



Universidade de Aveiro
Ano 2009

Departamento de Química

**Priscila Hália Pires
dos Santos Oliveira**

**Identificação de proteínas ligadas à Proteína
Precursora da Doença de Alzheimer**



Universidade de Aveiro
Ano 2009

Departamento de Química

**Priscila Hália Pires
dos Santos Oliveira**

**Identificação de proteínas ligadas à Proteína
Precursora da Doença de Alzheimer**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação científica da Doutora Odete Abreu Beirão da Cruz e Silva, Professora Auxiliar do Departamento de Ciências da Saúde da Universidade de Aveiro e co-orientação científica do Doutor Francisco Manuel Lemos Amado, Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dedico aos meus pais e irmão.

O júri

Presidente

Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues

Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof.^a Doutora Margarida Sâncio da Cruz Fardilha

Professora Auxiliar Convidada Secção Autónoma de Ciências da Saúde da Universidade de Aveiro

Prof.^a Doutora. Odete Abreu Beirão da Cruz e Silva

Professora Auxiliar da Secção Autónoma de Ciências da Saúde da Universidade de Aveiro (orientadora)

Prof. Doutor Francisco Manuel Lemos Amado

Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro (co-orientador)

Agradecimentos

À Professora Doutora Odete Abreu Beirão da Cruz e Silva, orientadora da dissertação, agradeço o apoio, a coerência, a partilha de saber e as valiosas contribuições para o trabalho.

Ao Professor Doutor Francisco Manuel Lemos Amado co-orientador da dissertação, agradeço o apoio, disponibilidade, bem como pelos conhecimentos e conselhos partilhados.

À Professora Doutora, Gabi, do laboratório de Neurociências do Centro de Biologia Celular da Universidade de Aveiro, pelos conselhos, pela ajuda preciosa, paciência e amizade.

Ao Doutor Rui Vitorino, investigador auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, por todos os esclarecimentos prestados.

Aos colegas dos laboratórios de Neurociências do Centro de Biologia Celular e de Espectrometria de massa do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, por proporcionarem um bom ambiente de trabalho.

Aos meus colegas e amigos de curso e de mestrado pela amizade e pelos agradáveis momentos que partilhamos juntos.

Aos meus pais, pelo incentivo, dedicação e compreensão. O encorajamento e força que sempre me transmitiram foram preciosos.

Ao meu irmão pelo carinho, amizade e companheirismo.

Ao meu namorado pelo carinho e compreensão.

A todos os meus amigos, por todo o apoio e incentivo incondicionais.

Palavras-chave

Doença de Alzheimer, beta-amiloíde, desordem neurodegenerativa, demência, proteína precursor amilolíde, proteoma

Resumo

A doença de Alzheimer (DA), caracteriza-se como uma doença neurodegenerativa, do sistema nervoso central, associada com a perda de memória progressiva e irreversível, tendo por resultado a demência, e de etiologia multifactorial mas não totalmente conhecida, com aspectos neuropatológicos e neuroquímicos característicos.

As principais alterações histopatológicas observadas nos doentes são a presença de emaranhados neurofibrilares intracelulares e depósitos extracelulares de um peptídeo de 4 KDa denominado Abeta, que é o principal componente das placas de amilóide no córtex cerebral. Apesar da sua etiologia multifactorial, há uma correlação bem descrita entre esta patologia e o Abeta (peptídeo neurotóxico). O Abeta deriva fisiológica e proteoliticamente de uma glicoproteína transmembranar com características de receptor: a Proteína Precursora de Amilóide de Alzheimer (PPA).

O estudo das interacções proteína-proteína é uma condição prévia importante para explorar novas formas de manipular a produção de A β . Com esta questão em mente, procurou-se identificar proteínas que interagem com a PPA, caracterizá-las e relacioná-las com a DA. O estudo do proteoma expresso em células COS-7, imunoprecipitando com diferentes anticorpos 22C11 e C-terminal, proporcionou obter informações que contribuem para melhorar a compreensão da base molecular da DA.

As proteínas caracterizadas poderão ser usadas como alvos no tratamento da DA, podendo provocar um impacto no processamento da PPA e na formação dos emaranhados neurofibrilares, sendo a α -Actina, β -Tubulina, Vimentina, Nucleolina, Stress-70 mitocondrial e a proteína com domínio "zinc-finger".

Keywords

Alzheimer's disease, beta-amyloid, neurodegenerative disorder, dementia, amyloid precursor protein, proteome

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is characterized as a neurodegenerative disease of the central nervous system, associated with progressive memory loss. It is irreversible, resulting in dementia, having a multifactorial etiology which is not completely understood. Specific neuropathological and neurochemical characteristics have been associated with AD.

The pathological hallmarks of AD are the presence of intracellular neurofibrillary tangles and extracellular deposits of a 4kDa amyloid beta peptide (Abeta) forming amyloid plaques in the cerebral cortex. This disease is multifactorial in its etiology but central to its pathology is the neurotoxic Abeta peptide. Abeta arises from the proteolytic cleavage of a larger ubiquitous glycoprophosphoprotein, APP (Alzheimer Amyloid Precursor Protein), whose short cytoplasmic domain contains several phosphorylatable amino acids.

The study of protein-protein interactions is an important prerequisite for exploring new ways to manipulate the production of A β . Bearing these questions in mind, we tried to identify proteins that interact with APP, characterized them and related them with AD. By studying the COS-7 cells proteome with different antibodies, 22C11 and C-terminal, this will provide additional information to help improve our understanding of the molecular basis AD.

Proteins thus characterized may be used as targets in the treatment of AD. These are and may potentially impact on the processing of APP and the formation of neurofibrillary tangles, these are the α -Actin, β -Tubulin, Vimentin, Stress-70 mitochondrial, Nucleolin and protein domain with "zinc-finger".

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABELAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	<u>1</u>
1.1 DOENÇA DE ALZHEIMER	4
1.2 ALTERAÇÕES NEUROPATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DA DOENÇA DE ALZHEIMER	5
1.3 A PROTEÍNA PPA.....	7
1.4. METABOLISMO DA PPA.....	8
<u>2. OBJECTIVOS</u>	<u>11</u>
<u>3. MATERIAIS E MÉTODOS</u>	<u>15</u>
3.1 CULTURA DE CÉLULAS	17
3.2 TRANSFEÇÃO COM FOSFATO DE CÁLCIO.....	17
3.3 DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL	18
3.4 CO-IMUNOPRECIPITAÇÃO	19
3.5 ELECTROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE.....	20
3.6 TRANSFERÊNCIA DAS PROTEÍNAS (“WESTERN BLOTTING”).....	21
3.7 IMUNODETECÇÃO DAS PROTEÍNAS IMOBILIZADAS	22
3.7.1 DETECÇÃO PROTEICA PELO MÉTODO DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA.....	22
3.8 DIGESTÃO COM A TRIPSINA	23
3.9 SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA	23
3.10 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA	24
3.11 PROCURA NA BASE DE DADOS	24

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....25

4.1 OPTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DNA PARA TRANSFECTAR EM CÉLULAS COS-7	27
4.1.1 QUANTIFICAÇÃO PROTEICA PELO MÉTODO BCA	27
4.1.2 SDS-PAGE E IMUNODETECÇÃO DA PPA	28
4.2 AMOSTRAS PARA POSTERIOR IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS QUE LIGAM À PPA	29
4.2.1 QUANTIFICAÇÃO PROTEICA PELO MÉTODO BCA	29
4.2.2 SDS-PAGE E IMUNODETECÇÃO DA PPA	31
4.3 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	32
4.3.1 PROTEÍNAS IDENTIFICADAS PARA A AMOSTRA NÃO-TRANSFECTADA E IMUNOPRECIPITADA COM O ANTICORPO C-TERMINAL	32
4.3.2 PROTEÍNAS IDENTIFICADAS PARA A AMOSTRA TRANSFECTADA E IMUNOPRECIPITADA COM O ANTICORPO C-TERMINAL	33
4.3.3 PROTEÍNAS IDENTIFICADAS PARA A AMOSTRA TRANSFECTADA E IMUNOPRECIPITADA COM O ANTICORPO 22C11	34
4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS E A SUA RELAÇÃO COM A DA	35
4.4.1 A PROTEÍNA ACTINA	35
4.4.2 A PROTEÍNA TUBULINA.....	36
4.4.3 A PROTEÍNA VIMENTINA	37
4.4.4 A PROTEÍNA HISTONA	38
4.4.5 A PROTEÍNA STRESS-70 MITOCONDRIAL	39
4.4.6 AS RIBONUCLEOPROTEÍNAS HETEROGÉNEAS.....	40
4.4.8 AS PROTEÍNAS RIBOSSOMAIS.....	40
4.4.9 A PROTEÍNA FIBRILARINA	41
4.4.10 A PROTEÍNA FACTOR DE ELONGAÇÃO 1-A.....	41
4.4.11 A PROTEÍNA NUCLEOLINA	42
4.4.12 A PROTEÍNA COM DOMÍNIO “ZINC-FINGER”	43
4.5 FOSFORILAÇÃO E INTERACÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA.....	43
4.6 ESTUDO DO PROTEOMA	45

<u>5. CONCLUSÕES.....</u>	<u>47</u>
5.1 CONCENTRAÇÃO ÓPTIMA PARA A TRANSFECCÃO.....	49
5.2 SDS-PAGE DAS AMOSTRAS PARA POSTERIOR IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS QUE LIGAM À PPA	49
5.3 ESTUDO DE PROTEÍNAS QUE LIGAM À PPA	49
<u>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u>	<u>53</u>
<u>7. ANEXO.....</u>	<u>63</u>
PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PARA A TRANSFECCÃO COM FOSFATO DE CÁLCIO.....	65
PREPARAÇÃO DOS MINI-GEIS	66

