷ e a catepsina D¹⁷⁻¹⁹ não são afectadas pela desregulação da via de endereçamento por M6P e descreveram ainda a SAP¹⁷ como não sendo afectada, sugerindo que o endereçamento destas para o lisossoma deveria ser independente da via de M6P.

O transporte de enzimas lisossomais não dependente de MPRs é ainda pouco conhecido. No entanto, estudos realizados na última década demonstram que algumas proteínas da membrana lisossomal, como a LIMP-2 e a sortilina, são responsáveis pelo transporte de determinadas hidrolases^{1,12,13,20}.

A Sortilina (receptor da neurotensina 3) é uma glicoproteína transmembranar de tipo I que exhibe características estruturais semelhantes à Vps10p, receptor responsável pelo endereçamento da Carbopeptidase Y em bactéria, e foi descrita como sendo responsável pelo endereçamento da prosaposina (ProSap)²¹ (Figura 3), precursor das Saposinas, da esfingomiéline fosfodiesterase²² e da Catepsina D e H²³.

Recentemente, a LIMP-2, uma proteína transmembranar *N*-glicosilada do tipo III, foi descrita como sendo o transportador da GCCase por via independente dos MPRs (Figura 3)¹.

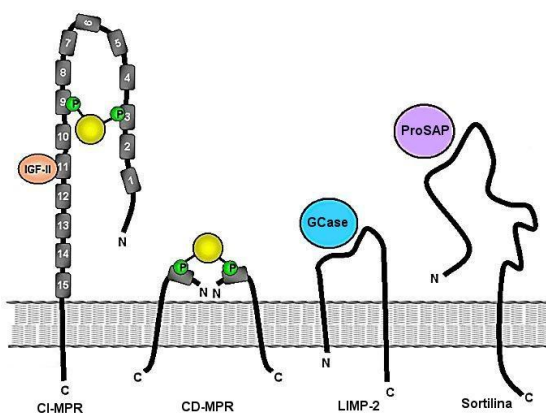


Figura 3 – Transportadores de enzimas lisossomais e proteínas activadoras para o lisossoma.

Adaptado de Braulk, T.; Bonifacino, J.S.; 2008²⁴

1.3. Lysosomal Integral Membrane Protein type 2

A Lysosomal Integral Membrane Protein type 2 (LIMP-2) é uma proteína transmembranar do tipo III altamente *N*-glicosilada, presente na membrana do lisossoma. É codificada pelo gene *SCARB2* (4q13-q21), sendo constituída por 478 aminoácidos (com peso molecular de 75 kDa), e pertence à família CD36 dos receptores *scavenger*^{25,26}. Apresenta zona C e N terminal citoplasmática, tendo dois domínios transmembranares e um loop lisossomal de 400 aminoácidos²⁵ com 10 locais de glicosilação no *N*-terminal no Homem e 11 no ratinho²⁷.

Como principal função da LIMP-2 destaca-se o endereçamento da GCCase para o lisossoma descrito em 2007 por Reczek e colaboradores¹. A interacção da GCCase com a LIMP-2 acontece cedo no processo de tráfego de enzimas lisossomais logo no RE^{2,7}. A estabilidade do complexo LIMP-2/GCCase está dependente do pH existente nos diferentes compartimentos intervenientes no processo de transporte de enzimas lisossomais. No RE o pH neutro de 7,2 proporciona a desprotonação da LIMP-2, nomeadamente da Histidina 171 (H171)²⁸, criando condições favoráveis à ligação da GCCase à zona luminal da LIMP-2 entre os aminoácidos 145-288²⁷. O complexo é translocado para o TGN e posteriormente para o lisossoma onde o pH ácido de 4,7 provoca a protonação da H171 e a consequente dissociação do complexo LIMP-2/GCCase libertando a GCCase para o lúmen lisossomal (Figura 4)²⁸.

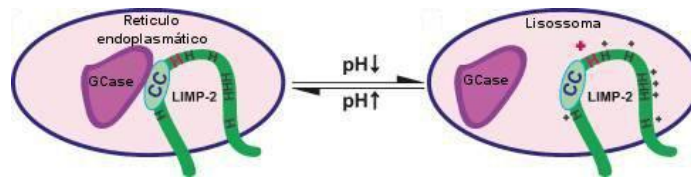


Figura 4 – Modelo da ligação mediada por sensor de pH da LIMP-2 à GCCase.
Adaptado de Zachos et al, 2012²⁸

Nos doentes com deficiência em LIMP-2, verifica-se uma actividade da GCCase normal nos leucócitos não se verificando acumulação da glucosilceramida (substrato da GCCase), não originando, por isso, as células de Gaucher. As células de Gaucher, características da Doença de Gaucher, são macrófagos cujo tamanho se encontra aumentado devido à acumulação de glucosilceramida nos lisossomas deficientes em GCCase²⁹. O facto da actividade da GCCase nos fibroblastos ser deficiente, sugere que o processo de transporte da GCCase para o lisossoma via LIMP-2 é específico do tipo celular.

Além do seu papel no processo de endereçamento da GCCase para o lisossoma, a LIMP-2 tem sido associada a outros processos que não apenas o tráfego de hidrólases e biogénese do lisossoma. Estudos recentes, associaram a LIMP-2 a processos de imunidade e fagocitose. Num estudo de 2011, Carrasco-Marin e colaboradores associaram a LIMP-2 aos eventos tardios de tráfego fagossomal, apresentando-a como uma das responsáveis pela activação de macrófagos durante a resposta imune inata contra *Listeria monocytogenes*³⁰.

Com base no referido estudo, a LIMP-2 participa em duas fases no processo de activação dos macrófagos por *Listeria monocytogenes* estando envolvida nos eventos da formação de fagossomas e consequente transformação em fagolisossomas, e controla a indução da fase aguda da produção de citocinas/quimiocinas pró-inflamatórias como MCP-1, IL-6 e TNF- α ³⁰.

A LIMP-2 foi também descrita como receptor do enterovirus 71 (EV71)^{31,32} responsável pela doença de mão-pé-e boca (*hand-foot-and mouth disease* – HFMD). A entrada do EV71 na célula acontece por endocitose dependente de clatrina e dinamina com acidificação progressiva dos endossomas³³. A LIMP-2 medeia esta entrada, estando o motivo de ligação ao EV71 mapeado entre os aminoácidos 144-151^{34,35}.

Para além do seu papel na biogénese e manutenção do lisossoma e na imunidade, a LIMP-2 foi descrita como receptor/interactor da Trombospodina 1³⁶, lipoproteína de alta densidade (HDL)^{37,38} e como parte integrante dos discos intercalares dos cardiomiócitos onde estará envolvida no processo de ligação da β -catenina à caderina³⁹.

2. Doenças lisossomais de sobrecarga

O papel crucial do lisossoma na homeostasia celular é evidenciado pela existência de aproximadamente 60 doenças hereditárias, que resultam na sua maioria, da deficiência de enzimas lisossomais. Existem, no entanto alguns casos nos quais a deficiência reside em proteínas lisossomais não-enzimáticas ou em proteínas não lisossomais envolvidas no processo de biogénese do lisossoma.

Independentemente do tipo de proteína que se encontra deficiente, todas estas doenças são caracterizadas pela acumulação de metabolitos não digeridos no lisossoma, designando-se por isso, doenças lisossomais de sobrecarga (DLS). Esta acumulação lisossomal activa uma variedade de cascatas patológicas que resultam em apresentações clínicas complexas com envolvimento multi-sistémico⁴⁰.

As DLS foram inicialmente classificadas com base no metabolito acumulado no lisossoma (tabela I), uma vez que o defeito molecular proteico não seria conhecido para estas doenças. Avanços no conhecimento da função e biogénese do lisossoma, permitiram uma nova classificação com base no tipo/função da proteína deficiente⁴¹ (Figura 5).

A maioria das DLS apresentam uma transmissão autossómica recessiva, com excepção da síndrome de Hunter (Mucopolissacaridose (MPS) II) e doença de Fabry com transmissão recessiva ligada ao cromossoma X e a doença de Danon que apresenta uma transmissão dominante ligada ao cromossoma X^{9,42}.

Embora consideradas doenças raras quando consideradas individualmente, em Portugal as DLS têm uma prevalência de 1/4000 nados vivos, o que representa o dobro da prevalência de outros países como a Austrália (1/7700)⁴³ e a Holanda (1/7143)⁴⁴. Ao analisar as diferentes classes de DLS, verifica-se que a prevalência de Mucopolissacaridoses (MPS) é de 4,8/100000 nados vivos e que a prevalência de esfingolipidoses é de 12,6/100000 nados vivos só no norte de Portugal, sendo a mais comum deste grupo a doença de Gaucher (1,4/100000)⁴⁵ na população portuguesa.

Tabela I – Doenças lisossomais de sobrecarga. Classificação segundo o tipo de substrato acumulado

Doença	Proteína deficiente	Principal material acumulado
Esfingolipidoses		
Fabry	α -Galactosidase A	Globotriaosilceramida (Gb3)
Lipogranulomatose de Farber	Ceramidase	Ceramida
Gaucher	β -Glucosidase	Glucosilceramida
	Activador da Saposina-C	
Niemann–Pick A e B	Esfingomielinase	Esfingomielinina
Gangliosidose GM1	β -Galactosidase	Gangliosido GM1
Gangliosidose GM2 (Tay–Sachs)	β -Hexosaminidase A	Gangliosido GM2 e glicolípidos
Gangliosidose GM2 (Sandhoff)	β -Hexosaminidase A and B	Gangliosido GM2 e glicolípidos
Gangliosidose GM2 (deficiencia do activador GM2)	Proteína activadora GM2	Gangliosido GM2 e glicolípidos
Mucopolisacaridoses (MPS)		
MPS I (Hurler, Scheie, Hurler/Scheie)	α -Iduronidase	Sulfato de Dermatano e Heparano
MPS II (Hunter)	Iduronato-2-sulfatase	Sulfato de Dermatano e Heparano
MPS IIIA (Sanfilippo)	Heparano N-sulfatase (sulfamidase)	Sulfato de Heparano
MPS IIIB (Sanfilippo)	N-Acetil- α -glucosaminidase	Sulfato de Heparano
MPS IIIC (Sanfilippo)	Acetil-CoA: α -glucosamida	Sulfato de Heparano
	N-acetiltransferase	
MPS IIID (Sanfilippo)	N-Acetilglucosamina-6-sulfatase	Sulfato de Heparano
Síndrome de Morquio-A	N-Acetilgalactosamina-6-sulfate-sulfatase	Sulfato Keratano, condroitina-6-sulfato
Síndrome de Morquio-B	β -Galactosidase	Sulfato de Keratano
MPS VI (Maroteaux–Lamy)	N-Acetilgalactosamina-4-sulfatase (arilsulfatase B)	Sulfato de Dermatano
MPS VII (Sly)	β -Glucuronidase	Sulfato de Dermatano, Sulf. de Heparano, condroitina-4- e -6-sulfato
Oligosacaridoses e glicoproteinoses		
Pompe (doença de acumulação de glicogénio tipo II)	α -Glucosidase	Glicogenio
Doenças causadas por defeitos em proteínas da membrana integral do lisossoma		
Cistinose	Cistinosina	Cistina
Doença de Danon	LAMP2	Detritos citoplasmáticos e glicogenio
Doença de acumulação de ácido sialico infantil e doença de Salla	Sialina	Ácido siálico
Mucopolipidose (ML) IV	Mucolipina-1	Lípidos e mucopolissacaridos ácidos
Niemann–Pick C (NPC)	NPC1 and 2	Colesterol e esfingolípidos
Outros		
Galactosialidose	Catepsina A	Siali-oligosacaridos
Mucopolipidose II (ML II e ML III, respectivamente)	UDP-N-acetilglucosamina:enzima lisossomal N-acetilglucosaminil-1-fosfotransferase	Oligossacarideos, mucopolissacarideos e lipidos
Ceroido-lipofuscinose neuronal	CLN1 (proteína palmitoilioesterase-1)	Tioésteres lipídicos
NCL1 (Doença de Batten)		
NCL2 (Doença de Batten)	CLN2 (tripeptidil amino peptidase-1)	Subunidade c da ATP sintetase mitocondrial
NCL3 (Doença de Batten)	Transportador da arginina	Subunidade c da ATP sintetase mitocondrial

Doenças Lisossomais de sobrecarga

Classificação pelo defeito molecular

Defeito na hidrolase lisossomal primária

Doença de Gaucher, def. β -Glucosidase
Gangliosidose GM1, def. β -Galactosidase
Doença de Tay-Sachs, def. β -Hexosaminidase A
Doença de Sandhoff, def. β -Hexosaminidase A and B
Doença de Fabry, def. α -Galactosidase A
Doença de Krabbe, def. β -galactosilceramidase
Niemann-Pick A e B, def. Esfingomielinase
Leucodistrofia metacromática, def. arilsulfatase A
MPS I (Hurler, Scheie, Hurler/Scheie), def. α -Iduronidase
MPS II (Hunter), def. Iduronato-2-sulfatase
MPS IIIA (Sanfilippo), def. Heparano N-sulfatase (sulfamidase)
MPS IIIB (Sanfilippo), def. N-Acetil- α -glucosaminidase
MPS IIIC (Sanfilippo), def. Acetil-CoA: α -glucosamida N-acetiltransferase
MPS IIID (Sanfilippo), def. N-Acetilglucosamina-6-sulfatase
Síndrome de Morquio-A, def. N-Acetilgalactosamina-6-sulfate-sulfatase
Síndrome de Morquio-B, def. β -Galactosidase
MPS VI (Maroteaux-Lamy), def. N-Acetilgalactosamina-4-sulfatase (arilsulfatase B)
MPS VII (Sly), def. β -Glucuronidase
MPS IX, def. Hialuronidase
Doença de Wolman, def. lipase
Doença de Farber, def. Ceramidase
Doença de Pompe, def. α -Glucosidase
Fucosidose, def. α -fucosidase
Sialidose, α -neuroaminidase

Defeito no processamento pós-translacional da enzima lisossomal

Mucosulfatidose, def. Sulfatases Multiplas

Defeito no tráfego da enzima lisossomal

Mucopolipidose tipo II (doença de I-cell), def N-acetilglucosaminil-1-fosfotransferase
Mucopolipidose tipo IIIA (Polidistrofia pseudo-Hurler, def N-acetilglucosaminil-1-fosfotransferase
Mucopolipidose tipo IIIC

Defeito na protecção da enzima lisossomal

Galactosialidose, def. Catepsina A (PPCA)

Defeito em proteínas lisossomais soluveis não enzimáticas

Niemann Pick tipo C, NPC2
Gangliosidose GM2 (deficiência do activador GM2), variante A8
Deficiência em SAP
Ceroido-lipofuscinose neuronal (NCL) CLN5

Defeito em proteínas transmembranares (não-enzimáticas)

Doença de Danon, def. LAMP2
Niemann-Pick C (NPC), def. NPC1 e 2
Cistinose, def. Cistinosina
Doença de acumulação de ácido sialico infantil, def. Sialina
Doença de Salla, def. Sialina
Ceroido-lipofuscinose neuronal (NCL) CLN6 e CLN 8
Mucopolissacaridose tipo IV, drf. Mucopolipina

Não classificadas

Ceroido-lipofuscinose neuronal (NCL) CLN4 e CLN 7

Figura 5 – Doenças lisossomais de sobrecarga. Classificação segundo a função da proteína afectada.
Adaptado de Platt F.M., Walkley S.U., 2004³⁸

Apesar de todo o conhecimento existente no campo das DLS, são várias as doenças ainda existentes sem causa conhecida. No entanto, recentemente tem-se vindo a verificar um crescendo nesta busca, o que justificou a nova nomenclatura de classes por função da proteína afectada (Figura 5). Em 2008, o nosso grupo, em simultâneo com outro grupo, identificou uma mutação no gene SCARB2, que codifica a LIMP-2, responsável pela AMRF². Posteriormente outras mutações foram descritas neste gene^{4,46-49} ligando definitivamente a AMRF, e mais abrangentemente a Epilepsia mioclónica progressiva do tipo 4 (EPM4), às DLS.

2.1. Epilepsia mioclónica progressiva do tipo 4

A Epilepsia mioclónica progressiva do tipo 4 (EPM4; MIM#254900), também designada por *Action Myoclonus Renal Failure* (AMRF) quando se verifica falência renal, é uma síndrome causada por mutações no gene SCARB2 que codifica a proteína lisossomal transmembranar, LIMP-2. De transmissão autossómica recessiva, a AMRF caracteriza-se por ser uma epilepsia mioclónica progressiva com falência renal, e sem alterações cognitivas⁵⁰.

2.1.1. Manifestações clínicas

2.1.1.1. Manifestações neurológicas

Esta síndrome foi pela primeira vez descrita em 1986 em quatro pacientes Franco-Canadianos da província do Québec por Andermann e colaboradores⁵¹. Esta doença manifesta-se na segunda e terceira década de vida e caracteriza-se pela presença de tremores que evoluem para epilepsia mioclónica, disartria e ataxia, atrofia cerebelosa mas sem comprometimento cognitivo. Em alguns casos, verifica-se acumulação de pigmento extraneuronal, em astrócitos ou no espaço extracelular^{50,52}. Apesar deste pigmento não ter sido caracterizado bioquimicamente, pelas suas características de coloração em microscopia, é apontado como lípido ou proteolípido oxidado, tipo lipofuscina. A diálise crónica aplicada a estes doentes é apontada como tendo um papel na formação do precipitado uma vez que contribui para o aumento da peroxidação lipídica^{26,27}.

2.1.1.2. Manifestações renais

Apesar da falência renal estar presente na maior parte dos doentes, foram descritos recentemente doentes com mutações no gene SCARB2 que não desenvolveram falência renal⁴⁶.

A disfunção renal é inicialmente detectada por proteinúria que evolui para falência renal, por glomerulopatia colapsante⁵⁰ ou nefropatia C1q, uma forma particular de glomerulonefrite³, acabando por exigir normalmente hemodiálise ou mesmo transplante renal.

2.1.2. Genética Molecular

Apesar de estudos genéticos apontarem para uma transmissão autossómica recessiva, a descoberta do gene/proteína causador desta doença só foi identificado 22 anos depois da primeira publicação da sintomatologia da doença, em dois estudos independentes simultâneos que associaram mutações no gene SCARB2 a esta síndrome^{2,4}.

Em 2008, Balreira e colaboradores, identificaram a mutação p.W178X no gene SCARB2 em duas pacientes portuguesas que apresentavam sintomatologia compatível com AMRF. O estudo bioquímico mostrou uma actividade normal da GCCase em leucócitos, mas uma severa redução da actividade desta enzima nos fibroblastos de pele. Estes dados sugeriam um comprometimento no processo de endereçamento da GCCase para o lisossoma, uma vez que a análise do gene GBA que codifica a GCCase não revelou qualquer alteração². Esta hipótese foi comprovada após a sequenciação do gene que codifica a LIMP-2, transportadora da GCCase para o lisossoma¹, no qual a existência de uma mutação *nonsense*, em homozigotia na base 533 resulta na substituição do aminoácido triptofano da posição 178, por um codão stop prematuro, que dá origem a uma proteína truncada com menos 300 aminoácidos, perdendo por isso o local de ligação à GCCase²⁷.

Recentemente, e após a publicação em 2008 dos estudos de Balreira e colaboradores e Berkovic e colaboradores, vários estudos têm descrito mutações no gene SCARB2, tanto em doentes com^{2,4,53} ou sem falência renal^{46,47}, num caso específico de AMRF com perda auditiva⁴⁸ e mesmo num doente de Gaucher (tabela II). Este doente apresenta uma variação fenotípica da doença de Gaucher, epilepsia mioclónica, que neste estudo se apresenta correlacionada com a mutação p.E471G no gene SCARB2 sendo este gene apontado como modificador da doença de Gaucher⁵⁴.

Tabela II - Mutações descritas no gene SCARB2.

Mutação	Origem	Notas	Referências
p.W178X	Portugal	AMRF	2
c.435-436insAG	Inglaterra	AMRF	4
c.1239+1G>T	Turquia-Chipre	AMRF	4
p.Q288X	Quebec	AMRF	4
c.1116-2A>C	Italia	EPM4	46
c.704+1G>C	Italia		
c.1258delG	Italia		
p.Y222X	Italia		
c.424-2A>C + p.H363N	Italia		
Q288X + c.1187+3insT	n.d.	EPM4	47
p.E471G	EUA	Doente Gaucher	54
p.H363N	Italia	AMRF	53
c.296delA	Inglaterra	AMRF	4
c.704+1 G>A	n.d.	AMRF com perda auditiva	48

Estudos recentes apontam para uma associação entre alterações no gene SCARB2 à doença de Parkinson^{55,56}, no entanto, muita controvérsia existe ainda sobre o assunto não sendo possível estabelecer uma correlação directa entre o gene e a doença.

II. Objectivos

A LIMP-2 é uma proteína integrante da membrana lisossomal responsável pelo endereçamento da GCase para o lisossoma. No entanto, este processo é específico do tipo celular.

Dado o envolvimento da LIMP-2 na EPM4, o conhecimento aprofundado da sua função na célula torna-se de grande importância na compreensão desta síndrome tanto a nível patológico como molecular.

No presente estudo, pretende-se identificar e estabelecer a estequiometria relativa do complexo LIMP-2/GCase em diferentes órgãos de ratinho e descrever novos interactores da LIMP-2 de forma a poder caracterizar a nível funcional esta proteína de grande importância para o normal funcionamento da célula eucariota.

III. Material e Métodos

3.1. Material Biológico

Neste trabalho foram usados ratinhos C57BL/6 (*Mus musculus*) e ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), do sexo masculino, com 12 e 9 semanas de idade respectivamente, colocados em dieta normal, água *ad libidum* e ciclos de luz de 12h. A colónia foi mantida no Instituto de Biologia Celular e Molecular (IBMC), Universidade do Porto (Porto, Portugal).

Os ratinhos foram eutanasiados por deslocamento cervical e os ratos, anestesiados com CO₂, por decapitação, com posterior recolha dos órgãos de interesse.

3.2. Preparação da Amostra

Os órgãos recolhidos de ratinho C57BL/6 (*Mus musculus*) foram homogeneizados a 600g com um homogeneizador RZR 2021 (Heidolph Instruments, Alemanha) em água destilada suplementada com cocktail de inibidores de proteases (CIP) 1:500 (v/v) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) tendo o homogeneizado total a concentração final de 100 mg tecido/400 μ L de solução de extração. As amostras foram sonicadas em gelo durante 14 segundos utilizando o sonicador Bandelin Sonoplus HD 2200 (BANDELIN electronic, Alemanha) equipado com um microtip e ajustado para 40% de pulso/segundo, *output* 10% (mínimo). Os extratos dos órgãos de ratinho homogeneizados em água destilada suplementada com CIP 1:500 (v/v) foram centrifugados a 16200g, durante 15 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram utilizados para quantificação da proteína total, determinação da actividade da GCase e das restantes enzimas lisossomais utilizadas como controlo, nomeadamente, Hexosaminidase total, Hexosaminidase A, α -Galactosidase A e β -Galactosidase e para electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes seguida de western blot para quantificação relativa da LIMP-2 por densitometria de bandas.

Os órgãos recolhidos de rato Wistar (*Rattus norvegicus*) foram homogenizados em SEM (0.25M Sacarose, 20 mM MOPS-KOH, pH 7.2 e 1 mM EDTA-NaOH, pH 8; 1:500 (v/v) PMSF; 1:500 (v/v) CIP) na proporção de 4 volumes de massa/volume de solução de extração sendo submetidos a centrifugações diferenciais para isolamento de fracções subcelulares.

3.3. Ensaio enzimáticos

A quantificação da proteína total foi efectuada através do método de Lowry⁵⁷, utilizando albumina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, St louis, MO, EUA) como padrão.

Para a determinação da actividade específica da enzima GCCase lisossomal seguiu-se o protocolo previamente descrito⁵⁸. Resumidamente, 25 μ L extrato de órgão, com concentração inicial de 2 mg/ml em 0,1% de triton X-100 (v/v) (Sigma-Aldrich, St louis, MO, EUA), foram incubados 30 minutos com 10 mM de Conduritol β Epoxido (CBE) (BioMol, NY, EUA) à temperatura ambiente com agitação ocasional, após a qual 10 μ g de amostra foram incubados durante 2 horas a 37°C com 10 mM de 4-metilumbeliferona- β -glucosido (Sigma-Aldrich, St louis, MO, EUA) como substrato em tampão 100mM citrato-200mM fosfato (pH 5.2) e 5mM taurocolato de sódio (Calbiochem, La Jolla, EUA). Após a incubação, a reacção foi parada com 1 mL de tampão 0.5M glicina/NaOH, pH 10. A fluorescência da 4-metilumbeliferona (4-MU) (Sigma-Aldrich, St louis, MO, EUA) foi medida a 445 nm num espectrómetro de fluorescência (Hitachi HTA, Ilinois, EUA) e a sua quantificação foi efectuada por comparação com fluorescências de 4-MU com concentrações conhecidas.

Para a determinação das restantes actividades enzimáticas, utilizadas como controlo, procedeu-se de forma semelhante, usando-se 10 μ g de proteína por ensaio sendo a diluição inicial feita em água desionizada à excepção da Hexosaminidase total na qual se procedeu a uma pré-diluição da amostra em BSA 100 μ g/ml sendo utilizadas 2,5 μ g de proteína no ensaio, e alterando-se os substratos utilizados, os tampões e os tempos de incubação. Assim, para a enzima Hexosaminidase total como substrato utilizou-se a 4-MU-2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucopiranosido (Sigma-Aldrich, St louis, MO, EUA) em tampão 50 mM citrato-100 mM fosfato (pH 4.4) durante 15 minutos a 37°C⁵⁹; para a Hexosaminidase A como substrato utilizou-se a 4-MU-6-sulfo-2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucopiranosido (Moscerdam TS, Oegstgeest, Holanda) 2 mM em tampão 100 mM citrato-200 mM fosfato (pH 4.0) durante 60 minutos a 37°C⁵⁹; para a β -Galactosidase como substrato utilizou-se a 4-MU- β -D-galactopiranosido (Sigma-Aldrich, St louis, MO, EUA) 1 mM com NaCl 100 mM em tampão 50 mM citrato-100 mM fosfato (pH 4.3) durante 30 minutos a 37°C⁶⁰; para a α -Galactosidase A como substrato utilizou-se a 4-MU- α -D-galactopiranosido (Glycosynth, Cheshire, Inglaterra) 5 mM em tampão 50 mM citrato-100 mM fosfato (pH 4.5) durante 60 minutos a 37°C⁶¹.

3.4. Electroforese em gel de poliacrilamida desnaturante

A quantificação da proteína nas amostras em estudo foi efectuada utilizando o método de Bradford⁶², utilizando imunoglobulinas bovinas como padrão.

Os extractos proteicos, a analisar em géis de poliacrilamida desnaturantes (SDS-PAGE), foram aquecidos em *Gel loading buffer* 1x (Tris/HCl 50mM pH8.8, EDTA/NaOH 2mM pH 8.8, SDS 2% (m/v), azul de bromofenol 0.017% (m/v), glicerol 10% (m/v)) suplementado com DTT 0.1M⁶³, 20 minutos a 65°C, 5 minutos a 90°C e, posteriormente, centrifugados durante 2 minutos a 15000g à temperatura ambiente.

A separação proteica realizou-se utilizando o sistema descontínuo de Laemmli⁶³. Para tal, utilizaram-se géis de 0.75 mm de espessura, constituídos por um gel de empacotamento de poliacrilamida 5% (acrilamida:bisacrilamida 75:1) em Tris/HCl 125mM pH 6.8 e SDS 0.1% (m/v) e um gel de separação de poliacrilamida de 12% (acrilamida:bisacrilamida 75:1) em Tris/HCl 750mM pH 8.8 e SDS 0.1% (m/v). Como tampão de electroforese foi utilizado Tris 0,025 M, glicina 0,25M e SDS 0.1% (m/v).

Após a electroforese, as amostras proteicas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Schleicher & Schuell) utilizando um sistema *semi-dry* (Scie-Plas, Cambridge, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante. A eficiência da transferência foi avaliada com recurso ao reagente de Ponceau S 1x (v/v) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Depois de descoradas, as membranas foram bloqueadas com 5% leite em pó magro (m/v) em TBS1x durante uma hora e incubadas durante a noite com o anticorpo policlonal anti-LIMP-2 produzido em coelho (Novus Biological, Littleton, EUA). Para a detecção do anticorpo primário, as membranas foram então lavadas duas vezes em 0.1% Tween-20 em TBS 1x e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho produzido em cabra, acoplado à fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), durante 1 hora à temperatura ambiente. A detecção foi realizada por reacção cromogénica, utilizando o substrato da fosfatase alcalina 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) e o oxidante nitroblue tetrazólio (NBT) (Bio-Rad, California, EUA) em *Alkaline phosphatase Buffer* (100 mM Tris/HCl pH 8,8, 150 mM NaCl; 5 mM MgCl₂) até desenvolvimento de cor. As membranas foram digitalizadas e a análise densitométrica das bandas foi efectuada utilizando o software *Image lab* (Bio-Rad, California, EUA).