Índice de figuras

FIGURA 1 – ESQUEMA DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL UTILIZADO NESTE TRABALHO.	4
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESPÉCIES DO PEPTÍDEO B-AMILOÍDE. (FORD MICHAEL, 2008).....	8
FIGURA 3 - VIA NÃO – AMILOIDOGÉNICA DO METABOLISMO DA PPA.....	9
FIGURA 4 - VIA AMILOIDOGÉNICA DO METABOLISMO DA PPA.	10
FIGURA 5 - GRÁFICO DE QUANTIFICAÇÃO PROTEICA NOS LISADOS CELULARES.	28
FIGURA 6 - NÍVEIS DE TRANSFEÇÃO DE PPA695 EM CÉLULAS COS-7. AS CÉLULAS FORAM TRANSFECTADAS COM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE DNA DE 0 A 5 μ G (DA ESQUERDA PARA A DIREITA, RESPECTIVAMENTE), EM LISADOS CELULARES SEPARADOS POR SDS-PAGE E IMUNOPRECIPITADO POR 22C11.	29
FIGURA 7 - GRÁFICO DE QUANTIFICAÇÃO PROTEICA NAS AMOSTRAS PARA POSTERIOR IDENTIFICAÇÃO DO INTERACTOMA DA PPA.	30
FIGURA 8 - SDS-PAGE DE AMOSTRAS IMUNOPRECIPITADAS COM O ANTICORPO 22C11.	31
FIGURA 9 - SDS-PAGE DE AMOSTRAS IMUNOPRECIPITADAS COM O ANTICORPO GFP.	32
FIGURA 10 - DIAGRAMA DA INTERACÇÃO DA PROTEÍNA ACTINA (ACTA1) COM A PROTEÍNA PPA.	36
FIGURA 11 - DIAGRAMA DA INTERACÇÃO DA PROTEÍNA COM DOMÍNIO “ZINC-FINGER” (CTCF) COM A PROTEÍNA PPA.	43

Índice de tabelas

TABELA 1 - TABELA DE PREPARAÇÃO DOS PADRÕES DE PROTEÍNA.....	19
TABELA 2 – RESULTADOS OBTIDOS DA QUANTIDADE PROTEICA NOS LISADOS CELULARES, PELO MÉTODO BCA.....	28
TABELA 3 – RESULTADOS OBTIDOS DAS AMOSTRAS PARA POSTERIOR IDENTIFICAÇÃO DO INTERACTOMA DA PPA, PELO MÉTODO BCA.....	30
TABELA 4 - TABELA DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DA AMOSTRA NÃO - TRANSFECTADA E IMUNOPRECIPITADA COM O ANTICORPO C-TERMINAL.	33
TABELA 5 - TABELA DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DA AMOSTRA TRANSFECTADA E IMUNOPRECIPITADA COM O ANTICORPO C-TERMINAL.	33
TABELA 6 - TABELA DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DA AMOSTRA TRANSFECTADA E IMUNOPRECIPITADA COM O ANTICORPO 22C11.	34
TABELA 7 – CARACTERIZAÇÃO E RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA COM A DA.....	45

Lista de abreviaturas

DA –	Doença de Alzheimer
AICD –	Domínio Citoplasmático Curto da Proteína APP do C-terminal
PPA –	Proteína Precursora Amiloide da Doença de Alzheimer
APOE –	Apolipoproteína E
ATP –	Adenosina 5´-trifosfato
A β –	Peptídeo β -amiloide
A β 40 -	Peptídeo β -amiloide de 40 aminoácidos
A β 42 -	Peptídeo β -amiloide de 42 aminoácidos
EXO –	Domínio Extracelular Longo da Proteína APP do N-terminal
LC-	Cromatografia Liquida
Leu –	Aminoácido Leucina
Lys –	Aminoácido Lisina
PKC –	Proteína Cinase C
PS1 –	Presenilina 1
PS2 –	Presenilina 2
sPPA β –	Domínio Extracelular Solúvel Curto da PPA
sPPA α –	Domínio Extracelular Solúvel Longo da PPA
SDS-PAGE –	Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato sódico
S ou Ser -	Aminoácido Serina
SNC –	Sistema Nervoso Central
T ou Thr –	Aminoácido Treonina
TFA-	Ácido Trifluoroacético
TBS –	Tampão salino de Tris
TBST-	Tampão salino de Tris com Tween 20
Y ou Tyr -	Aminoácido Tirosina

1. INTRODUÇÃO

Introdução

Este estudo tem como objectivos principais a identificação e caracterização de proteínas que interagem com a proteína precursora amilóide da doença de Alzheimer (PPA), para posteriormente relacioná-las com a doença de Alzheimer (DA), utilizando-se as técnicas de co-immunoprecipitação para isolar e a espectrometria de massa para identificar as proteínas que interagem com a PPA. Para a concretização destes objectivos utilizou-se o plano experimental apresentado na figura 1.

O stress celular, induzido pela adição do peptideo A β , pode induzir alterações moleculares, associadas à DA, que podem permitir identificar biomarcadores úteis para o diagnóstico da DA. Estes biomarcadores representam alvos interessantes para futura validação e potenciais candidatos para um diagnóstico molecular na DA.

Considerando que a fosforilação proteica anormal e o stress oxidativo podem contribuir para a DA, de futuro será conveniente investigar o processamento de PPA dependente da fosforilação durante o stress celular [1].

As modificações pós-traducionais afectam as funções das proteínas, sendo por isso, igualmente de interesse neste estudo, a identificação de proteínas modificadas por oxidação. Uma característica comum das modificações pós-traducionais é a alteração do peso molecular da proteína, tornando possível detectá-las e caracterizá-las pela técnica de espectrometria de massa. A caracterização destas modificações desempenha um papel fundamental na compreensão de processos biológicos, na activação/inactivação da actividade de enzimas, no regulamento da expressão génica, na localização celular proteica e nas modelações de interacções entre proteínas [2].

O campo da proteómica, que se concentra em identificar a natureza dinâmica do conteúdo proteico expresso no interior de uma determinada célula, tecido ou organismo, em determinadas condições, tem proporcionado muitas informações que contribuem para melhorar a base molecular e podem conduzir ao desenvolvimento de potenciais alvos terapêuticos de diversas doenças [3].

Tradicionalmente, métodos bioquímicos, tais como a co-immunoprecipitação são utilizados para estudar a interacção das proteínas, no entanto, estas técnicas necessitam de uma superexpressão das proteínas para se obter resultados consistentes [4]. Por esse motivo, neste estudo realiza-se a transfecção com fosfato de cálcio antes de se realizar a co-immunoprecipitação com os diferentes anticorpos (C-terminal e 22C11), utilizando-se a linha celular COS-7.

Introdução

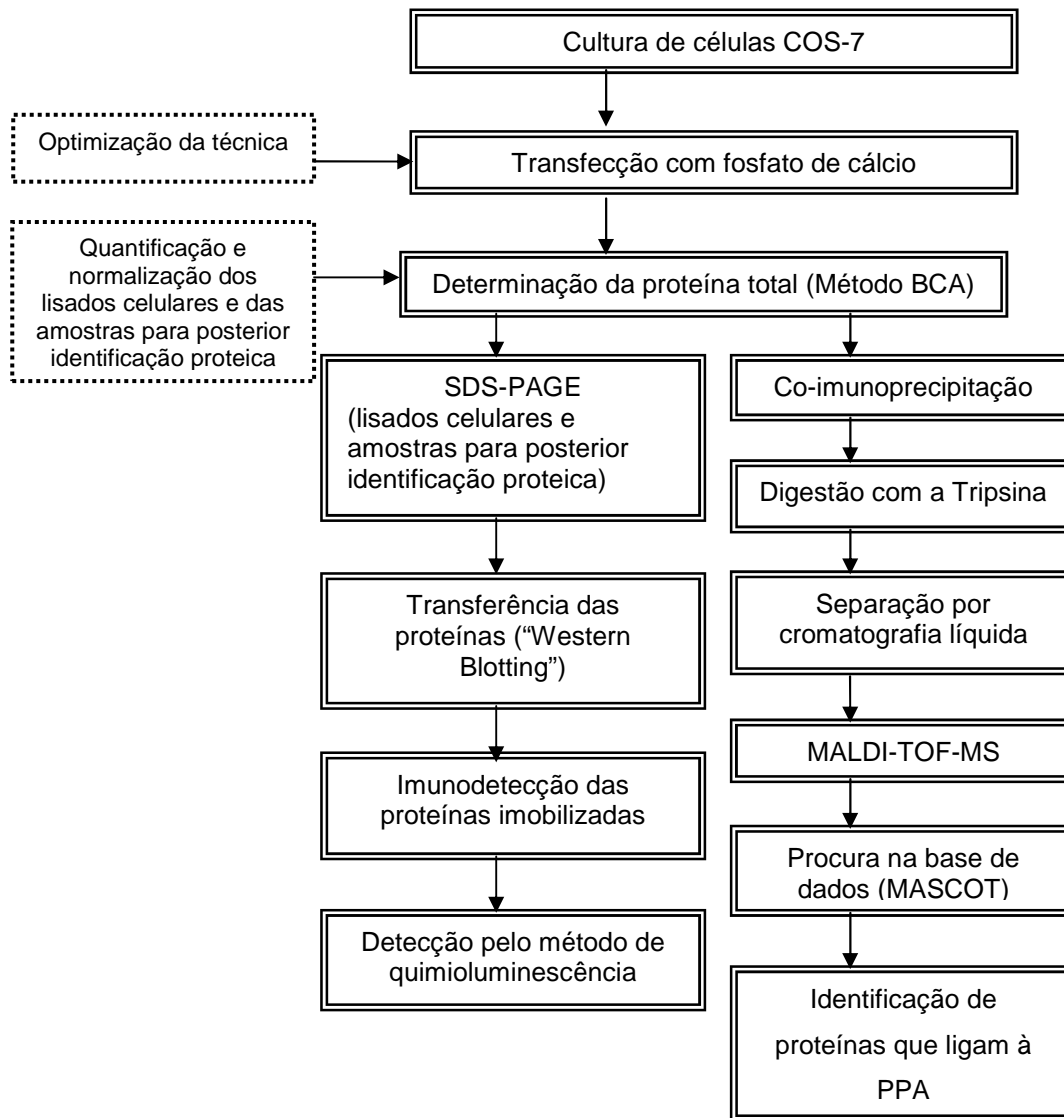


Figura 1 – Esquema do procedimento experimental utilizado neste trabalho.

1.1 Doença de Alzheimer

A dramática ascensão na esperança de vida durante o século 20, conduziu a um número crescente de indivíduos que alcançam a idade em que as desordens neurodegenerativas se tornam comuns [5-7].

Entre elas, a doença de Alzheimer (DA), caracterizando-se como uma doença cerebral degenerativa, do sistema nervoso central, associada com a perda de memória progressiva e irreversível, tendo por resultado a demência, e de etiologia multifactorial mas não totalmente conhecida, com aspectos neuropatológicos e neuroquímicos

característicos [5-7]. Os sintomas da doença inserem-se em três categorias: emocional, social e cognitivo [8].

Desde a descoberta da base histopatológica da DA pelo neuropatologista alemão Alois Alzheimer em 1907, surgiram diversas dúvidas sobre a relação dessa doença com o envelhecimento normal, uma vez que as alterações microscópicas observadas nos cérebros de pacientes com a DA, também eram observáveis em cérebros de pessoas idosas saudáveis. A diferença reside na quantidade e distribuição dessas alterações [6, 9]. Contudo, as placas visualizadas nos cérebros de pessoas normais ou de pessoas em estágios iniciais de DA, são depósitos benignos difusos de β -amilóide extracelulares não fibrilares e em estágios mais avançados da doença, as placas assumem uma conformação compacta e associam-se às neurites distróficas, sendo esta forma de placas mais tóxica [6].

A demência é uma síndrome crônica e progressiva, caracterizada pela presença de déficit na função cognitiva, com maior ênfase na perda de memória. No entanto, a perda de memória apesar de sempre ocorrer na demência, não é suficiente para o diagnóstico desta, sendo necessário o declínio de pelo menos uma outra área da função cognitiva [10, 11].

Inovações tecnológicas usando métodos de neuroimagem estruturais e funcionais e técnicas de biologia e genética molecular, têm demonstrado perspectivas para o diagnóstico precoce das demências, particularmente da DA [7, 12].

Vários factores podem aumentar a probabilidade de um indivíduo desenvolver a DA, nomeadamente a idade (a incidência aumenta em pessoas com mais de 80 anos), hereditariedade de determinados genes (a historia familiar da DA geralmente aumenta a probabilidade) [13, 14]. Pelo menos quatro genes estão envolvidos na fisiopatologia da DA, tais como mutações no gene PPA que se localiza no cromossoma 21, no gene APOE do cromossoma 19 e mutações nos genes Presenilina 1 (PS1) e Presenilina 2 (PS2), genes que se localizam nos cromossomas 14 e 1, respectivamente [14, 15].

Cerca de um terço dos casos de DA comportam-se de acordo com um padrão de herança monogénica autossómica dominante [16].

1.2 Alterações neuropatológicas e bioquímicas da doença de Alzheimer

As alterações neuropatológicas e bioquímicas da DA podem ser divididas em duas áreas gerais: mudanças estruturais e alterações nos sistemas neurotransmissores. As mudanças estruturais incluem emaranhados neurofibrilares, placas neuríticas, perdas

sinápticas e a morte neuronal, particularmente neurónios colinérgicos do prosencéfalo basal. As alterações nos sistemas neurotransmissores estão associadas às mudanças estruturais (patológicas), que ocorrem de forma desordenada na doença. Alguns neurotransmissores podem ser significativamente afectados, indicando um padrão de degeneração do sistema [10, 17].

As alterações que a DA provoca, nomeadamente a perda de memória e de capacidade de comunicação com o exterior, devem-se à degeneração e morte dos neurónios do córtex, do sistema límbico, do hipocampo e de outras regiões do cérebro [18].

A formação de placas senis e emaranhados neurofibrilares são os dois principais eventos histopatológicos associados à neurodegeneração na DA. As placas senis são depósitos extracelulares de filamentos do peptídeo β -amiloíde, um produto resultante da clivagem da proteína precursora amiloíde (PPA) por acção de uma enzima β -secretase, no processo proteolítico [19, 20].

A designação peptídeo β -amiloíde engloba uma família de peptídeos altamente relacionados, que variam em comprimento entre 28 e 43 aminoácidos e derivam da degradação metabólica da proteína PPA. Embora o peptídeo de 40 aminoácidos seja a forma predominantemente produzida após clivagem da PPA, um peptídeo ligeiramente maior de 42 aminoácidos ($A\beta_{42}$) é considerado mais crítico na formação das placas. O $A\beta_{42}$, espécie mais abundante nas placas neuríticas, é mais neurotóxico e agrega mais que o $A\beta_{40}$ [6]. A acumulação do péptido β -amiloíde provoca diversos mecanismos, incluindo a disfunção sináptica, stress oxidativo, inflamação e a activação de células da glia, conduzindo à perda neuronal [7].

As estruturas extracelulares como as placas difusas, podem também ser observadas em tecido cerebral de pacientes com a DA, no entanto, acredita-se que estas estruturas possam ser versões imaturas das placas neuríticas, sendo geralmente menores e morfologicamente menos definidas e provocando pouco dano no tecido cerebral [6].

Os emaranhados neurofibrilares são formados dentro da célula por uma alteração do estado de fosforilação de proteínas associadas a microtúbulos, sendo uma delas a proteína Tau e após a degeneração neuronal permanecem extracelularmente [6].

No sistema nervoso em desenvolvimento, a perda da estabilidade dos microtúbulos, pela hiperfosforilação, determina maior plasticidade celular e é essencial para o crescimento e diferenciação morfológica dos neurónios. No cérebro maduro, a manutenção da Tau em estado pouco fosforilado, confere aos neurónios a estabilidade necessária para sua homeostase. Em neurónios afectados, a perda de microtúbulos

determina alterações estruturais e funcionais, levando à morte celular e à formação de emaranhados neurofibrilares [21].

1.3 A proteína PPA

Mesmo que muitas proteínas possam conduzir ao estado da DA, o papel fundamental da PPA é inquestionável [22]. O gene que codifica PPA localiza-se no cromossoma 21 humano [13, 23] (21q21.2-3) [24, 25] e contém 19 exões [25], com a sequência beta-amiloide no exão 16 e 17 [23]. A proteína PPA tendo um peso molecular de 101 a 124 KDa é uma proteína transmembranar, com um grande domínio extracelular no N-terminal e um domínio mais curto citoplasmático (AICD), distanciados por 49 aminoácidos [14, 20]. O peptideo β -amiloide é produzido a partir da degradação metabólica da proteína PPA, sendo uma família de peptídeos que variam em comprimento entre 28 e 42 aminoácidos (figura 2).

É expressa em muitos tipos de células e dentro do SNC, parecendo desempenhar um papel na sinaptogénese, plasticidade sináptica, transporte axonal, adesão celular, transcrição génica, metabolismo do colesterol, formação de sinapses e migração neuronal [6, 8].

A PPA tem características típicas de um factor de crescimento, e tem o potencial de desempenhar funções importantes na transdução de sinais e na estrutura de neurónios. A PPA secretada exerce efeitos neurotróficos e neuroprotectivos, em diversos tipos de células. Geralmente, estes efeitos são induzidos pelo domínio extracelular solúvel longo (sPPA α) aproximadamente 100 vezes mais do que pelo domínio extracelular solúvel curto (sPPA β). A razão porque sPPA α exerce os seus efeitos é ainda desconhecida [5, 19].

A PPA pode ser localizada em diversas estruturas membranares da célula, como o reticulo endoplasmático (forma imatura), complexo de Golgi (forma madura) e a membrana celular. A forma madura é N- e O-glicosilada, enquanto que, a forma imatura é apenas N-glicosilada [1].

Mutações no gene PPA são conhecidas como causas da manifestação da DA em idade precoce. Por outro lado, a proteína APOE está relacionada com uma maior propensão para DA em pessoas mais idosas.

A PPA sofre splicing alternativo nos exões 7,8 e 15 e gera diferentes mRNAs. As três isoformas predominantes do exão 7 são: PPA695, PPA770 e PPA751. A PPA695 (carece dos exões 7 e 8) é altamente expressa nos neurónios e carece de um domínio encontrado nas isoformas PPA770 e PPA751 [19, 20].

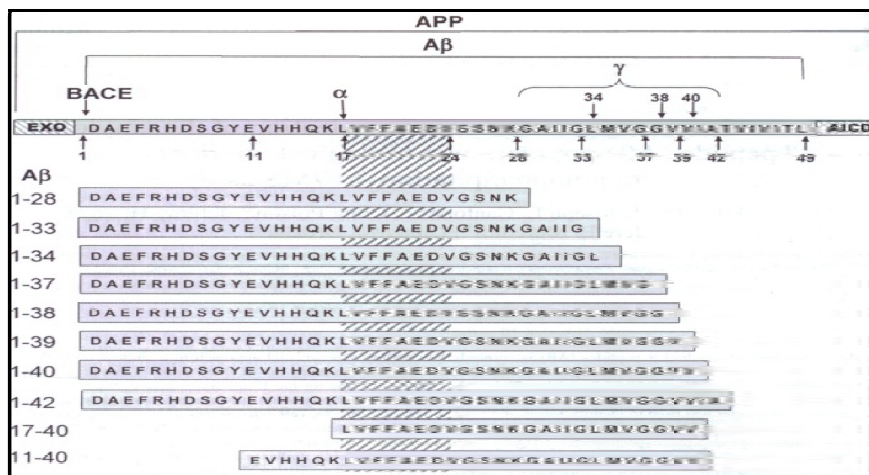


Figura 2 - Representação esquemática das espécies do peptídeo β -amiloide. (Ford Michael, 2008).

1.4. Metabolismo da PPA

No metabolismo da PPA, existem duas vias principais, uma amiloidogénica e uma não – amiloidogénica.

Na via não – amiloidogénica (figura 3), a PPA é processada pelas acções sequenciais da α - e da γ - secretases, não conduzindo à produção de $A\beta$ [7]. A α -secretase cliva dentro da sequência $A\beta$, entre os resíduos Lys16 e Leu17 [5] e libera o domínio extracelular solúvel longo da PPA (sPPA α), deixando o fragmento do α -C-terminal, [6, 25, 26] de 83 resíduos, fixo na membrana [5]. Em seguida, o fragmento α -C-terminal é clivado pela γ - secretase e libera o domínio intracelular da PPA (AICD) e o fragmento p3, de 3 KDa [5, 27].

Na via amiloidogénica (figura 4), PPA é processada pelas acções sequenciais da β - e da γ - secretases, conduzindo à produção de $A\beta$. Pela clivagem da β - secretase é liberado um domínio extracelular solúvel curto, sPPA β e deixa o fragmento do β -stub, [6, 25, 26] fragmento de 99 resíduos, fixo na membrana [5]. Em seguida, o fragmento β -C-terminal é clivado pela γ - secretase e libera o AICD e um peptídeo β -amiloide ($A\beta$) de 4KDa, com 40 ou 42 aminoácidos [5, 27]

O peptídeo β -amiloide de 4KDa oligomeriza para criar espécies tóxicas que causam comportamentos neurodegenerativos, estando associadas a uma presumível perda funcional dos metabolitos secretados da PPA, devido à formação das placas senis, características da DA [6, 25, 26].