3.5. Isolamento de fracções subcelulares

Para o fraccionamento subcelular, os órgãos de rato Wistar (*Rattus norvegicus*) homogenizados em SEM foram submetidos a centrifugações diferenciais de acordo com o protocolo descrito por Gouveia e colaboradores em 1999⁶⁴, com algumas alterações. Assim, o homogeneizado total foi submetido a uma centrifugação inicial de 10 minutos a 600g. O sobrenadante obtido (Sobrenadante Pós Nuclear - PNS), foi centrifugado 5 minutos a 2350g. Após esta centrifugação, o sobrenadante obtido foi centrifugado 20 minutos a 12300g, originando um precipitado rico em organelos, como peroxissomas, RE, Golgi, Lisossomas e Mitocôndrias menos densas. Todas as centrifugações foram efectuadas a 4°C no rotor SS-34 da centrífuga Sorvall RC-5B Plus e foram recolhidas alíquotas de todas a fracções, que foram congeladas em azoto líquido e armazenadas a -80°C. O processo de fraccionamento subcelular encontra-se esquematizado na figura 6.

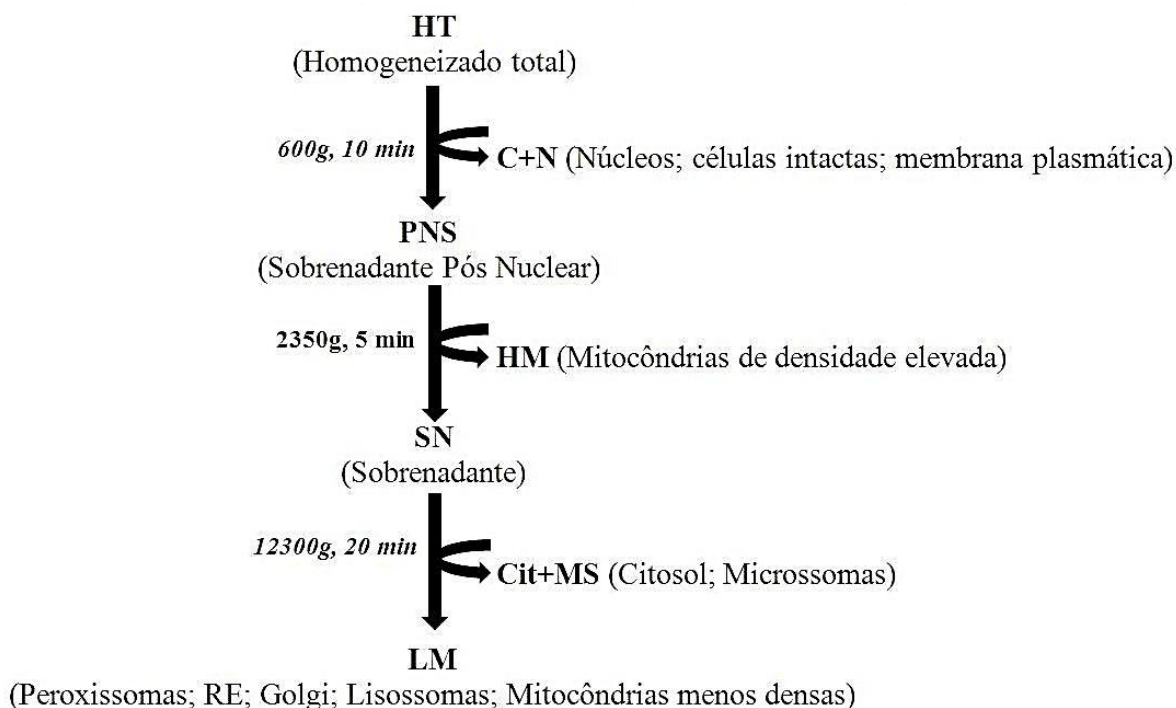


Figura 6 - Representação esquemática do fraccionamento subcelular.

3.6. Solubilização de proteína

De modo a solubilizar a LIMP-2, tendo em conta que é uma proteína integral da membrana do lisossoma, utilizaram-se dois detergentes: a digitonina (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) um detergente não iónico capaz de solubilizar proteínas membranares por destabilização da membrana lipídica, sendo capaz de interagir com o colesterol mas preservando interações proteína-proteína, e o triton X-100 (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), um surfactante não iónico capaz de se associar com a membrana levando à flexibilização e destabilização desta tornando solúveis as proteínas integrais da membrana na sua forma nativa, no entanto não preserva de forma efectiva interações proteína-proteína mais fracas.

Nas experiências de solubilização da LIMP-2, 5 mg da fracção organelar (LM) de cada órgão de rato, foram incubadas com tampão de solubilização com digitonina ou triton X-100 (50mM Tris-acetato pH 7,2; 0,1M acetato de potássio pH 7,2; 0,25M ácido 6-aminocapróico; 10% (m/v) glicerol; 1:500 (v/v) PMSF; 1:500 (v/v) CIP e 2,5% digitonina ou 1% triton X-100), num volume final de 1 mL, durante 30 minutos a 4°C, sob ligeira agitação⁶⁵. Após a incubação, a amostra foi centrifugada a 16200g, 20 minutos a 4°C. O material insolúvel foi removido e a fracção solúvel foi recolhida e analisada por electroforese em gel nativo e electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes e submetidos a Western blot para detecção específica da LIMP-2.

3.7. Electroforese em gel nativo de poliacrilamida

Na análise dos complexos proteicos em gel nativo de poliacrilamida, o equivalente a 100 μ g de proteína da fracção solúvel (ver Materiais e métodos – Solubilização de proteína) foram misturados com 10 μ l de tampão contendo 50 mM Tris/HCl pH 8,0 e 2 mM DTT. A mistura foi suplementada com 5% (m/v) de sacarose e azul de bromofenol 1x sendo carregada em gel nativo 7% (Acrilamida 7%/Bisacrilamida 0,09%; 0,236M Tris-HCl pH 8,48; 0,05% triton X-100).

Os tampões de electroforese continham, nos reservatórios do cátodo e do ânodo, 39,6 mM Tris-HCl pH 8,89 suplementada com 5 mM de β -mercaptoetanol ou 0,05% de triton X-100 e 63 mM Tris-HCl pH 7,47, respectivamente. A electroforese nativa realizou-se a 250 mA, durante 6 horas a 4°C⁶⁶. Para visualização das bandas/complexos, o gel foi transferido

para membrana de nitrocelulose e submetidos a Western Blotting (ver Material e Métodos - Electroforese em gel de poliacrilamida desnaturante).

3.8. Imunoprecipitação da LIMP-2

O equivalente a 5 mg de proteína da fracção organelar (LM) resultante do fraccionamento subcelular foi solubilizado como descrito acima (ver Materiais e métodos – Solubilização de proteína). A fracção solúvel foi incubada a 4°C durante 5h sob agitação com 7,5 mg de proteína A-sefarose (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) (previamente incubadas *overnight* a 4°C com agitação, com 20 μ l do anticorpo anti-LIMP-2 (Novus Biological, Littleton, EUA) ou com quantidade equivalente de soro de coelho (Rabbit serum Trim 37 pré-imune bleed)). Após a incubação, as beads foram lavadas 4 vezes com 300 μ L de tampão de solubilização e 1 vez com TBS 1x. As proteínas imunoprecipitadas, foram eluidas das beads com 60 μ L de *Gel loading Buffer* 2x suplementado com DTT 0,1 M, sendo submetidas a uma série de incubações: 37°C durante 5 minutos, 65°C durante 20 minutos e 95°C durante 15 minutos. A eficiência da imunoprecipitação foi avaliada por SDS-PAGE e Western blot com anticorpo específico anti-LIMP-2.

O equivalente a 3 mg e 4 mg de imunoprecipitado quando solubilizado com triton X-100 e digitonina, respectivamente, foi submetido a electroforese em gel de poliacrilamida 12%. Para visualização, os géis foram corados com Coomassie/TCA (Coomassie Brilliant R-250 0,05%; TCA 12,5%). Depois de descorados com TCA 10% (v/v) as bandas de interesse foram excisadas.

3.9. Identificação de proteína

A identificação de proteínas foi efectuada pela Unidade de Proteómica do Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP), por espectrometria de Ionização/dessorção a laser assistida por matriz (*Matrix-assisted laser desorption/ionization* – MALDI) com analisador por tempo-de-voo (*Time-of-flight* – TOF) usando o espectrómetro de massa 4700 MALDI TOF/TOF Proteomics Analyzer (Applied Biosystems).

Para a análise, as amostras são incubadas com tripsina modificada que cliva sequência específicas (Leucinas e Lisinas) de aminoácidos da proteína da amostra, gerando vários

peptidos que possuem pesos moleculares diferentes, que são, na sua maioria muitas vezes, exclusivos para uma determinada proteína. Estes péptidos constituem a impressão digital por massas peptídica (*Peptide mass fingerprint* - PMF) da proteína.

Os péptidos gerados são depois extraídos do gel e misturados com uma matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA). Esta solução de matriz/péptidos é colocado em placa e os péptidos analisados por MALDI com analisador por tempo-de-voo (*Time-of-flight* – TOF), com capacidade de reflector. Os iões são acelerados e ionizados por laser sendo separados pela sua razão massa/carga (m/z). Assim, iões com a mesma energia translacional inicial e diferente m/z demoram tempos diferentes para atravessar uma dada distância.

A identificação das proteínas é determinada por comparação da PMF da proteína desconhecida obtida, com o peso molecular teórico dos péptidos que são gerados por digestão matemática das proteínas inseridas nas bases de dados como NCBI⁶⁷ ou SwissProt/UniProt⁶⁸.

Como resultado temos uma lista de proteínas com base na sua probabilidade calculada. A identidade da proteína é verificada utilizando o seu ponto isoelectrico (pI), a massa molecular e a PMF obtida por comparação com as proteínas da base de dados.

3.10 Estatística

A estatística foi efectuada com recurso ao software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, EUA), com recurso ao método de Tukey.

IV. Resultados

Estequiometria relativa do complexo LIMP-2/ β -Glucocerebrosidase

A estequiometria relativa entre a proteína integral da membrana lisossomal, LIMP-2, e a hidrolase lisossomal, GCCase, em diferentes órgãos, estudou-se de modo a clarificar a dependência do tipo celular no endereçamento da GCCase para o lisossoma através da LIMP-2, um vez que, como já descrito na literatura, nos doentes com deficiência em LIMP-2, a actividade da GCCase é normal em leucócitos mas deficiente em fibroblastos².

Para podermos estabelecer a estequiometria relativa de LIMP-2/GCCase nos homogeneizados dos diferentes órgãos de ratinho (cérebro, coração, rim, fígado, pulmão, músculo, baço e testículo), a LIMP-2 foi quantificada por SDS-Page e WB, através da densitometria das bandas (Figura 7A). Em relação à GCCase, a sua quantificação foi aferida indirectamente recorrendo à determinação da actividade enzimática, devido à inexistência de um anticorpo capaz de reconhecer a GCCase de *Mus musculus/Rattus norvegicus* (Figura 7B).

A razão das quantidades de LIMP-2/GCCase varia com o órgão em análise (Figura 7C). Tendo em consideração que a estequiometria de formação do complexo LIMP-2/GCCase sugerida por Reczek e colaboradores, em 2007, é de 2:2 em células COS¹, as diferentes estequiometrias relativas observadas poderão resultar de três factores: 1) reciclagem da LIMP-2 para o RE ou complexo de Golgi; 2) *turnover* diferencial da LIMP-2 e GCCase ou 3) a LIMP-2 apresentar múltiplas funções na célula daí ser expressa em maior quantidade.

Considerando a hipótese de que a LIMP-2, à semelhança dos receptores M6P, após o endereçamento da GCCase para o lisossoma seja reciclada para o complexo de Golgi e até mesmo para o RE, podendo aí sequestrar GCCase sem ser sintetizada de novo.

Por outro lado, o grau de *turnover* destas proteínas poderá ser diferente consoante o órgão em questão. Ou seja, é possível que em determinados órgãos a taxa de proteólise verificada para a degradação da GCCase seja mais lenta do que noutros, quando assumindo uma igual taxa de degradação da LIMP-2. Por exemplo, o rim e o baço apresentam a mesma quantidade de LIMP-2 e uma grande diferença na actividade de GCCase (baço com actividade superior) (tabela III) o que sugere que a GCCase no baço é mais estável, tendo uma taxa de degradação inferior neste órgão. No entanto, uma diferença na estequiometria relativa das duas proteínas poderá indicar uma multiplicidade de funções da LIMP-2, que não apenas o endereçamento da GCCase para o lisossoma.

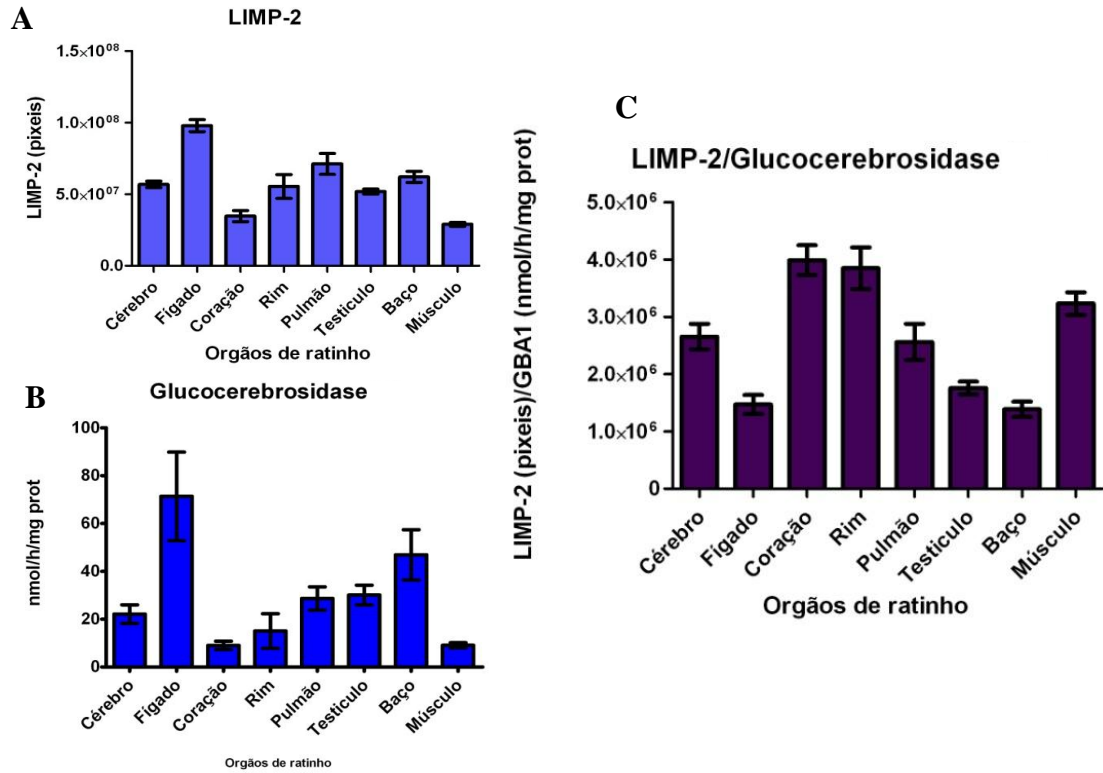


Figura 7 - Estequiometria relativa da LIMP-2 e GCase em diferentes órgãos de ratinho C57BL/6. (A) Quantificação relativa de LIMP-2 determinada através de densitometria de bandas obtidas por WB; (B) Actividade enzimática da GCase; (C) Razão da quantidade relativa de LIMP-2 pela actividade da GCase. Em ambas as determinações foram analisados órgãos de 8 animais.

Tabela III - Análise estatística da quantidade relativa de LIMP-2, actividade de GCase e estequiometria relativa LIMP-2/GCase em diferentes órgãos de *Mus musculus*. Análise estatística efectuada com o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, EUA), com recurso ao método de Tukey. Foram usados no estudo órgãos de 8 animais. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$; *** - $p < 0,0001$; ns – não significativo.

Órgãos	Significância ($p < 0,05$)		
	LIMP-2	Actividade GCase	LIMP-2/Act GCase
Cérebro vs Fígado	***	***	*
Cérebro vs Coração	ns	ns	**
Cérebro vs Rim	ns	ns	*
Cérebro vs Pulmão	ns	ns	ns
Cérebro vs Testículo	ns	ns	ns
Cérebro vs Baço	ns	***	**
Cérebro vs Músculo	**	ns	ns
Fígado vs Coração	***	***	***
Fígado vs Rim	***	***	***
Fígado vs Pulmão	**	***	*
Fígado vs Testículo	***	***	ns
Fígado vs Baço	***	***	ns
Fígado vs Músculo	***	***	***
Coração vs Rim	ns	ns	ns
Coração vs Pulmão	***	***	**
Coração vs Testículo	ns	***	***
Coração vs Baço	**	***	***
Coração vs Músculo	ns	ns	ns
Rim vs Pulmão	ns	*	**
Rim vs Testículo	ns	*	***
Rim vs Baço	ns	***	***
Rim vs Músculo	**	ns	ns
Pulmão vs Testículo	ns	ns	ns
Pulmão vs Baço	ns	**	*
Pulmão vs Músculo	***	***	ns
Testículo vs Baço	ns	**	ns
Testículo vs Músculo	*	***	***
Baço vs Músculo	***	***	***

Distribuição da LIMP-2 nas diferentes fracções organelares

De forma a comprovar a possível existência de outras funções da LIMP-2 na célula, procedemos ao isolamento de fracções organelares para posterior imunoprecipitação dos complexos nos quais a LIMP-2 participa.

Uma vez que o testículo e baço são aqueles que apresentam maior quantidade de LIMP-2 (após normalização por quantidade de GAPDH na amostra) serão os usados neste estudo.

Inicialmente, analisamos o enriquecimento em LIMP-2 das fracções obtidas por fracionamento subcelular de testículo e baço de *Rattus norvegicus*.

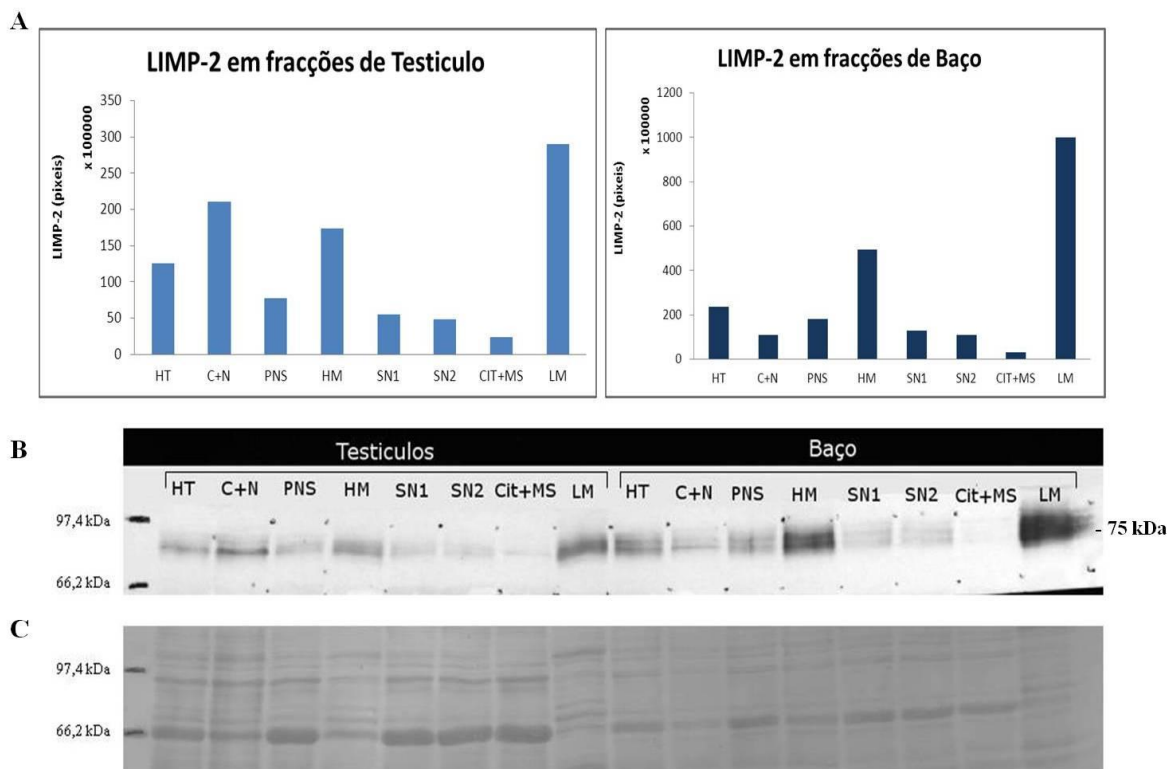


Figura 8 - Quantidades relativas de LIMP-2 em fracções subcelulares de testículo e baço de *Rattus norvegicus*. (A) Quantidades relativas de LIMP-2 em 100 μ g de proteína de cada fracção obtida. (B) Após obtenção dos homogeneizados totais por fracionamento subcelular, o equivalente a 100 μ g de cada fracção de testículo e baço de *Rattus norvegicus* foram analisados por SDS-PAGE/WB com anticorpo Anti-LIMP-2; banda específica da LIMP-2 (75 kDa). (C) Ponceau relativo ao WB obtido para avaliação da quantidade de proteína em gel. Os números à esquerda representam a massa molecular de proteínas standard.

A LIMP-2 está enriquecida na fracção organelar (LM) tanto de testículos como de baço (Figura 8), sendo por isso esta a fracção usada nas fases posteriores deste trabalho.

Condições de solubilização da LIMP-2

Sendo a LIMP-2 uma proteína transmembranar, presente na membrana dos lisossomas, a necessidade de solubilização desta proteína torna-se imperativa. Assim, foram várias as condições testadas de modo a permitir obter a maior quantidade possível de LIMP-2 na fracção solúvel. Testamos nomeadamente: diferentes detergentes e diferentes percentagens de detergente; diferentes quantidades de proteína inicial e diferentes centrifugações. No entanto, tendo como objectivo a obtenção de complexos formados por esta proteína em contexto celular, foi necessário testar o uso de dois tipos de detergentes de forma a preservar interações proteína-proteína.

Para isso procedeu-se ao uso de digitonina, detergente não iónico capaz de solubilizar proteínas membranares por destabilização da membrana lipídica mas com capacidade de preservação de interações proteína-proteína, e de triton X-100, um surfactante não iónico que por associação com a membrana leva à flexibilização e destabilização desta tornando solúveis as proteínas integrais na sua forma nativa, no entanto não preserva de forma efectiva interações proteína-proteína mais fracas.

De forma a obter a maior quantidade de LIMP-2 solúvel possível procedeu-se à optimização das condições de solubilização usando diferentes concentrações de proteína (Figura 9 – 12) e percentagens de agente de solubilização (Figura13 – 15).

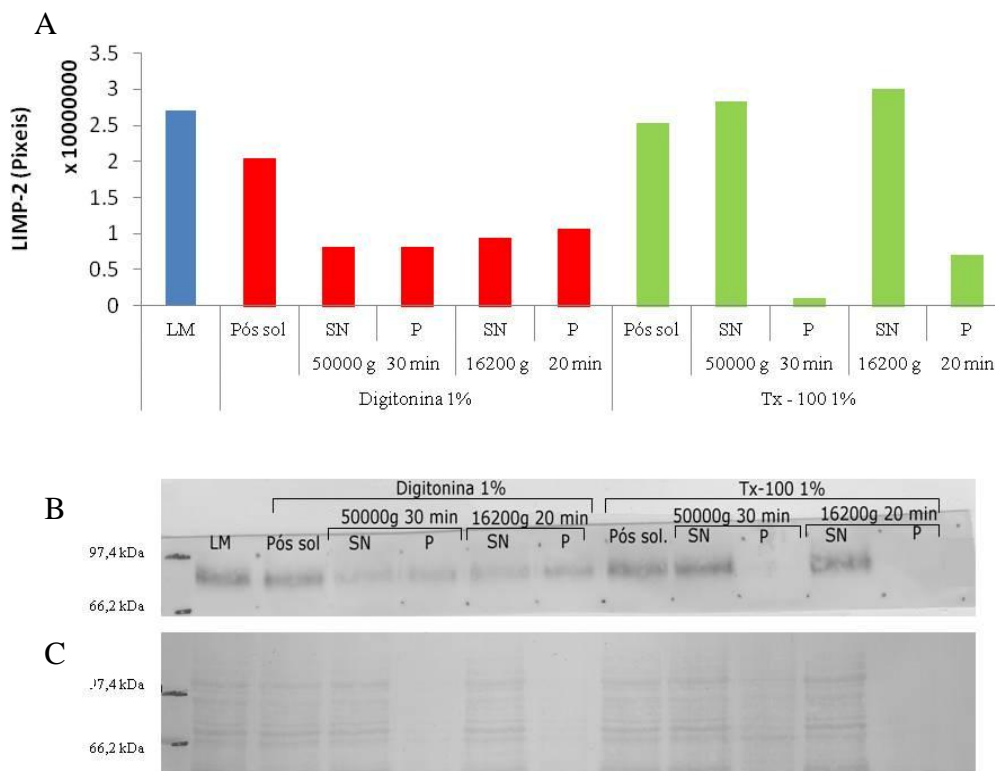


Figura 9 - Solubilização da LIMP-2 com digitonina 1% e triton X-100 (Tx-100) 1% aplicado a uma concentração de 5 mg/ml de proteína total de fracção organelar de Testículos de *Rattus norvegicus*. (A) Quantidades relativas de LIMP-2 para 100 μ g de proteína. (B) Após solubilização da fracção organelar (LM) com digitonina 1% ou triton X-100 o equivalente a 100 μ g de fracção organelar (LM), da solução após solubilização (Pós sol), do sobrenadante contendo as proteínas soluveis (SN) e do Pellet contendo as proteínas não soluveis (P) de testículo de *Rattus norvegicus* foram analisados por SDS-PAGE/WB com anticorpo Anti-LIMP-2; banda específica da LIMP-2 (75 kDa). (C) Ponceau relativo ao WB obtido para avaliação da quantidade de proteína em gel. Os números à esquerda representam a massa molecular de proteínas standard.

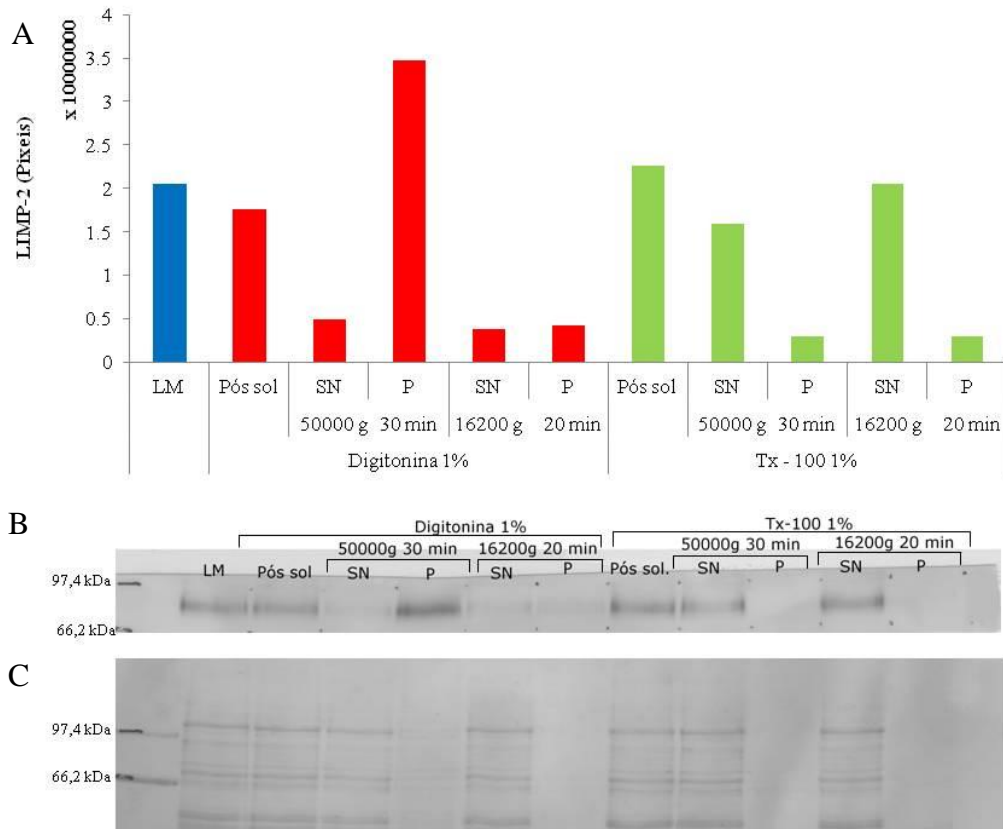


Figura 10 - Solubilização da LIMP-2 com digitonina 1% e triton X-100 (Tx-100) 1% aplicado a uma concentração de 10 mg/ml de proteína total de fracção organelar de Testiculos de *Rattus norvegicus*. (A) Quantidades relativas de LIMP-2 para 100 μ g de proteína. (B) Após solubilização da fracção organelar (LM) com digitonina 1% ou triton X-100 o equivalente a 100 μ g de fracção organelar (LM), da solução após solubilização (Pós sol), do sobrenadante contendo as proteínas soluveis (SN) e do Pellet contendo as proteínas não soluveis (P) de testículo de *Rattus norvegicus* foram analisados por SDS-PAGE/WB com anticorpo Anti-LIMP-2; banda específica da LIMP-2 (75 kDa). (C) Ponceau relativo ao WB obtido para avaliação da quantidade de proteína em gel. Os números à esquerda representam a massa molecular de proteínas standard.