Introdução

O peptídeo fibrilar β -amilóide insolúvel em células cerebrais é depositado extracelularmente em forma de placas na amígdala, hipocampo e neocórtex de indivíduos afectados pela DA [5].

A formação de $A\beta$ depende da temperatura, ATP e do PKC (proteína cinase C, envolvida em reacções de fosforilação) [28].

Da PPA após o processo proteolítico, obtêm-se três produtos, sendo um dentro da célula, que pode contribuir para DA, activando genes pelo processo designado por activação transcricional e dois fragmentos fora da célula, um destes fragmentos é o β -amilóide [5].

Fragmentos de PPA incluindo β -amilóide (β -C-terminal), podem exercer uma poderosa regulação em funções neuronais básicas, como excitabilidade celular e transmissão sináptica [29].

A γ -secretase parece ser um complexo que compreende, pelo menos, quatro proteínas: PS1 ou PS2 (o componente catalítico), NCT, PEN-2 e Aph-1. O β -stub e α -stub são substratos da γ -secretase. A proteólise por γ -secretase é heterogénea, produzindo em grande quantidade β -amilóide de 40 resíduos e em menor quantidade β -amilóide de 42 resíduos (altamente tóxico). O domínio intramembranar da PPA activa a sinalização nuclear [5, 25].

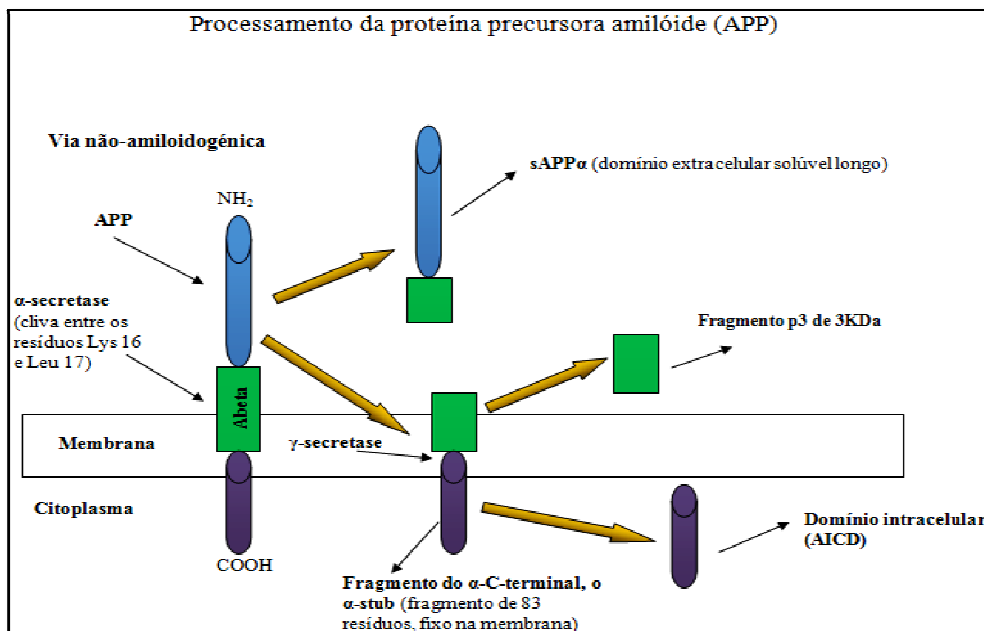


Figura 3 - Via não – amiloidogénica do metabolismo da PPA.

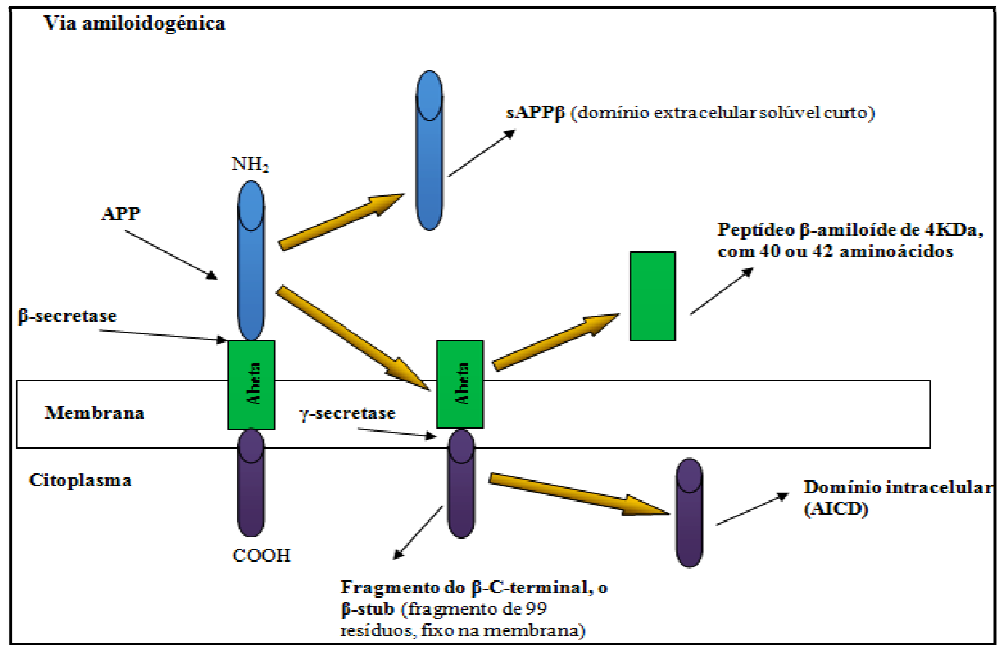


Figura 4 - Via amiloidogénica do metabolismo da PPA.

2. OBJECTIVOS

Objectivos

- Optimizar o método de transfecção de cDNA PPA695 com fosfato de cálcio, na linha celular COS-7
- Utilizar a técnica de co-imunoprecipitação para separar as proteínas que interagem com a PPA
- Identificar proteínas que ligam à PPA utilizando espectrometria de massa
- Caracterizar as proteínas que interagem com a PPA e relacioná-las com a DA

3. MATERIAIS E **MÉTODOS**

3.1 Cultura de células

A linha celular utilizada foi a COS-7, tendo sido mantida em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 3.7 g/l de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e 1% de solução antibiótico-antimicótico. As células COS-7 foram descongeladas com 7 passagens e mantidas em cultura a 37°C e 5% CO_2 . Para a realização experimental as células foram plaqueadas a 60-65% confluência aquando da transfecção e mantidas em DMEM com soro e sem antibiótico nem antimicótico.

3.2 Transfecção com fosfato de cálcio

As células foram transfectadas com diferentes concentrações de cDNA PPA695 com o objectivo de determinar a concentração óptima de transfecção para esta linha celular. Após otimizar esta técnica para as caixas com diâmetro de 42mm, extrapolou-se a concentração de transfecção a utilizar para as caixas com diâmetro de 100mm, com base no aumento da área relativa de superfície e segundo o protocolo do método de transfecção com fosfato de cálcio (¹). A concentração óptima de transfecção para as caixas de 42mm determinada foi de 4µg de DNA, assim sendo, para a transfecção da linha celular COS-7 com as caixas de 100mm, utilizou-se 25µg de DNA (¹). Para a realização experimental preparou-se as soluções de CaCl_2 e HBS 2x como descrito no anexo 1, utilizando-se 2M e 500µl de cada solução, respectivamente, para cada caixa.

As células não transfectadas serão o controlo das transfectadas e as transfectadas serão o controlo em relação ao tratamento com o peptídeo Aβ.

Após incubação dos precipitados à temperatura ambiente durante 30 minutos, estes foram adicionados às células, agitando-se bem para que não haja acidificação local das células (pH entre 7.2-7.4). Incubou-se as células com os complexos durante 24h a 37°C e 5% CO_2 . Após a transfecção as células COS-7 foram incubadas na presença ou ausência de 100µl do peptídeo Aβ25-35 20µM, por um período adicional de 24h.

¹ <http://www.flemingtonlab.com/Protocols/CalciumPhosphateTransf.pdf>

3.3 Determinação da proteína total

Após a realização das experiências as células foram lisadas e realizou-se a quantificação proteica utilizando-se o método BCA, para normalizar os lisados celulares e as amostras que serão posteriormente utilizadas para identificar proteínas que ligam à PPA, através de espectrometria de massa. Os lisados celulares contidos em caixas de 42mm, utilizados para optimização da concentração óptima de cDNA para transfecção das células COS-7, foram recolhidos no tampão de SDS 1% a ferver, enquanto que, as amostras para posterior identificação do interactoma da PPA, contidas em caixas de 100mm, foram recolhidas no tampão lise da co-immunoprecipitação (como descrito na secção 3.4).

O kit de Ensaio de Proteína BCA é um método simples, rápido e preciso para a detecção e quantificação colorimétrica de proteínas totais. Este método baseia-se na capacidade das proteínas reduzirem Cu^{2+} a Cu^+ em meio alcalino. A coloração púrpura resultante da reacção é formada pela interacção do reagente ácido bicínico (BCA) com o ião de cobre Cu^+ . Este complexo solúvel em água exhibe elevada absorvância a 562nm com resultados aproximadamente lineares, permitindo a quantificação de proteínas.

A análise quantitativa foi realizada utilizando-se 10 μ l de amostra em duplicado. Para a curva padrão preparou-se 6 diluições utilizando-se o padrão de albumina de soro bovino (BSA) (tabela 1). Os dois reagentes utilizados A e B foram misturados na proporção de 50:1 de A:B e aplicados nas amostras de proteínas a serem estudadas. Posteriormente, incubou-se a 37°C durante 30 minutos, medindo-se em seguida a absorvância das amostras a 562nm. Preparou-se a curva padrão das amostras e utilizou-se como referência para determinar a concentração proteica das amostras desconhecidas. Após a quantificação proteica e normalização das amostras, seguiu-se com as técnicas de SDS-PAGE e co-immunoprecipitação.

Materiais e Métodos

Tabela 1 - Tabela de preparação dos padrões de proteína.

Padrão	BSA (μ l)	SDS 10%	H ₂ O	Proteína (μ g)	A + B (mL)	Lisado da amostra (μ l)
P0	0	5	45	0	1	10
P1	1	5	44	2	1	10
P2	2	5	43	4	1	10
P3	5	5	40	10	1	10
P4	10	5	35	20	1	10
P5	20	5	25	40	1	10

3.4 Co-imunoprecipitação

As amostras que serão imunoprecipitadas e posteriormente analisadas por espectrometria de massa, após transfecção com fosfato de cálcio e incubação com ou sem o peptídeo A β , foram lavadas com 2xPBS e lisadas com 1ml de tampão lise (150 μ l de Tris-HCl 1M pH 8, 360 μ l de NaCl 1M, 0,12g de Chaps 4% e 2490 μ l de água) inibidores de proteases (66,37 μ l de PMSF 100X, 0,27 μ l de leupeptina, 8,92 μ l de pepstatina, 67,525 μ l de benzamidina e 16,21 μ l de aprotinina). Posteriormente, sonicou-se 3 vezes a 10 segundos cada amostra e em seguida colocou-se em gelo (para não degradar as proteínas pela acção das proteases).

Realizou-se duas imunoprecipitações sequenciais e para cada uma destas, efectuou-se três tipos de condições experimentais, amostra não transfectada, amostra transfectada com 25 μ g de DNA e amostra transfectada com 25 μ g de DNA e 100 μ l do peptideo A β 25-35 20 μ M. No primeiro conjunto experimental fez-se imunoprecipitação com o anticorpo primário 22C11 (anti-mouse) que reconhece especificamente o N-terminal da proteína PPA e no segundo com o anticorpo C-terminal (anti-rabbit) que reconhece especificamente o C-terminal da proteína PPA, obtendo-se seis amostras.

Na primeira imunoprecipitação efectuou-se o pré-clearance durante 1 hora a 4°C. Após centrifugar a 10.000g durante 1min rejeitou-se o "pellet". Em seguida, adicionou-se 20 μ l de 22C11 e 50 μ l de Sepharose G. As três experiências foram colocadas em rotação durante toda a noite (O.N.) a 4°C. No dia seguinte, os tubos foram centrifugados a 10.000g durante 3 minutos e retirou-se o sobrenadante após O.N., usando-se pontas

cortadas para não danificar os complexos. Os “pellets” foram lavados quatro vezes com 1ml de Tris 50 mM/NaCl 120 mM durante 15 minutos em rotação a 4°C e centrifugados 3 vezes a 10.000g durante 3 minutos. Após estes procedimentos retirou-se os sobrenadantes e obteve-se apenas os “pellets”. Estes “pellets” obtidos foram armazenados a -20°C, e subsequentemente utilizados para estudos por espectrometria de massa.

A segunda imunoprecipitação, iniciou-se com o sobrenadante retirado após O.N. da primeira imunoprecipitação, adicionando-o 3µl do C-terminal e 50µl de Sepharose A. Em seguida, iniciou-se o pré-clearance durante 1 hora a 4°C. Os três tubos foram centrifugados a 10.000g durante 1min e rejeitou-se o “pellet”. Os “pellets” foram lavados quatro vezes com 1ml de Tris 50 mM/NaCl 120 mM durante 15 minutos em rotação a 4°C e centrifugados 3 vezes a 10.000g durante 3 minutos. Após estes procedimentos retirou-se os sobrenadantes e obteve-se apenas os “pellets”. Estes “pellets” obtidos foram armazenados a -20°C, e subsequentemente utilizados para estudos por espectrometria de massa. No fim da experiência de co-imunoprecipitação temos seis condições experimentais diferentes.

3.5 Electroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Após normalização das amostras, como descrito anteriormente carregou-se 50µg de proteína para realizar a técnica de SDS-PAGE.

A electroforese é uma técnica que se baseia na separação de macromoléculas por aplicação de um campo eléctrico. Quando um campo eléctrico é aplicado a uma solução de proteínas, estas moléculas migram numa direcção e com uma velocidade que reflecte a sua carga e massa molecular, respectivamente. A separação de proteínas tornou-se possível com o desenvolvimento da electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), em que às amostras a separar é adicionado o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS), pelo que a que a técnica é designada por SDS-PAGE [30]. O detergente SDS é usado para desnaturar e conferir carga negativa às proteínas. A percentagem do gel e a escolha do tamanho dependem do peso molecular das proteínas a separar no gel.

Inicialmente, procedeu-se à montagem do sistema de electroforese com espaçadores de 0,75mm, para mini-geis. Preparou-se o gel de poliacrilamida a 6% SDS-PAGE (separador) (anexo 1) e aplicou-se no sistema com uma pipeta Pasteur logo após a adição de TEMED. Cobriu-se a superfície exposta do gel com água e deixou-se a polimerizar 30-60min à temperatura ambiente. A água sobreposta ao gel foi retirada e

preparou-se o gel de poliacrilamida a 3,5% SDS-PAGE (empacotamento) (anexo 1) aplicando-o logo após a adição do TEMED até à parte superior do contentor. Colocou-se o pente de 0,75mm de espessura e deixou-se polimerizar o gel 30-45min à temperatura ambiente.

Antes de carregar as amostras no gel, estas foram fervidas no tampão contendo SDS por 3 minutos para garantir a desnaturação das proteínas. As amostras preparadas, com uma quantidade proteica final de 50µg, foram carregadas no gel e as proteínas separadas a 90mA por 3-4 horas. Os padrões comerciais dos pesos moleculares das proteínas (Prestained SDS-PAGE Standards – Broad Range, Bio Rad) foram usados como marcadores.

3.6 Transferência das proteínas (“Western Blotting”)

Para possibilitar a imunodeteção com anticorpos específicos as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose. A membrana é colocada face-a-face com o gel e uma corrente eléctrica é aplicada entre as placas de cada lado. As proteínas carregadas movem-se do gel para a membrana, mantendo a mesma disposição que tinham no gel. Como resultado desse processo designado por “blotting”, as proteínas são expostas a uma fina camada para detecção. As membranas são escolhidas porque ligam-se a proteínas não especificamente.

Resumidamente, cortou-se uma membrana de nitrocelulose e 4 folhas de papel Whatman 3MM com o tamanho exacto do gel. Posteriormente, procedeu-se à montagem da sanduíche, pela seguinte ordem: sobre o ânodo do aparelho de transferência colocou-se a esponja, 2 folhas de papel Whatman, a membrana de nitrocelulose, o gel, 2 folhas de papel Whatman e por fim, uma outra esponja. A sanduíche foi imersa no tanque de electroforese, equipada com eléctrodos de platina e contendo o tampão de transferência. O sistema montado foi cuidadosamente pressionado de modo a retirar-se bolhas de ar que eventualmente diminuíssem o contacto entre o gel de poliacrilamida e a membrana.

A transferência das proteínas iniciou-se quando aplicada uma corrente constante ao sistema montado. Foi aplicada uma corrente de 100mA durante 4 horas e durante esse tempo as proteínas (carregadas negativamente devido ao SDS) migraram do gel para o ânodo, tornando-se fixas ao filtro de nitrocelulose. Após ocorrer a transferência das proteínas, removeu-se a membrana da sanduíche e deixou-se secá-la à temperatura ambiente.

3.7 Imunodeteccção das proteínas imobilizadas

Após a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose é realizado o bloqueio da membrana e incubação com o anticorpo primário, seguindo-se a incubação com o anticorpo secundário acoplado ao substrato quimioluminescente de revelação.

A ligação das proteínas à membrana é baseada em interações hidrofóbicas e de cargas entre a membrana e as proteínas. O bloqueio da ligação não específica é alcançado colocando-se a membrana em uma solução diluída de leite em pó magro, com uma pequena quantidade de detergente como o Tween 20. Para efectuar-se o bloqueio, as membranas foram mergulhadas em TBS-T (TBS com 0,1% Tween 20) com 5% de leite magro em pó, durante 3hrs em agitação à temperatura ambiente.

Incubou-se uma membrana com o anticorpo primário 22C11 e uma outra com o anticorpo primário C-terminal, durante toda a noite (O.N.) em agitação a 4°C. No dia seguinte, retirou-se os anticorpos primários e efectuou-se 3 lavagens com TBS-T de 10 em 10 minutos, com agitação à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se os anticorpos secundários às membranas e incubou-se durante 2hrs com agitação à temperatura ambiente. Retirou-se os anticorpos secundários e efectuou-se 3 lavagens com TBS-T de 10 em 10 minutos, com agitação à temperatura ambiente.

3.7.1 *Detecção proteica pelo método de quimioluminescência*

Durante o processo de detecção testa-se a membrana com anticorpos da proteína de interesse, ligando-se eles a uma enzima reveladora, a qual leva a uma mudança de cor.

O kit "ECL Plus Western Blotting Detection System" (Kit Amersham Pharmacia) é um método não reactivo utilizado para a detecção de antígenos específicos imobilizados. O ECL Plus produz uma emissão mais sensível à luz e de maior duração do que o ECL. O ECL Plus é um reagente de detecção quimioluminescente.

A membrana é incubada por 1 minuto à temperatura ambiente com a solução de detecção ECL PLUS do kit "ECL Plus Western Blotting Detection System", sendo esta solução preparada de fresco misturando na proporção de 1:1 os dois reagentes de revelação. O excesso da solução conteúdo o substrato quimioluminescente é removido e num quarto escuro, um filme de auto-radiografia (XAR-5 film, Kodak, Sigma Aldich) é colocado no topo da membrana, dentro de uma cassete de filme. A cassete é fechada e aguarda-se um período de tempo adequado. Em seguida, o filme é removido e colocado

pela seguinte ordem, numa solução de revelação (Kodak, Sigma Aldrich), em água e numa solução de fixação (Kodak, Sigma Aldrich).

3.8 Digestão com a Tripsina

Após a co-imunoprecipitação obteve-se seis “pellets” com diferentes condições experimentais. A estes seis “pellets” adicionou-se 250µl de uma solução de 50 mM de hidrogenocarbonato de amónio (NH_4HCO_3), em cada amostra. Para a digestão com a Tripsina utilizou-se 60µl de cada amostra e 20µl de Tripsina e incubou-se na estufa durante a noite. Em seguida, estas amostras foram filtradas para posteriormente proceder-se à separação por cromatografia líquida e análise por espectrometria de massa.

3.9 Separação por Cromatografia Líquida

Os reagentes químicos utilizados foram o acetonitrilo de qualidade-HPLC (Riedel, Seelze, Alemanha), ácido trifluoroacético (TFA; Fluka, Buchs, Suíça), guanidina (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha) e água desionizada (Mili-Q).