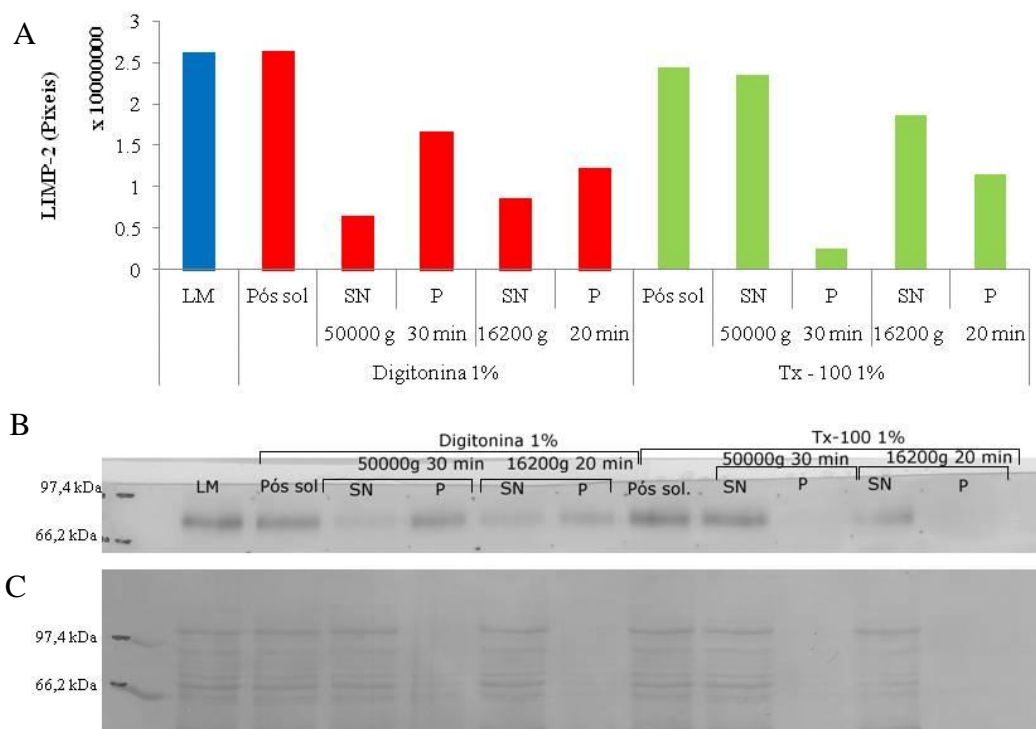


Figura 11 - Solubilização da LIMP-2 com digitonina 1% e triton X-100 (Tx-100) 1% aplicado a uma concentração de 15 mg/ml de proteína total de fracção organelar de Testiculos de *Rattus norvegicus*. (A) Quantidades relativas de LIMP-2 para 100 μ g de proteína. (B) Após solubilização da fracção organelar (LM) com digitonina 1% ou triton X-100 o equivalente a 100 μ g de fracção organelar (LM), da solução após solubilização (Pós sol), do sobrenadante contendo as proteínas soluveis (SN) e do Pellet contendo as proteínas não soluveis (P) de testículo de *Rattus norvegicus* foram analisados por SDS-PAGE/WB com anticorpo Anti-LIMP-2; banda específica da LIMP-2 (75 kDa). (C) Ponceau relativo ao WB obtido para avaliação da quantidade de proteína em gel. Os números à esquerda representam a massa molecular de proteínas standard

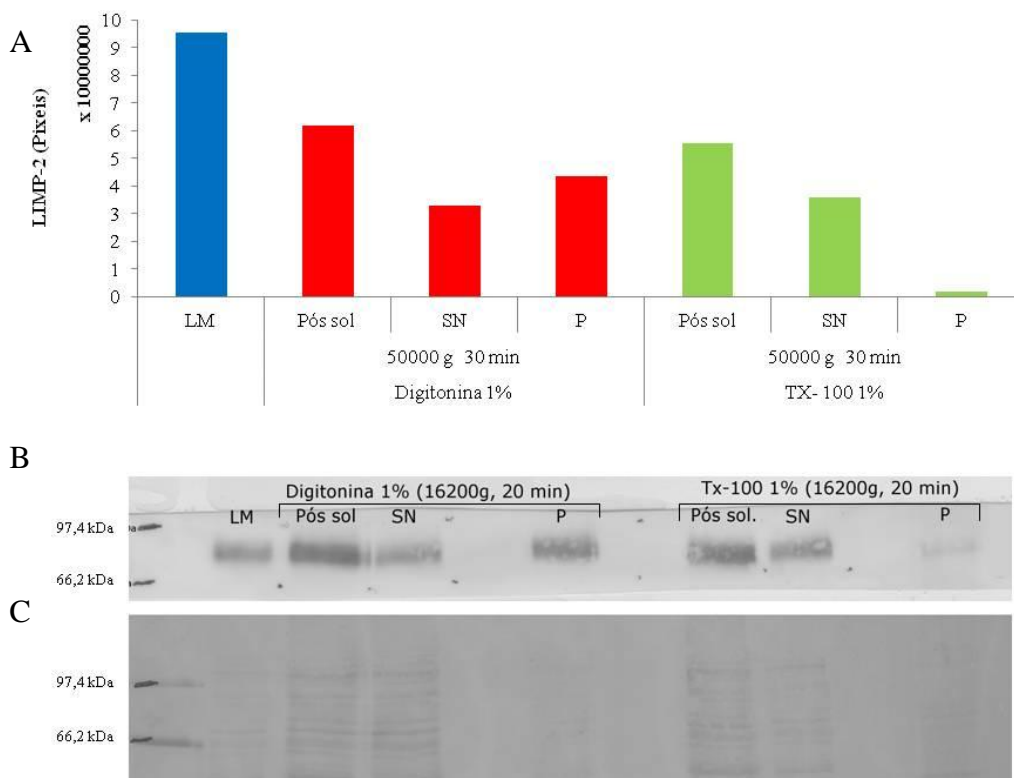


Figura 12 - Solubilização da LIMP-2 com digitonina 1% e triton X-100 (Tx-100) 1% aplicado a uma concentração de 5 mg/ml de proteína total de fracção organelar de Baço de *Rattus norvegicus*. (A) Quantidades relativas de LIMP-2 corrigidas para 100 μ g de proteína. (B) Após solubilização da fracção organelar (LM) com digitonina 1% ou triton X-100 o equivalente a 33,3 μ g de fracção organelar (LM), 100 μ g da solução após solubilização (Pós sol), do sobrenadante contendo as proteínas soluveis (SN) e do Pellet contendo as proteínas não soluveis (P), quando usada a digitonina, e 300 μ g do Pellet contendo as proteínas não soluveis (P), quando usado o Tx-100, de baço de *Rattus norvegicus* foram analisados por SDS-PAGE/WB com anticorpo Anti-LIMP-2; banda específica da LIMP-2 (75 kDa). (C) Ponceau relativo ao WB obtido para avaliação da quantidade de proteína em gel. Os números à esquerda representam a massa molecular de proteínas standard

A concentração de proteína inicial que torna o processo de solubilização mais vantajoso é o de 5 mg/ml (Figura 9), que permite solubilizar cerca de 45% de proteína da amostra quando era usada a digitonina como agente de solubilização e virtualmente a totalidade de LIMP-2 era solubilizada quando usado o triton X-100 (Tabela IV).

O mesmo estudo foi realizado com a fracção organelar de baço com a mesma quantidade de proteína (Figura 12). No entanto, e apesar de em comparação com o testículo a fracção organelar ter uma concentração maior de LIMP-2, a quantidade de proteína recolhida após fracionamento subcelular deste órgão é muito baixa, o que nos levou a optar pelo testículo para efectuarmos os restantes ensaios.

Com o aumento da concentração de proteína, para 10 mg/ml (Figura 10) e 15 mg/ml (Figura 11), verificamos uma diminuição de LIMP-2 solubilizada (Tabela IV) o que demonstra que o aumento de concentração da amostra não favorece o processo de solubilização.

Tabela IV - Percentagem de LIMP-2 solubilizada com digitonina 1% e triton X-100 1%. n.d. – não determinado.

		Testículos			Baço
		5 mg/ml	10 mg/ml	15 mg/ml	5 mg/ml
digitonina 1%	50000g, 30 min	40%	28%	24%	n.d.
	16200g, 20 min	46%	21%	33%	53%
Triton X - 100 1%	50000g, 30 min	100%	71%	96%	n.d.
	16200g, 20 min	100%	91%	76%	89%

Durante o processo de otimização de quantidade de proteína a usar, foi também avaliado o critério de proteína solubilizada, sendo a quantidade de proteína solubilizada avaliada com base na quantidade relativa de LIMP-2 na fracção solúvel. Para obtenção desta fracção recorreu-se a dois tipos de centrifugação, 50000 g durante 30 minutos que é a centrifugação já descrita em outros estudos, ou 16200 g durante 20 min que eliminaria a necessidade do uso de ultracentrifugação que será um passo sensível neste estudo uma vez que os volumes de trabalho são muito reduzidos.

Dado que não se observaram grandes diferenças entre estes dois tipos de centrifugação (Figura 9 – 11 e Tabela IV), e tendo em consideração que a ultracentrifugação a 50000 g, envolveria não só um maior dispêndio de tempo como também a transferência da amostra para tubos específicos o que poderia resultar em perda de amostra, decidimos utilizar a centrifugação a 16200 g nas experiências seguintes.

A percentagem de digitonina a usar foi também avaliada de forma a tentar aumentar a eficiência de solubilização da membrana.

Aplicando os critérios anteriormente otimizados, a solubilização da LIMP-2 com recurso a 2,5% de digitonina foi aplicada a fracções organelares de três órgãos: testículo (Figura 13), baço (Figura 14) e fígado (Figura 15).

Será importante referir que na solubilização realizada à fracção organelar de testículo possa ter havido uma perda de proteína no processo de solubilização com digitonina, uma vez que a quantidade de LIMP-2 pós-solubilização (Pós Sol.) se encontra bastante deficitária em relação à quantidade inicial (LM) (Figura 13).

Apesar do aumento da concentração de digitonina, não se verificou um aumento da percentagem de LIMP-2 solúvel (Tabela V), mostrando que neste processo o surfactante não é

um reagente limitante. Ainda assim optamos por usarmos esta concentração de digitonina em todo o processo posterior.

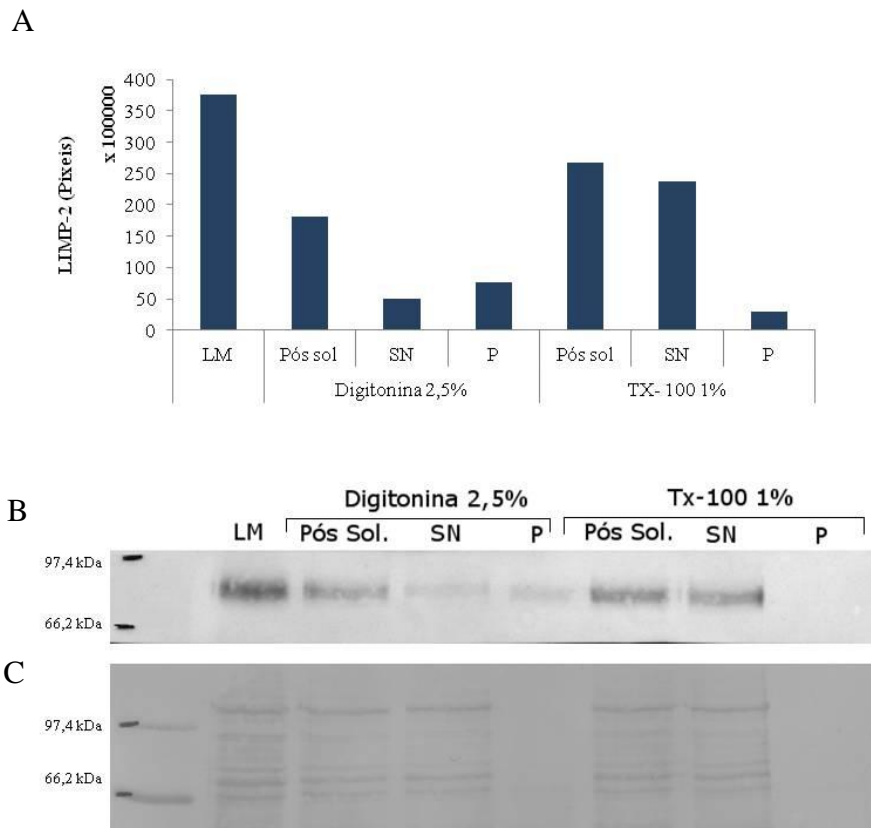


Figura 13 - Solubilização da LIMP-2 com digitonina 2,5% e triton X-100 (Tx-100) 1% aplicado a uma concentração de 5 mg/ml de proteína total de fração organelar de testículos de *Rattus norvegicus*. (A) Quantidades relativas de LIMP-2 para 100 μ g de proteína. (B) Após solubilização da fração organelar (LM) com digitonina 2,5% ou triton X-100 o equivalente a 100 μ g de fração organelar (LM), da solução após solubilização (Pós sol), do sobrenadante contendo as proteínas soluveis (SN) e do Pellet contendo as proteínas não soluveis (P) de testículo de *Rattus norvegicus* foram analisados por SDS-PAGE/WB com anticorpo Anti-LIMP-2; banda específica da LIMP-2 (75 kDa). (C) Ponceau relativo ao WB obtido para avaliação da quantidade de proteína em gel. Os números à esquerda representam a massa molecular de proteínas standard

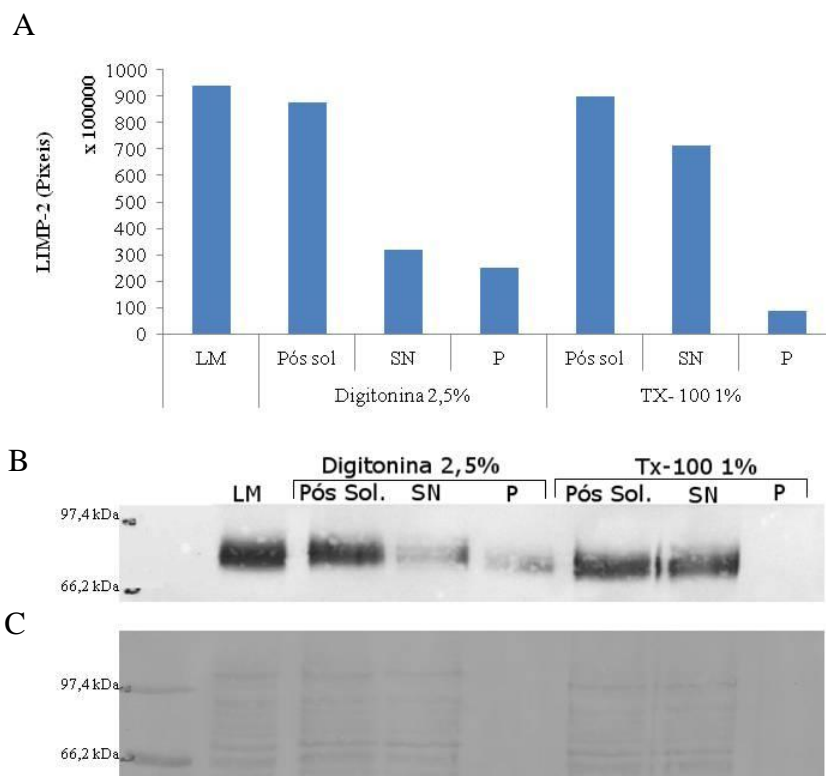


Figura 14 - Solubilização da LIMP-2 com digitonina 2,5% e triton X-100 (Tx-100) 1% aplicado a uma concentração de 5 mg/ml de proteína total de fração organelar de Baço de *Rattus norvegicus*. (A) Quantidades relativas de LIMP-2 para 100 μ g de proteína. (B) Após solubilização da fração organelar (LM) com digitonina 2,5% ou triton X-100 o equivalente a 100 μ g de fração organelar (LM), da solução após solubilização (Pós sol), do sobrenadante contendo as proteínas soluveis (SN) e do Pellet contendo as proteínas não soluveis (P) de baço de *Rattus norvegicus* foram analisados por SDS-PAGE/WB com anticorpo Anti-LIMP-2; banda específica da LIMP-2 (75 kDa). (C) Ponceau relativo ao WB obtido para avaliação da quantidade de proteína em gel. Os números à esquerda representam a massa molecular de proteínas standard.