As análises da cromatografia líquida (LC) foram executadas usando-se um Ultimate 3000 (LcPackings). Vinte microlitros de cada amostra (3µg do extrato de peptídeo) foram injectados na nano coluna de LC, C18 (Zorbax 300SB-C18, tamanho da partícula 5 µm, 5 x 0.3 mm, Agilent Technologies) usando-se o modo automático. A amostra foi lavada sobre a nano coluna de LC por 3 minutos com o tampão A de 95% (água, 0.1% TFA) e o tampão B de 5% (acetonitrilo, 0.1% TFA) em uma taxa de fluxo de 30 µl/min. Inverteu-se o fluxo sobre a nano coluna de LC e eluí-se a amostra em uma coluna analítica capilar C18 para 150 mm x 75 µm de Zorbax 300SB com o tamanho da partícula a 3.5 µm (Agilent Technologies), em uma taxa de fluxo de 0.3 µl/min. Executou-se o gradiente linear do tampão B de 5% para o tampão B de 55% ao longo de um período de 35 minutos.

A nano coluna LC foi lavada com um gradiente durante 3 minutos de 55 % para 90% de tampão B e em seguida com 5 min do tampão B de 90 %. A coluna foi re-equilibrada em tampão B de 5% antes das futuras análises. Os peptídeos que eluem fora da coluna capilar monolítica foram depositados directamente em 384 placas de MALDI nos intervalos de 20s para cada ponto, usando-se um micro-colector de fracções (Probot

LcPackings) que adiciona 170 nL da solução da matriz do α -CHCA (preparada diluindo o α -CHCA saturado com o 70 % acetonitrilo/0.1 % TFA e com a adição de 10fmol de Glu-Fib, como padrão interno).

3.10 Análise por espectrometria de massa

Os espectros de peptídeos foram obtidos em um espectrómetro de massa MALDI-TOF/TOF (4800 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems, Europe) em modo de reflectrão ião positivo e na escala de massas entre 700 e 4500 Da com 1500 tiros de laser ca. Para cada ponto da amostra, criou-se um método dependente de aquisição para seleccionar os seis picos mais intensos, com exclusão dos picos da matriz, da autólise da tripsina, ou dos picos da acrilamida, para aquisição de dados por MS/MS. Os picos da autólise da tripsina foram usados para a calibração interna dos espectros de massa, permitindo uma melhor exactidão rotineira de massas 20 ppm.

3.11 Procura na base de dados

Os espectros foram processados e analisados pela estação de trabalho global do usuário da proteína (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), que usa o software interno Mascot (Matrix Science Ltd, U.K.) procurando-se as impressões digitais (fingerprints) das massas dos peptídeos (PMF) e dados de MS/MS. O PMF foi utilizado para identificar proteínas provenientes dos fragmentos dos peptídeos digeridos pela Tripsina.

As buscas foram executadas de encontro à base de dados de proteínas da SwissProt (2006.09.28) para primatas. A tolerância do MS para iões precursores foi de 40 ppm e de 0.3Da para iões fragmento. A identificação das proteínas foi considerada para um nível de confiança igual ou superior a 97%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Optimização da concentração de DNA para transfectar em células COS-7

As células COS-7 foram transfectadas com diferentes concentrações de cDNA PPA695, com o objectivo de determinar a concentração óptima de transfecção para esta linha celular, usando-se o método de transfecção com fosfato de cálcio. Para tal, utilizou-se seis amostras com concentrações crescentes de cDNA PPA695 de 0 a 5µg (lisados celulares). Após determinação e normalização do conteúdo proteico das amostras pelo método BCA (4.1.1), separação por SDS-PAGE e imunodeteccção (4.1.2) foi possível determinar a concentração óptima de transfecção nas caixas de 42mm. A concentração óptima de transfecção nas caixas de 42mm foi 4µg de DNA e por extrapolação, com base no aumento da área relativa de superfície e segundo o protocolo do método de transfecção com fosfato de cálcio (www.flemingtonlab.com), a concentração de transfecção a utilizar para as caixas de 100mm seria 25µg de DNA.

4.1.1 Quantificação proteica pelo método BCA

Após transfecção foi possível determinar a quantidade proteica nos diferentes lisados de seis concentrações crescentes de cDNA PPA695 de 0 a 5µg (tabela 2), utilizando o método BCA, para posterior análise por SDS-PAGE e imunodeteccção.

Para o cálculo dos valores das massas foram utilizados os valores da recta de linearização, obtidos no gráfico da absorvância em função da quantidade de proteína na amostra (figura 5). Enquanto que, os valores das concentrações foram obtidos através da fracção entre o valor da massa proteica e o volume de amostra, utilizado para o método BCA.

Resultados e Discussão

Tabela 2 – Resultados obtidos da quantidade proteica nos lisados celulares, pelo método BCA.

Volume (ul) amostra	Amostra [cDNA PPA695] (ug)	Abs (media)	Massa Proteica (ug)	Concentração Proteica (ug/ μ l)
10	0	0,311	19,12	1,91
10	1	0,298	18,33	1,83
10	2	0,271	16,73	1,67
10	3	0,333	20,42	2,04
10	4	0,257	15,89	1,59
10	5	0,312	19,12	1,91

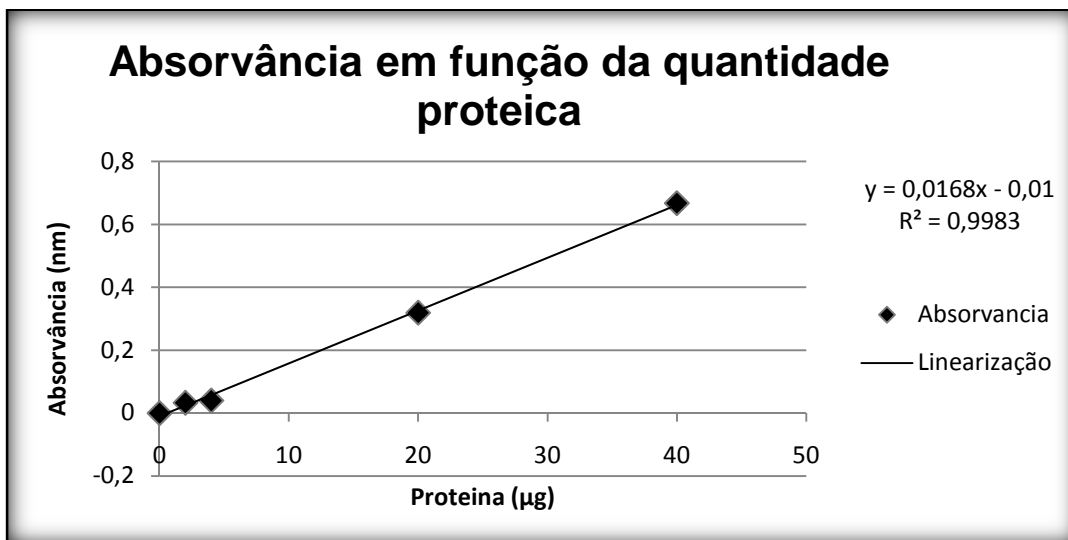


Figura 5 - Gráfico de quantificação proteica nos lisados celulares.

4.1.2 SDS-PAGE e imunodeteção da PPA

Neste procedimento foi utilizado em cada amostra uma quantidade proteica de 50 μ g. Após a separação das proteínas por SDS-PAGE e imunodeteção com o anticorpo 22C11, foi possível determinar que a concentração óptima para a transfecção seria de 4 μ g de DNA (figura 6). Com a utilização desta concentração de DNA obteve-se um aumento dos níveis de transfecção de PPA695, dos níveis extracelulares das isoformas matura e imatura, cujos pesos moleculares são superiores ao das endógenas.

Resultados e Discussão

Apesar de estar representado na figura 6 apenas a isoforma PPA695, a transfectada neste estudo, o anticorpo 22C11, reconhece igualmente as isoformas PPA770 e PPA751 nas suas formas maduras e imaturas. Tendo as isoformas PPA770 /PPA751 peso molecular superior à isoforma PPA695.

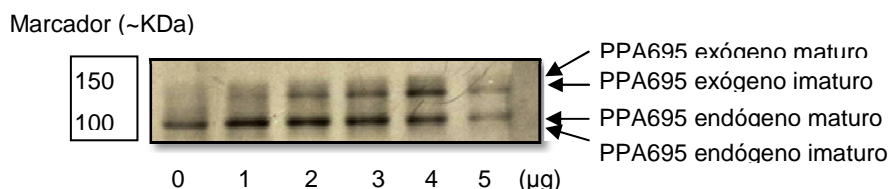


Figura 6 - Níveis de transfecção de PPA695 em células COS-7. As células foram transfectadas com concentrações crescentes de DNA de 0 a 5µg (da esquerda para a direita, respectivamente), em lisados celulares separados por SDS-PAGE e imunoprecipitado por 22C11.

4.2 Amostras para posterior identificação das proteínas que ligam à PPA

Após a optimização da concentração óptima de transfecção em caixas de 42mm extrapolou-se para caixas de 100mm, utilizando-se as amostras contidas nas caixas de 100mm para imunoprecipitação com o objectivo de isolar as proteínas que interagem com a PPA, para posterior identificação proteica de cada amostra, por espectrometria de massa.

Temos três diferentes condições experimentais para cada imunoprecipitação (anticorpos utilizados, 22C11 e GFP): amostra não transfectada (N TxF), amostra transfectada (TxF) e amostra transfectada com adição do peptídeo A β (TxF+A β).

4.2.1 Quantificação proteica pelo método BCA

Após transfecção e incubação com ou sem o péptido A β foi determinada a quantidade proteica em cada amostra, que posteriormente, foram utilizadas para a técnica de espectrometria de massa (tabela 3). Este procedimento permitiu a normalização da quantidade proteica em cada amostra, para posterior análise por SDS-PAGE e imunodeteção da PPA.

Pelos resultados apresentados na tabela 3, referentes à medição de absorvância das amostras, a concentração obtida na amostra de controlo não transfectado foi de 2,85µg/µl

Resultados e Discussão

e nas amostras transfectadas de 2,67 μ g/ μ l. Obtendo-se, respectivamente, 28,5 μ g e 26,7 μ g de proteína total em 1,0 ml de lisado celular, em placas de 100mm. Para o cálculo dos valores das massas foram utilizados os valores da recta de linearização, obtidos no gráfico da absorvância em função da quantidade de proteína na amostra (figura 7). Enquanto que, os valores das concentrações foram obtidos através da fracção entre o valor da massa proteica e o volume de amostra, utilizado para o método BCA.