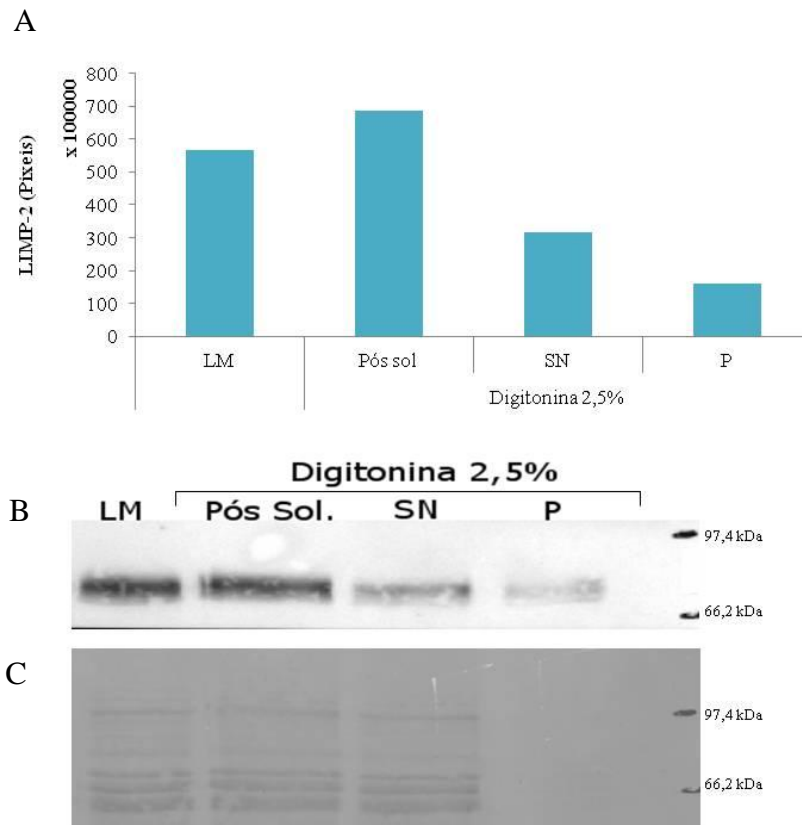


Figura 15 - Solubilização da LIMP-2 com digitonina 2,5% aplicado a uma concentração de 5 mg/ml de proteína total de fracção organelar de Fígado de *Rattus norvegicus*. (A) Quantidades relativas de LIMP-2 para 100 μ g de proteína. (B) Após solubilização da fracção organelar (LM) com digitonina 2,5% o equivalente a 100 μ g de fracção organelar (LM), da solução após solubilização (Pós sol), do sobrenadante contendo as proteínas soluveis (SN) e do Pellet contendo as proteínas não soluveis (P) de fígado de *Rattus norvegicus* foram analisados por SDS-PAGE/WB com anticorpo Anti-LIMP-2; banda específica da LIMP-2 (75 kDa). (C) Ponceau relativo ao WB obtido para avaliação da quantidade de proteína em gel. Os números à direita representam a massa molecular de proteínas standard

Tabela V - Percentagem de LIMP-2 solubilizada com digitonina 2,5% e triton X-100 1%. n.d. – não determinado.

	Testículos	Baço	Fígado
Digitonina 2,5%	28%	36%	46%
Triton X - 100 1%	89%	79%	n.d.

Avaliação dos complexos formados pela LIMP-2

Com a avaliação de complexos formados pela LIMP-2 em diferentes órgãos pretendemos identificar/descobrir possíveis funções desta na célula. Com esse objectivo, procedemos ao estudo do comportamento da LIMP-2 em gel nativo, com posterior marcação específica da LIMP-2 por *Immunoblotting*.

Aparentemente, o comportamento da LIMP-2 não se altera quando a solubilização é levada a cabo com triton X-100 ou com digitonina (Figura 16). No entanto, tendo em consideração que apenas 40% da LIMP-2 é solubilizada, quando usada a digitonina, pode acontecer que apenas se detecte em gel o complexo dominante e que as pequenas quantidades dos outros complexos não permitam a sua visualização por método colorimétrico. No entanto, no gel nativo foi incorporada uma quantidade, ainda que diminuta, de triton X-100 para facilitar a entrada da amostra no gel, podendo, por isso, também ter dissolvido outros complexos eventualmente mais fracos.

A forte limitação desta experiência prendeu-se com o facto de não nos permitir saber se as bandas visualizadas correspondem à LIMP-2 na sua forma nativa apenas ou em complexo com a GCCase ou ainda outra proteína. Esta limitação poderia ser ultrapassada se desenvolvêssemos uma forma recombinante da LIMP-2 de rato que pudesse ser analisada em simultâneo com as nossas amostras, sendo assim possível avaliar se se trataria apenas da forma nativa da LIMP-2 em gel, bem como o desenvolvimento de um anticorpo que reconhecesse especificamente a GCCase de rato podendo assim avaliar se o complexo seria de LIMP-2/GCCase, uma vez que este produto não está disponível comercialmente.

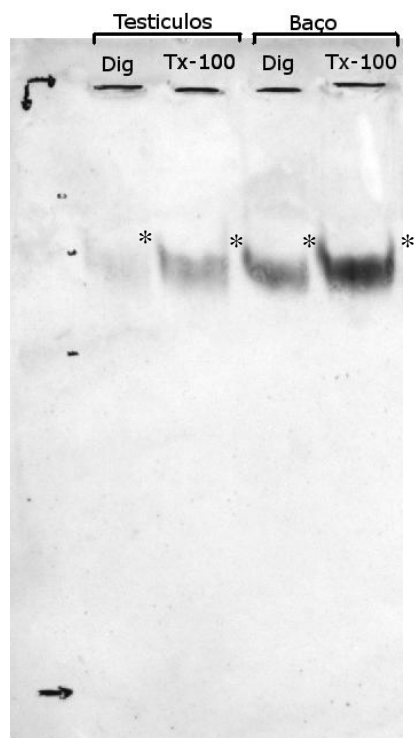


Figura 16 - Comportamento da LIMP-2 em gel nativo. Após solubilização da fracção organelar (LM) com digitonina 2,5% ou triton X-100 o equivalente a 50 μ g da fracção que contém as proteínas solubilizadas de testículo e baço de *Rattus norvegicus* foi analisada em gel nativo e por WB com anticorpo anti-LIMP-2; * banda específica da LIMP-2 ou de algum complexo que contenha a LIMP-2.

Imunoprecipitação da LIMP-2

Dada a importância da identificação dos complexos proteicos formados pela LIMP-2 e às dificuldades com que nos deparamos com a análise dos géis nativos, decidimos optar por uma abordagem alternativa - a imunoprecipitação da LIMP-2. Deste modo, após a solubilização de fracções organelares de testículo procedemos à imunoprecipitação com um anticorpo específico em condições que permitissem que os complexos formados não fossem dissolvidos.

A análise da imunoprecipitação da LIMP-2, após solubilização com triton X-100 (Figura 17A) evidencia que apesar da solubilização ser bastante satisfatório, de 99,4%, apenas 20,4% da LIMP-2 é recuperada após imunoprecipitação (Figura 17B).

Quando temos em conta a imunoprecipitação, após solubilização da LIMP-2 com digitonina (Figura 18A) vemos que o cenário é um pouco pior uma vez que apenas aproximadamente 60% da proteína foi solubilizada, sendo que 18,7% da LIMP-2 é recuperada (Figura 18B).

O equivalente a 3 mg e 4 mg do imunoprecipitado, solubilizado com triton X-100 e digitonina, respectivamente, foi aplicado em gel SDS-Page para posterior excisão de bandas e identificação das proteínas presentes na amostra.

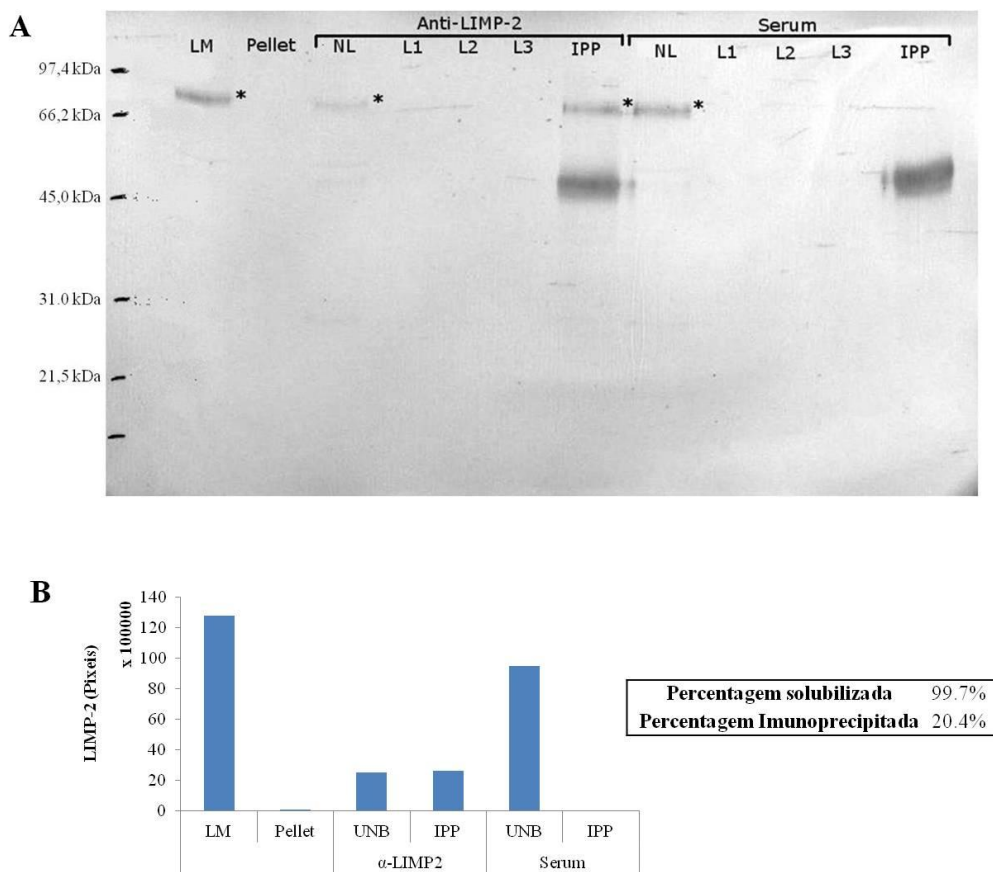


Figura 17 - Imunoprecipitação da LIMP-2 após solubilização da LIMP-2 com triton X-100 1%. (A) Após imunoprecipitação com anticorpo específico anti-LIMP-2 ou com soro de coelho, o equivalente a 100 μ g da fracção organelar enriquecida (LM) de testículo de *Rattus norvegicus*, 150 μ g do pellet, fracção não ligada (NL), Lavagens 1 a 3 (L1 – L3) e 450 μ g de imunoprecipitado (IPP) foram analisados por SDS-PAGE/WB com anticorpo Anti-LIMP-2; * banda específica da LIMP-2 (75 kDa). Os números à esquerda representam a massa molecular de proteínas standard. (B) Quantidades relativas de LIMP-2 corrigidas para 100 μ g de proteína e percentagens de LIMP-2 solubilizada e imunoprecipitada.

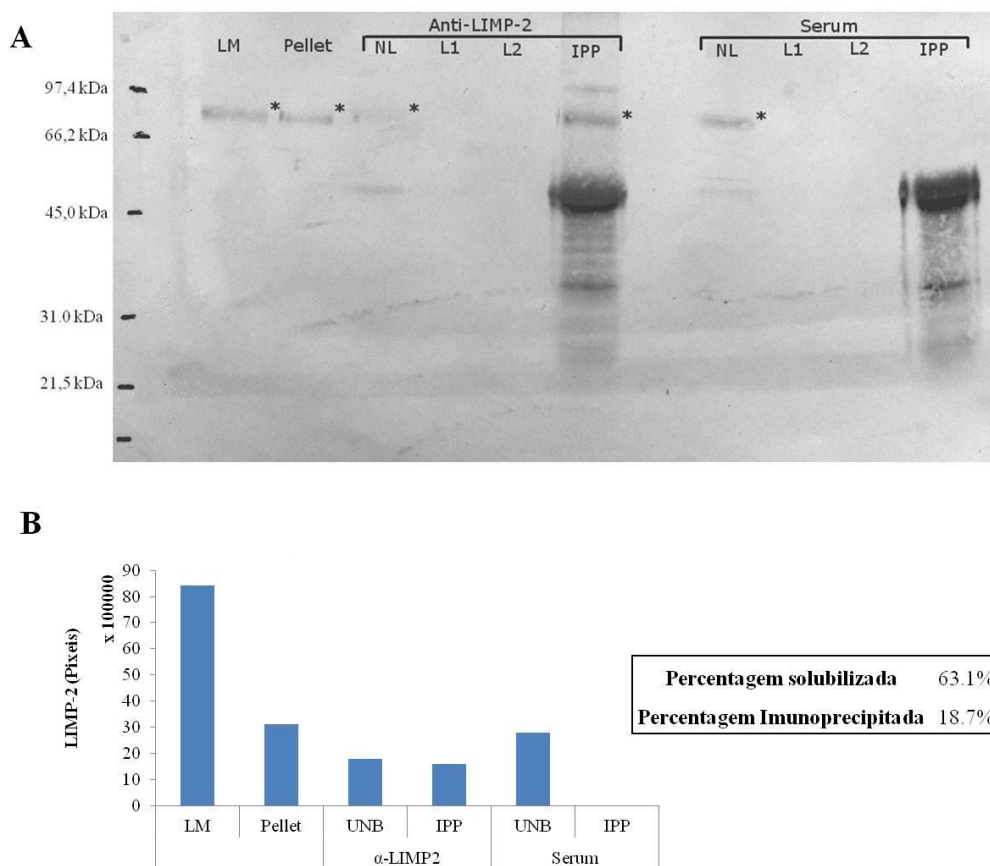


Figura 18 - Imunoprecipitação da LIMP-2 após solubilização da LIMP-2 com digitonina 2.5%. (A) Após imunoprecipitação com anticorpo específico anti-LIMP-2 ou com soro de coelho, o equivalente a 100 μ g da fracção organelar enriquecida (LM) de testículo de *Rattus norvegicus*, 200 μ g do pellet, fracção não ligada (NL), Lavagens 1 e 2 (L1 – L2) e 600 μ g de imunoprecipitado (IPP) foram analisados por SDS-PAGE/WB com anticorpo Anti-LIMP-2; * banda específica da LIMP-2 (75 kDa). Os números à esquerda representam a massa molecular de proteínas standard. **(B)** Quantidades relativas de LIMP-2 corrigidas para 100 μ g de proteína e percentagens de LIMP-2 solubilizada e imunoprecipitada.