Com a transfecção os níveis intracelulares de PPA695 na célula aumentaria significativamente, cerca de 10x (estabelecido no laboratório), variando com a eficiência da transfecção, no entanto, deve se ter em conta as lavagens que foram realizadas durante a co-immunoprecipitação que provocam a perda de alguma proteína.

Tabela 3 – Resultados obtidos das amostras para posterior identificação do interactoma da PPA, pelo método BCA

Volume (μ l) amostra	Amostra para identificação do interactoma da PPA	Abs (media)	Massa Proteica (μ g)	Concentração Proteica (μ g/ μ l)
10	Não transfectada	0,479	28,53	2,85
10	Transfectada	0,448	26,71	2,67
10	Transfectada + peptídeo A β	0,448	26,71	2,67

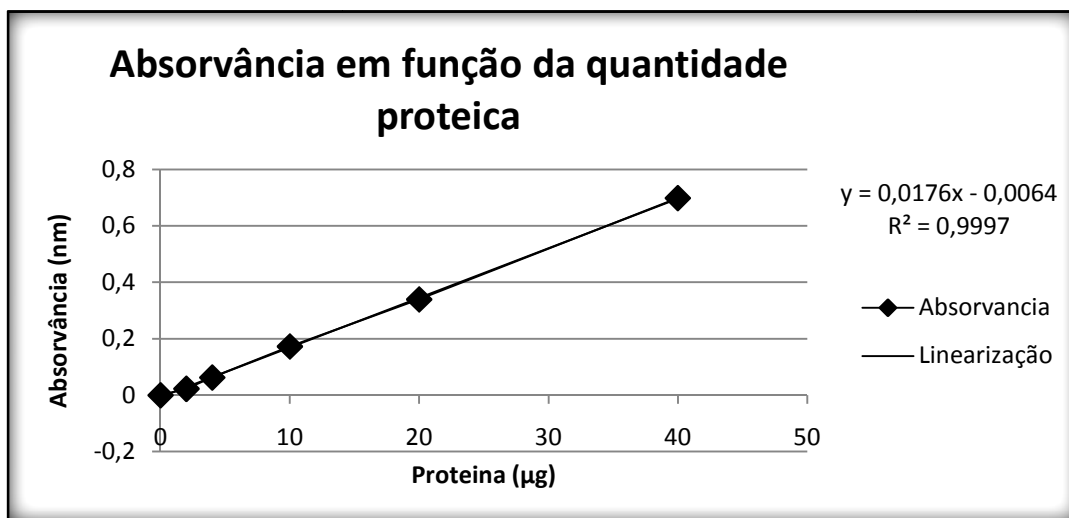


Figura 7 - Gráfico de quantificação proteica nas amostras para posterior identificação do interactoma da PPA.

4.2.2 SDS-PAGE e imunodeteccção da PPA

Após transfecção e incubação com ou sem o peptídeo A β as células COS-7 foram lisadas e as amostras obtidas submetidas a SDS-PAGE e imunodeteccção. Neste procedimento foi utilizado em cada amostra uma quantidade proteica de 50 μ g.

As figuras 8 e 9 apresentam os resultados obtidos por imunodeteccção, utilizando os anticorpos 22C11 e o GFP, respectivamente. O anticorpo 22C11, anti-mouse, pode reconhecer os fragmentos sPPA, resultantes do processamento da PPA, o sPPA α e o sPPA β (domínios extracelulares de PPA), e as isoformas madura e imatura da proteína PPA. Na figura 8, observou-se que após transfecção ocorre um aumento dos níveis das isoformas madura e imatura de PPA695 transfectadas, comparativamente com a amostra não transfectada (controlo, Não TxF). Na amostra transfectada e com adição do peptídeo A β (TxF+A β) observou-se a diminuição dos níveis das isoformas madura e imatura de PPA695 transfectadas, comparativamente com a amostra transfectada (TxF). A diminuição dos níveis das isoformas madura e imatura de PPA695 transfectadas, deve-se ao facto do peptídeo A β afectar os níveis de PPA, afectando o seu processamento [1].

Apesar de estar representado na figura 8 apenas a isoforma PPA695, a transfectada neste estudo, o anticorpo 22C11, reconhece igualmente as isoformas PPA770 e PPA751 nas suas formas maduras e imaturas. Tendo as isoformas PPA770 /PPA751 peso molecular que a isoforma PPA695.

Nas amostras imunoprecipitadas com o anticorpo GFP (figura 9), foi possível detectar as formas exógenas (transfectadas) porque apenas estas possuem a proteína PPA com o GFP (“green fluorescent protein”).

Quer nas formas endógenas, quer nas formas transfectadas (exógenas), a forma madura de PPA695 apresenta maior peso molecular que a forma imatura, pois é N- e O-glicosilada, enquanto que, a forma imatura é apenas N-glicosilada.

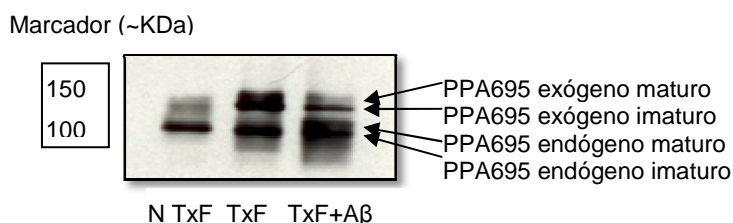


Figura 8 - SDS-PAGE de amostras imunoprecipitadas com o anticorpo 22C11.

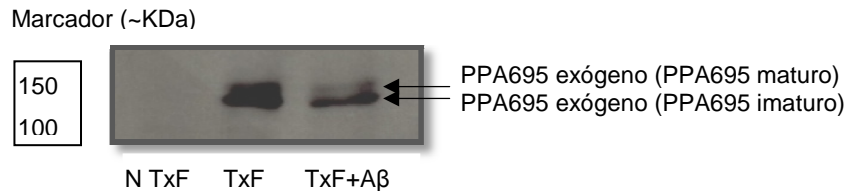


Figura 9 - SDS-PAGE de amostras imunoprecipitadas com o anticorpo GFP.

4.3 Identificação de proteínas por espectrometria de massa

Os dados de MALDI-TOF-MS foram usados para procurar as proteínas que ligam à PPA de cada amostra na base de dados, para a identificação de cada proteína e sendo posteriormente caracterizadas e relacionadas com a DA. No entanto, só foi possível obter resultados de três amostras, sendo estas a amostra transfectada e a não transfectada e imunoprecipitadas com o anticorpo C-terminal e amostra transfectada e imunoprecipitada com o anticorpo 22C11. As amostras onde não foi possível obter a identificação das proteínas que ligam à PPA por espectrometria de massa, foram apenas utilizadas para observar a diminuição dos níveis das isoformas madura e imatura de PPA695 transfectada, pela técnica de SDS-PAGE, na amostra transfectada e com adição do peptídeo A β , comparativamente com a amostra apenas transfectada.

As proteínas foram divididas de acordo com a sua localização subcelular, o núcleo e o citoplasma. Nas tabelas 4,5 e 6, é possível observar as proteínas identificadas com os respectivos valores de percentagem de confiança da sequência para cada proteína (Score C.I. %), pesos moleculares calculados e observados, com os respectivos desvios associados (Δ ppm) e valores dos pontos isoelétricos (P.I.). Nessas tabelas, é igualmente observável, a melhor sequência de peptídeo encontrada para cada proteína.

4.3.1 *Proteínas identificadas para a amostra não-transfectada e imunoprecipitada com o anticorpo C-terminal*

Na amostra não-transfectada e imunoprecipitada com o anticorpo C-terminal foi possível identificar as seguintes proteínas (tabela 4): Histona H4, Nucleolina, Albumina sérica, Tripsina, Queratinas tipo 2 e tipo 1. Nenhuma proteína identificada nesta amostra apresentou um tipo de modificação pós-transducional.

Resultados e Discussão

Tabela 4 - Tabela de proteínas identificadas por espectrometria de massa da amostra não - transfectada e imunoprecipitada com o anticorpo C-terminal.

Nome da Proteína	Score C.I. %	MW	PI	Número de acesso	Melhor Sequencia Peptídica	Massa Observada	Massa calculada
Queratina tipo II	100	65977,98	7,62	K2C1_PANTR	(514) GGGGGGYGSGGSSYGS GGGGGGGR (544)	2383,98	2383,95
Queratina tipo I	100	59474,91	5,13	K1C10_HUMAN	(323) SQYEQLAEQNRK (334)	1707,78	1707,77
Trispina	100	24393,81	7	TRYP_PIG	(164) ITGNMICVGFLEGGKDISC (181)	1843,92	1843,84
Histona H4	100	11360,38	11,36	H4_HUMAN	(47) ISGLIYEETR (56)	1180,62	1180,62
Nucleolina	100	76812,43	4,6	NUCL_PONAB	(580) GLSEDTTEETLKESFDGSRV (599)	2199,91	2200,03
Albumina sérica	99,1	69248,54	5,82	ALBU_BOVIN	(353) FLYEYSR (359)	977,48	977,47

4.3.2 Proteínas identificadas para a amostra transfectada e imunoprecipitada com o anticorpo C-terminal

Na amostra transfectada e imunoprecipitada com o anticorpo C-terminal, é possível a detecção de proteínas que interagem especificamente com o C-terminal da PPA e proteínas que poderão não ter relação com a DA, obtendo-se os seguintes resultados (tabela 5): as proteínas Histonas H4, H2B, H2A, H1.1, H3.1, a Stress-70 mitocondrial e as Queratinas tipo 2 e tipo 1. Nenhuma proteína identificada nesta amostra apresentou um tipo de modificação.

Tabela 5 - Tabela de proteínas identificadas por espectrometria de massa da amostra transfectada e imunoprecipitada com o anticorpo C-terminal.