Análise das proteínas que co-precipitam com a LIMP-2

A amostra imunoprecipitada com o anticorpo específico anti-LIMP-2 ou soro de coelho, após análise por SDS-Page apresenta um perfil proteico diferente consoante o detergente utilizado na solubilização da LIMP-2. Nas figuras 19 e 20, apresentam-se os perfis proteicos em gel SDS-PAGE corado com coomassie/TCA, dos imunoprecipitados quando a solubilização foi efectuada com recurso a triton X-100 ou digitonina, respectivamente.

Foram excisadas para identificação das proteínas por espectroscopia de massa (MALDI-TOF) todas as bandas detectadas exclusivamente no imunoprecipitado com anticorpo específico anti-LIMP-2, em ambos os geis.

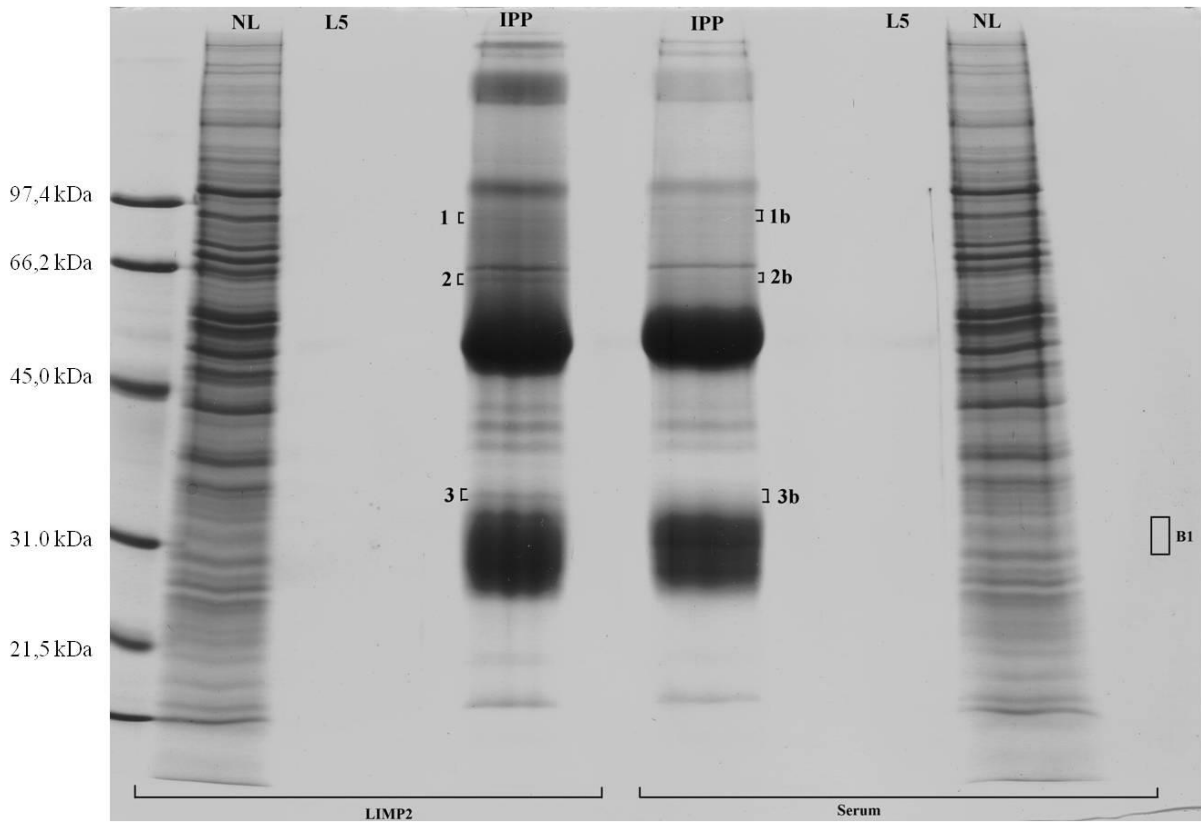


Figura 19 - Perfil proteico do imunoprecipitado com anticorpo anti-LIMP-2, após solubilização da LIMP-2 com triton X-100 1%. A fracção organelar enriquecida de testículo de *Rattus norvegicus*, imunoprecipitada com anti-LIMP-2 após solubilização da LIMP-2 com triton X-100 1% (IPP), foi avaliada por SDS-PAGE e corado com Coomassie/TCA. Foi aplicado em gel o equivalente a 3 mg de proteína total do imunoprecipitado (IPP), e 150 μ g do não ligado (NL) e da lavagem 5 (L5). As bandas assinaladas com números no gel foram excisadas para identificação de proteínas presentes na amostra. Os números à esquerda representam a massa molecular de proteínas standard em kDa.

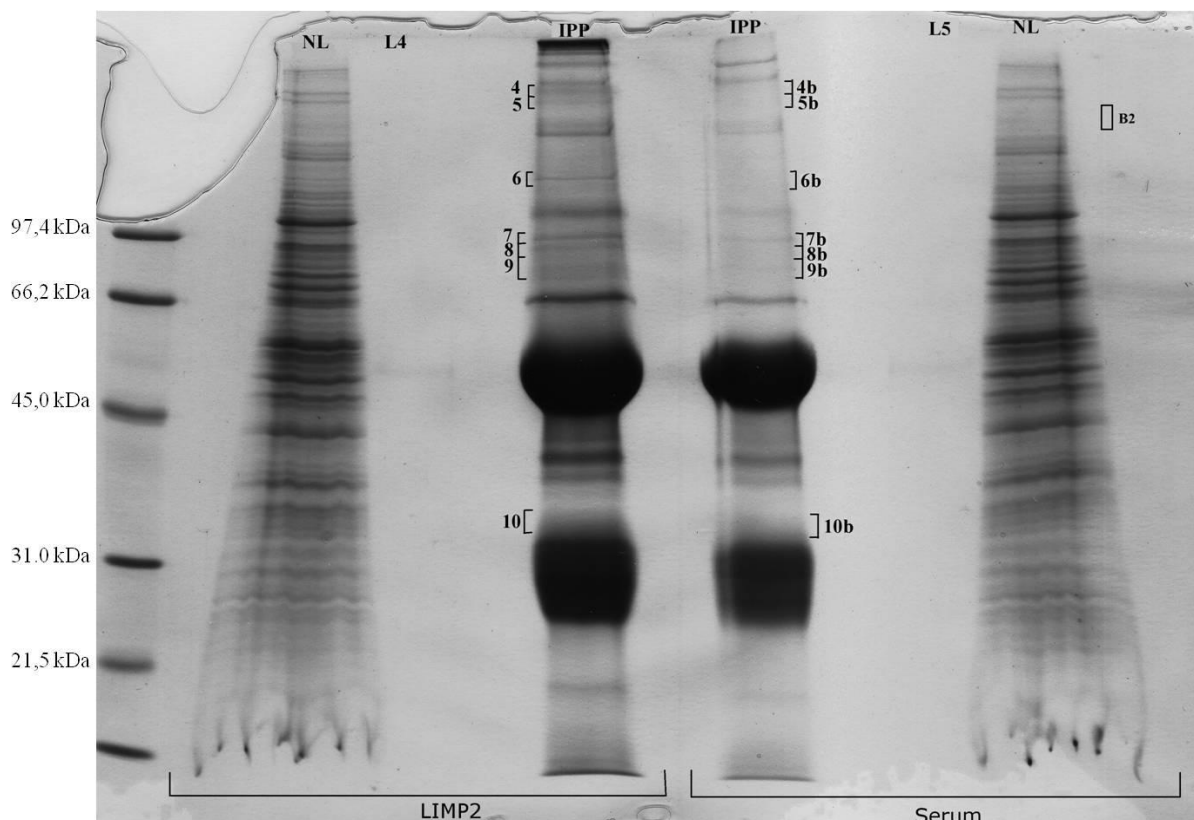


Figura 20 - Perfil proteico do imunoprecipitado com anticorpo anti-LIMP-2, após solubilização da LIMP-2 com digitonina 2.5%. A fracção organelar enriquecida de testículo de *Rattus norvegicus*, imunoprecipitada com anti-LIMP-2 após solubilização da LIMP-2 com digitonina 2.5% (IPP), foi avaliada por SDS-PAGE e corado com Coomassie/TCA. Foi aplicado em gel o equivalente a 4 mg de proteína total do imunoprecipitado (IPP), e 200 μ g do não ligado (NL) e da lavagem 4 (L4). As bandas assinaladas com números no gel foram excisadas para identificação de proteínas presentes na amostra. Os números à esquerda representam a massa molecular de proteínas standard em kDa.

Após a análise de toda a informação proteica constituinte da amostra e tendo em conta apenas as proteínas específicas do imunoprecipitado com anti-LIMP-2, chegamos a um conjunto de proteínas que podem ser possíveis interactores da LIMP-2.

Apesar da LIMP-2 ter sido identificada em ambos os géis por MALDI-TOF/TOF por sequenciação peptídica nas bandas 1 (Figura 19), 8 e 9 (Figura 20) com confiança estatística de 99% e por WB (Figura 17 e 18), seria necessário efectuar a sequenciação peptídica dos péptidos constituintes das proteínas que se consideram possíveis interactores da LIMP-2 para obtenção de resultados mais fidedignos. Esta análise não foi conseguida em tempo útil para a escrita desta dissertação.

Não obstante, foi possível isolar três proteínas que se podem encontrar, entre outras, no imunoprecipitado com anti-LIMP-2 independentemente do tipo de solubilizante das quais a Proteína β 15 – de ligação à proteína cinase C (Figura 19 – Banda 2 / Figura 20 – Banda 4) envolvida na regulação da inflamação (Tabela VI); a Miomegalina (Figura 19 – Banda 2 / Figura 20 – Banda 4) descrita como proteína de ancoragem envolvida no sequestro de componentes para o complexo de Golgi e/ou centróssomas (Tabela VI) e a

Desoxirribonuclease-2- β (Figura 19 – Banda 2 / Figura 20 – Banda 7) responsável pela degradação do DNA no lisossoma (Tabela VI). Estas proteínas formam complexos fortes com LIMP-2, uma vez que não são imunoprecipitadas pelo soro de coelho e estes complexos são isolados quando a solubilização é feita com recurso a digitonina como com triton X-100.

Tabela VI - Função das proteínas identificadas no imunoprecipitado com anti-LIMP-2

Nome da proteína	Função da proteína
Proteína β 15 – de ligação à proteína cinase C	Envolvido na activação de NF κ B e regulação da inflamação
Miomegalina	Proteína de ancoragem para sequestro de componentes dependentes da via cAMP para o Golgi e / ou centrossomas
Desoxirribonuclease-2- β	Hidrolise de DNA em condições acídicas (lisossoma)

V. Discussão e Conclusões

A LIMP-2 é uma proteína integral da membrana do lisossoma responsável pelo endereçamento da GCCase para este organelo. Apresenta ainda funções ligadas à resposta imune contra determinados patogénicos^{27,28,29} e função estrutural, fazendo parte dos discos intercalares nos cardiomiócitos³⁶.

Neste trabalho foi desenvolvida uma estratégia para a avaliação da estequiometria relativa do complexo LIMP-2/GCCase em diferentes órgãos de ratinho (*Mus musculus*), de forma a inferir sobre possíveis órgãos alvo para a identificação de novos complexos formados pela LIMP-2 e de isolamento destes complexos para identificação das proteínas envolvidas no processo de interacção com a LIMP-2.

Verificamos que a estequiometria relativa do complexo LIMP-2/GCCase é diferente nos diferentes órgãos. Sendo que a estequiometria de formação do complexo proposta anteriormente por outros autores¹ de 2:2, as diferentes estequiometrias relativas das duas proteínas podem dever-se a três factores: 1) reciclagem da LIMP-2 para o RE ou complexo de Golgi; 2) *turnover* diferencial da LIMP-2 e GCCase e/ou 3) a LIMP-2 apresentar múltiplas funções na célula.

Tendo por base a hipótese da LIMP-2 ter outras funções na célula para além de ser o transportador lisossomal da GCCase, procedeu-se à identificação de proteínas que formassem complexo com a LIMP-2 por imunoprecipitação.

Apesar do sucesso na imunoprecipitação da LIMP-2, demonstrada tanto por WB como através da identificação por espectroscopia de massa por sequenciação peptídica, a análise de bandas por PMF revelou-se útil, mas pouco conclusiva, uma vez que as amostras analisadas apresentavam como principal componente imunoglobulinas de coelho provenientes do anticorpo ou soro usado. Este facto levou a que a identificação de proteínas tivesse que ser cautelosa, uma vez que a quantidade de amostra necessária para a análise por sequenciação peptídica seria elevada e não seria possível a verificação de vários péptidos. Assim, são apresentadas apenas proteínas como possíveis interactores da LIMP-2, baseado na sua presença apenas no imunoprecipitado com anti-LIMP-2 e presentes nos dois géis independentemente do tipo de solubilizante. Contudo, a sequenciação peptídica é absolutamente necessária para a confirmação deste resultado, o que será feito em estudos futuros.

Sendo que a LIMP-2 tem como principal função o endereçamento da GCCase para o lisossoma e dado que uma das proteínas identificadas com possível interactor, a

Desoxirribonuclease-2- β , é responsável pela hidrólise do DNA em condições acídicas cujo transportador lisossomal ou a sequencia sinal de endereçamento para o lisossoma não foi ainda identificado, é possível que seja a LIMP-2 a proteína responsável por esse endereçamento.

Por outro lado, é possível a interação da LIMP-2 com uma proteína envolvida na regulação da inflamação por activação do factor de transcrição NF- κ β , a Proteína β 15 – de ligação à proteína cinase C. Dada a recente função descrita para a LIMP-2 como parte integrante na internalização do enterovirus 71 e activação de macrófagos durante a infecção por *Listeria monocytogenes*, poderá hipotetizar-se que a LIMP-2 possa ter algum tipo de função na formação do complexo *linear ubiquitin chain assembly complex* (LUBAC) (do qual a Proteína β 15 – de ligação à proteína cinase C faz parte).

Foi também identificada nos imunoprecipitados a miomegalina, uma proteína de ancoragem responsável pelo sequestro e endereçamento de componentes da via de sinalização dependente de cAMP para o complexo de Golgi e/ou centrossoma, podendo a LIMP-2 estar envolvida neste processo de transporte.

Após a análise dos resultados obtidos e a avaliação de todas as dificuldades com que nos deparamos, pensamos que algumas das abordagens utilizadas deveriam ser revistas e alteradas. Nomeadamente:

1) A utilização de ratinho em vez de rato, permitiria uma identificação mais completa das proteínas na amostra, uma vez que as bases de dados de proteínas disponíveis para este organismo, são mais completas e existe um maior número de proteínas que estando descritas, são verificadas a nível proteico, logo que a sua sequência proteica está verificada experimentalmente.

2) De forma a colmatar o problema da baixa concentração de complexos/proteínas imunoprecipitados ou mesmo presentes na fracção solúvel, dever-se-ia investir num refinamento da amostra optando pela obtenção de organelos puros tentando-se, posteriormente, aplicar a abordagem descrita neste trabalho a lisossomas puros. A utilização de um anticorpo monoclonal na imunoprecipitação, em substituição do policlonal usado, seria vantajoso tendo em conta a sua maior sensibilidade, o que permitiria a obtenção de uma maior quantidade de proteína imunoprecipitada e minimizaria as eventuais reacções não específicas.

3) A purificação do imunoprecipitado de forma a eliminar as imunoglobulinas que se revelaram bastante prejudiciais nesta análise, seria outro dos aspectos a melhorar neste estudo. Para isso, poder-se-ia ligar o anticorpo covalentemente às *beads* de agarose com recurso a

produtos comerciais que se ligam a aminas primárias do anticorpo ou usar-se um *crosslinker* como o disuccinimidil suberato (DSS) ou o Sulfo-DSS (BS3) que promove a formação de ligações covalentes entre as *beads* A ou G com o anticorpo, possibilitando a análise das proteínas co-immunoprecipitadas num gel SDS-PAGE sem a presença das imunoglobulinas.

Em conclusão e apesar de alguns problemas já discutidos nesta secção, neste estudo foi possível apresentar um protocolo capaz de proporcionar uma eficiente obtenção de LIMP-2 solúvel após tratamento da membrana lisossomal com agentes solubilizantes pouco agressivos capazes de manter as interações fracas entre os complexos proteicos. Foram descritas também, as condições necessárias à imunoprecipitação destes complexos, mostrando-se possível a identificação de proteínas que fazem parte dos complexos formados pela LIMP-2. Por fim, apresentam-se três possíveis interactores da LIMP-2 que, após verificação, poderão levar ao estabelecimento de novas funções desta proteína na célula.

Bibliografia

1. Reczek, D., *et al.* LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell* **131**, 770-783 (2007).
2. Balreira, A., *et al.* A nonsense mutation in the LIMP-2 gene associated with progressive myoclonic epilepsy and nephrotic syndrome. *Hum Mol Genet* **17**, 2238-2243 (2008).
3. Chaves, J., *et al.* Progressive myoclonus epilepsy with nephropathy C1q due to SCARB2/LIMP-2 deficiency: clinical report of two siblings. *Seizure* **20**, 738-740 (2011).
4. Berkovic, S.F., *et al.* Array-based gene discovery with three unrelated subjects shows SCARB2/LIMP-2 deficiency causes myoclonus epilepsy and glomerulosclerosis. *Am J Hum Genet* **82**, 673-684 (2008).
5. Kuronita, T., *et al.* A role for the lysosomal membrane protein LGP85 in the biogenesis and maintenance of endosomal and lysosomal morphology. *J Cell Sci* **115**, 4117-4131 (2002).
6. Saftig, P. *Lysosomes*, (Landes Bioscience/Eurekah.com ; Springer Science+Business Media, Georgetown, Tex. New York, N.Y., 2005).
7. Saftig, P. & Klumperman, J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 623-635 (2009).
8. Gruenberg, J. The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 721-730 (2001).
9. Vellodi, A. Lysosomal storage disorders. *Br J Haematol* **128**, 413-431 (2005).
10. Arai, K., Shimaya, A., Hiratani, N. & Ohkuma, S. Purification and characterization of lysosomal H(+)-ATPase. An anion-sensitive v-type H(+)-ATPase from rat liver lysosomes. *J Biol Chem* **268**, 5649-5660 (1993).
11. Varki, A. & Kornfeld, S. Purification and characterization of rat liver alpha-N-acetylglucosaminyl phosphodiesterase. *J Biol Chem* **256**, 9937-9943 (1981).
12. Reitman, M.L. & Kornfeld, S. UDP-N-acetylglucosamine:glycoprotein N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. Proposed enzyme for the phosphorylation of the high mannose oligosaccharide units of lysosomal enzymes. *J Biol Chem* **256**, 4275-4281 (1981).
13. Waheed, A., Hasilik, A. & von Figura, K. Processing of the phosphorylated recognition marker in lysosomal enzymes. Characterization and partial purification of a microsomal alpha-N-acetylglucosaminyl phosphodiesterase. *J Biol Chem* **256**, 5717-5721 (1981).
14. Kang, C. & Drayna, D. Genetics of speech and language disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **12**, 145-164 (2011).
15. Kawashima, I., *et al.* Cytochemical analysis of storage materials in cultured skin fibroblasts from patients with I-cell disease. *Clin Chim Acta* **378**, 142-146 (2007).
16. Glickman, J.N. & Kornfeld, S. Mannose 6-phosphate-independent targeting of lysosomal enzymes in I-cell disease B lymphoblasts. *J Cell Biol* **123**, 99-108 (1993).
17. Rijnboutt, S., Aerts, H.M., Geuze, H.J., Tager, J.M. & Strous, G.J. Mannose 6-phosphate-independent membrane association of cathepsin D, glucocerebrosidase, and sphingolipid-activating protein in HepG2 cells. *The Journal of biological chemistry* **266**, 4862-4868 (1991).
18. Dittmer, F., *et al.* Alternative mechanisms for trafficking of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphate receptor-deficient mice are cell type-specific. *Journal of cell science* **112** (Pt 10), 1591-1597 (1999).

19. Ludwig, T., *et al.* Differential sorting of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphate receptor-deficient fibroblasts. *The EMBO journal* **13**, 3430-3437 (1994).
20. Coutinho, M.F., Prata, M.J. & Alves, S. A shortcut to the lysosome: The mannose-6-phosphate-independent pathway. *Mol Genet Metab* (2012).
21. Lefrancois, S., Zeng, J., Hassan, A.J., Canuel, M. & Morales, C.R. The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *EMBO J* **22**, 6430-6437 (2003).
22. Ni, X. & Morales, C.R. The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor. *Traffic* **7**, 889-902 (2006).
23. Canuel, M., Korkidakis, A., Konnyu, K. & Morales, C.R. Sortilin mediates the lysosomal targeting of cathepsins D and H. *Biochem Biophys Res Commun* **373**, 292-297 (2008).
24. Braulke, T. & Bonifacino, J.S. Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 605-614 (2009).
25. Fujita, H., *et al.* Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding the 85 kDa human lysosomal sialoglycoprotein (hLGP85) in human metastatic pancreas islet tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* **184**, 604-611 (1992).
26. Calvo, D., Dopazo, J. & Vega, M.A. The CD36, CLA-1 (CD36L1), and LIMPII (CD36L2) gene family: cellular distribution, chromosomal location, and genetic evolution. *Genomics* **25**, 100-106 (1995).
27. Blanz, J., *et al.* Disease-causing mutations within the lysosomal integral membrane protein type 2 (LIMP-2) reveal the nature of binding to its ligand beta-glucocerebrosidase. *Hum Mol Genet* **19**, 563-572 (2010).
28. Zachos, C., Blanz, J., Saftig, P. & Schwake, M. A Critical Histidine Residue Within LIMP-2 Mediates pH Sensitive Binding to Its Ligand beta-Glucocerebrosidase. *Traffic* (2012).
29. Bussink, A.P., van Eijk, M., Renkema, G.H., Aerts, J.M. & Boot, R.G. The biology of the Gaucher cell: the cradle of human chitinases. *International review of cytology* **252**, 71-128 (2006).
30. Carrasco-Marin, E., *et al.* LIMP-2 links late phagosomal trafficking with the onset of the innate immune response to *Listeria monocytogenes*: a role in macrophage activation. *J Biol Chem* **286**, 3332-3341 (2011).
31. Yamayoshi, S., *et al.* Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. *Nat Med* **15**, 798-801 (2009).
32. Nishimura, Y. & Shimizu, H. Cellular receptors for human enterovirus species a. *Front Microbiol* **3**, 105 (2012).
33. Lin, Y.W., *et al.* Human SCARB2-mediated entry and endocytosis of EV71. *PLoS One* **7**, e30507 (2012).
34. Yamayoshi, S. & Koike, S. Identification of a human SCARB2 region that is important for enterovirus 71 binding and infection. *J Virol* **85**, 4937-4946 (2011).
35. Chen, P., *et al.* Molecular determinants of enterovirus 71 viral entry: cleft around GLN-172 on VP1 protein interacts with variable region on scavenger receptor B 2. *J Biol Chem* **287**, 6406-6420 (2012).
36. Crombie, R. & Silverstein, R. Lysosomal integral membrane protein II binds thrombospondin-1. Structure-function homology with the cell adhesion molecule CD36 defines a conserved recognition motif. *J Biol Chem* **273**, 4855-4863 (1998).
37. Eckhardt, E.R., Cai, L., Sun, B., Webb, N.R. & van der Westhuyzen, D.R. High density lipoprotein uptake by scavenger receptor SR-BII. *J Biol Chem* **279**, 14372-14381 (2004).

38. Eckhardt, E.R., *et al.* High density lipoprotein endocytosis by scavenger receptor SR-BII is clathrin-dependent and requires a carboxyl-terminal dileucine motif. *J Biol Chem* **281**, 4348-4353 (2006).
39. Schroen, B., *et al.* Lysosomal integral membrane protein 2 is a novel component of the cardiac intercalated disc and vital for load-induced cardiac myocyte hypertrophy. *J Exp Med* **204**, 1227-1235 (2007).
40. Filocamo, M. & Morrone, A. Lysosomal storage disorders: molecular basis and laboratory testing. *Hum Genomics* **5**, 156-169 (2011).
41. Platt, F.M. & Walkley, S.U. *Lysosomal disorders of the brain : recent advances in molecular and cellular pathogenesis and treatment*, (Oxford University Press, Oxford, 2004).
42. Sugie, K., *et al.* Characterization of Danon disease in a male patient and his affected mother. *Neuromuscul Disord* **13**, 708-711 (2003).
43. Meikle, P.J., Hopwood, J.J., Clague, A.E. & Carey, W.F. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* **281**, 249-254 (1999).
44. Poorthuis, B.J., *et al.* The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet* **105**, 151-156 (1999).
45. Pinto, R., *et al.* Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet* **12**, 87-92 (2004).
46. Dibbens, L.M., *et al.* SCARB2 mutations in progressive myoclonus epilepsy (PME) without renal failure. *Ann Neurol* **66**, 532-536 (2009).
47. Dibbens, L.M., *et al.* Mutation of SCARB2 in a patient with progressive myoclonus epilepsy and demyelinating peripheral neuropathy. *Archives of neurology* **68**, 812-813 (2011).
48. Perandones, C., *et al.* A case of severe hearing loss in action myoclonus renal failure syndrome resulting from mutation in SCARB2. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* **27**, 1200-1201 (2012).
49. Rubboli, G., *et al.* Clinical and neurophysiologic features of progressive myoclonus epilepsy without renal failure caused by SCARB2 mutations. *Epilepsia* **52**, 2356-2363 (2011).
50. Badhwar, A., *et al.* Action myoclonus-renal failure syndrome: characterization of a unique cerebro-renal disorder. *Brain* **127**, 2173-2182 (2004).
51. Andermann, E., *et al.* Action myoclonus-renal failure syndrome: a previously unrecognized neurological disorder unmasked by advances in nephrology. *Advances in neurology* **43**, 87-103 (1986).
52. Brown, P. Action myoclonus-renal failure syndrome: the definitive clinicopathological description. *Brain* **127**, 2151-2152 (2004).
53. Dardis, A., *et al.* Biochemical and molecular findings in a patient with myoclonic epilepsy due to a mistarget of the beta-glucosidase enzyme. *Mol Genet Metab* **97**, 309-311 (2009).
54. Velayati, A., *et al.* A mutation in SCARB2 is a modifier in Gaucher disease. *Hum Mutat* **32**, 1232-1238 (2011).
55. Michelakakis, H., *et al.* Evidence of an association between the scavenger receptor class B member 2 gene and Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* **27**, 400-405 (2012).
56. Chen, S., *et al.* Association study of SCARB2 rs6812193 polymorphism with Parkinson's disease in Han Chinese. *Neurosci Lett* **516**, 21-23 (2012).
57. Herbert, D., Phipps, P. & Strang, R. *Chemical analysis of microbial cells*, (Academic Press Ltd, London, 1971).
58. Sa Miranda, M.C., *et al.* Activity of glucocerebrosidase in extracts of different cell types from type 1 Gaucher disease patients. *Clin Genet* **38**, 218-227 (1990).

59. Ribeiro, M.G., Pinto, R.A., Dos Santos, M.R., Maia, M. & Sa Miranda, M.C. Biochemical characterization of beta-hexosaminidase in different biological specimens from eleven patients with GM2-gangliosidosis B1 variant. *J Inherit Metab Dis* **14**, 715-720 (1991).
60. Ho, M.W. & O'Brien, J.S. Differential effect of chloride ions on -galactosidase isoenzymes: a method for separate assay. *Clin Chim Acta* **32**, 443-450 (1971).
61. Mayes, J.S., Scheerer, J.B., Sifers, R.N. & Donaldson, M.L. Differential assay for lysosomal alpha-galactosidases in human tissues and its application to Fabry's disease. *Clin Chim Acta* **112**, 247-251 (1981).
62. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254 (1976).
63. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
64. Gouveia, A.M., *et al.* Alkaline density gradient floatation of membranes: polypeptide composition of the mammalian peroxisomal membrane. *Anal Biochem* **274**, 270-277 (1999).
65. Reguenga, C., Oliveira, M.E., Gouveia, A.M., Sa-Miranda, C. & Azevedo, J.E. Characterization of the mammalian peroxisomal import machinery: Pex2p, Pex5p, Pex12p, and Pex14p are subunits of the same protein assembly. *J Biol Chem* **276**, 29935-29942 (2001).
66. Gallagher, S.R. One-Dimensional Electrophoresis Using Nondenaturing. in *Curr. Prot. Mol. Biol* (John Wiley & Sons, Inc., 1999).
67. NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>. (2012).
68. UniProt. <http://www.uniprot.org/>. (2012).