Nome da Proteína	Score C.I. %	MW	PI	Número de acesso	Melhor Sequencia Peptídica	Massa Observada	Massa calculada
Queratina tipo II	100	65977,98	8,16	K2C1_HUMAN	(519) GGGGGGYGSGGSSYGS GGSYGSGGGGGGR (549)	2384,02	2383,95
Queratina tipo I	100	59474,91	5,13	K1C10_HUMAN	(323) SQYEQLAEQNRK (334)	1493,74	1493,73
Histona H4	100	11360,38	11,36	H4_HUMAN	(25) DNIQGITKPAIR (36)	1325,74	1325,75
Histona H2B	100	13927,57	10,31	H2B1F_MOUSE	(35) KESYSVYVYK (44)	1265,60	1265,64
Histona H2A	100	14096,94	11,05	H2A1C_RAT	(83) HLQLAIR (89)	1672,78	1672,81
Stress-70 mitocondrial	99,79	73695,71	5,97	GRP75_BOVIN	(378) SDIGEVLVGGMTR (391)	944,53	944,53
Histona H1.1	98,89	21828,87	10,99	H11_HUMAN	(202) PKTAKPKKAAPKKK (215)	1446,76	1446,75
Histona H3.1	95,52	15394,48	11,13	H31_BOVIN	(65) KLPFQR (70)	1107,57	1107,57

Resultados e Discussão

4.3.3 Proteínas identificadas para a amostra transfectada e imunoprecipitada com o anticorpo 22C11

Para a amostra transfectada e imunoprecipitada com o anticorpo 22C11, foram identificadas proteínas que interagem especificamente com o N-terminal da PPA e proteínas que poderão não ter relação com a DA obtendo-se os seguintes resultados (tabela 6): a α -Actina, a β -Actina, a Vimentina, a α -Tubulina, a β -Tubulina, as proteínas Ribossomais 60S de L6, L13, L4 (CAG-ISL 7), L4 (L1), L17, L10 e L15, as proteínas Ribossomais 40S de S18, S4, S16 e S15, as proteínas Histonas H2B. 1 A, H4, H2A.o (H2A/o) (H2A.2) (H2a-615), H2A.o (H2A/o) (H2A.2) (H2a-615), H2A.z (H2A/z), H3/b e H1.3 (Histone H1c), a Stress-70 mitocondrial, as Ribonucleoproteínas heterogêneas A2/B1 (hnRNP A2 / hnRNP B1), a Albumina sérica, a Fibrilarina, o factor de alongação 1- α , a proteína com domínio “zinc-finger” e as proteínas Queratinas tipo 2 e tipo 1.

Apenas a proteína Ribossomal 60SL6 apresentou uma modificação, sendo especificamente uma oxidação.

Tabela 6 - Tabela de proteínas identificadas por espectrometria de massa da amostra transfectada e imunoprecipitada com o anticorpo 22C11.

Nome da Proteína	Score C.I. %	MW	PI	Número de acesso	Melhor Sequencia Peptídica	Massa Observada	Massa calculada
β - Actina	100	41709,73	5,29	ACTB_CERAE	(360) QEYDESGPSIVHR (372)	1516,7	1516,71
Vimentina	100	53484,04	5,06	VIME_PANTR	(50) SLYASSPGGVYATR (63)	1428,71	1428,71
Tubulina K- α -1	100	50103,64	4,98	TBAK_PANTR	(216) NLDIERPTYTNLNR (229)	1718,88	1718,89
Proteína Ribossomal 60S L6	100	32576,59	10,59	RL6_HUMAN	(95) VGGDKNGGTRVVKL RKMPRYYPTE (118)	2737,34	2737,46
Tubulina β -2	100	49638,97	4,78	TBB2_MACMU	(47) ISVYYNEATGGK (58)	1301,63	1301,64
α -Actina	100	42023,85	5,23	ACTS_HUMAN	(71) YPIEHGIITNWDDMEK (86)	1960,89	1960,92
Histona H2B.1 A	100	13766,52	10,32	H2BA_HUMAN	(59) MGIMNSFVNDIFER (72)	1672,76	1672,78
Histona H4	100	11229,34	11,36	H4_HUMAN	(24) DNIQGITKPAIR (35)	1325,75	1325,75
Stress-70 mitocondrial	100	73634,77	5,87	GRP75_HUMAN	(174) MKETAENYLGHAK (187)	1592,76	1592,78
Ribonucleoproteínas nucleares	100	37406,73	8,97	ROA2_HUMAN	(326) NMGGPYGGGNYGPGGSG GSGGYGGR (350)	2189,9	2189,91
Histona H2A.2	100	13955,85	10,9	H2AO_HUMAN	(100) VTIAQGGVLPNIQAVLLPK (118)	1931,14	1931,17
Histona H2A.z	100	13413,51	10,58	H2AZ_HUMAN	(23) AGLQFPVGR (31)	944,54	944,53
Albumina sérica	100	69321,49	5,92	ALBU_HUMAN	(438) KVPQVSTPTLVEVSR (452)	1639,94	1639,94

Resultados e Discussão

Nome da Proteína	Score C.I. %	MW	PI	Número de acesso	Melhor Sequencia Peptídica	Massa Observada	Massa calculada
Queratina, tipo I	100	59482,87	5,13	K1CJ_HUMAN	(236) LKYENEVALR (245)	1234,68	1234,68
Histona H3/b	100	15201,43	11,26	H3B_HUMAN	(41) YRPGTVALR (49)	1032,6	1032,59
Queratina, tipo II	100	53510,08	5,52	K2C1_HUMAN	(381) LALDIEIATYR (391)	1277,72	1277,71
Proteína Ribossomal 60S L15	100	24000,04	11,62	RL15_HUMAN	(77) GATYGKPVHHGVNQLK (92)	1705,9	1705,91
Proteína Ribossomal 40S S4	100	29448,01	5,14	RS4X_HUMAN	(191) IGVITNRERHPGSDVHVHK DANGNSFATRLS (222)	3493,89	3493,8
Proteína Ribossomal 60S L13	100	24115,48	10,94	RL13_HUMAN	(21) VATWFNQPAR (30)	1189,62	1189,61
Proteína Ribossomal 60S L14	100	23143,9	10,21	RL14_HUMAN	(11) VAYVSGPHAGK (22)	1232,64	1232,64
Proteína Ribossomal 40S S16	100	16304	10,39	RS16_HUMAN	(106) EIKDILIQYDR (116)	1405,76	1405,77
Proteína Ribossomal 40S S15	100	16898,13	10,18	RS15_HUMAN	(65) EAPPMEKPEVVK (76)	1353,7	1353,71
Fibrilarina	98	33763,42	11,07	FBRL_HUMAN	(305) GVDLDQLLDMSYEQL MQLYSAR (318)	1533,86	1533,85
Proteína Ribossomal 60S L4	98	47667,43	11,02	RL4_HUMAN	(238) LKLAPGGHVGGRF (249)	1251,74	1251,736
Histona H1.3	97	22205,28	9,1	H13_HUMAN	(155) PKKVKKP (161)	824,58	824,57
Factor 1- α de elongação	97	50109,11	9,1	EF1A1_HUMAN	(85) YVVTIIDAPGHR (96)	1404,72	1404,73
Proteína Ribossomal 60S L17	97	21252,29	10,18	RL17_HUMAN	(153) EQIVPKPEEEVAQK (166)	1623,84	1623,86
Proteína com domínio "zinc-finger"	100	130550,7	6,8	ZSWM5_HUMAN	(714) ILLLEGG (720)	714,31	714,44

4.4 Caracterização das proteínas identificadas e a sua relação com a DA

4.4.1 A proteína Actina

O citoesqueleto presente em todos os eucariontes é constituído por três tipos de elementos responsáveis pela sustentação e movimento intracelular, filamentos intermediários, microfilamentos de Actina e microtúbulos. Os microfilamentos de Actina têm um papel estrutural e interagem com proteínas motoras, principalmente a Miosina, tendo um papel na contracção celular e muscular. Os microfilamentos com diâmetro entre 5 a 6 nm são formados por duas cadeias helicoidais de F-Actina (Actina filamentosa) [31]. A Actina é uma fosfoproteína globular, de 41737 Da que participa em várias funções celulares importantes, incluindo a contracção muscular, movimento da vesícula,

organização membranar, migração neuronal, adesão, divisão, morfologia, citocinese e sinalização [32, 33]. Alterações na dinâmica da proteína Actina têm consequências importantes em todos os tipos de células, em especial nos neurónios, podendo conduzir a perdas sinápticas e disfunções neuronais, sendo estas alterações estruturais características da DA [34-36].

Nos animais vertebrados existem três principais isoformas de Actina, a alfa, a beta e a gama. As β -Actina e α -Actina presentes no músculo esquelético, localizam-se a nível subcelular no citoesqueleto e citoplasma, respectivamente. As β -Actina e γ -Actina coexistem como componentes do citoesqueleto e como mediadores da mobilidade interna da célula. A proteína α -Actina possivelmente interage com a proteína PPA, participando ambas em várias funções celulares, nomeadamente no transporte axonal, formação de sinapses, migração neuronal e adesão [34-36].

Com o auxílio de ferramentas bioinformáticas, utilizando-se o software “Information hyperlinked over proteins” (iHOP) é possível visualizar-se uma interação entre a proteína α -Actina e a proteína PPA (figura 10).

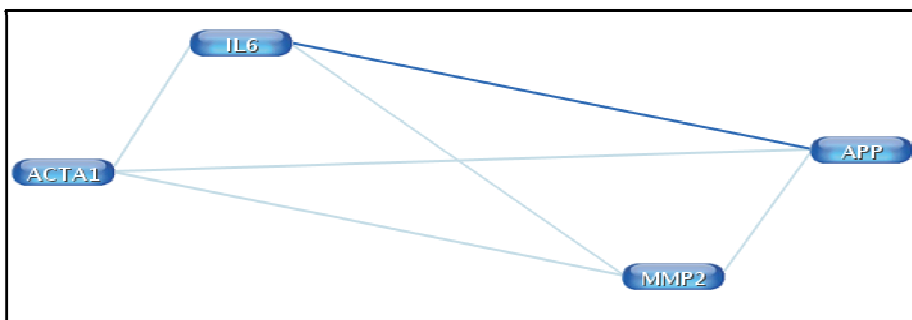


Figura 10 - Diagrama da interação da proteína Actina (ACTA1) com a proteína PPA.

4.4.2 A proteína Tubulina

A Tubulina é uma proteína globular, sendo as α -Tubulina e β -Tubulina proteínas constituintes dos microtúbulos e os membros mais usuais da família. Os microtúbulos são formados apenas por dímeros de α - e β -Tubulina, que ligam-se ao GTP e agregam-se na extremidade (+) dos microtúbulos, enquanto ainda ligados ao GTP. Após a incorporação, a molécula de GTP é hidrolisada em GDP. Os microtúbulos são estruturas que ajudam na sustentação celular e no movimento intracelular, actuando como vias onde os organelos se deslocam, com o auxílio das proteínas motoras, como a Cinesina e a Dineína. Os

microtúbulos participam em diversas funções das células, incluindo a divisão, transporte de organelos, característicos dos cílios e flagelos [31]. Os microtúbulos são os filamentos do citoesqueleto dos neurónios, localizados especificamente nos axónios e têm um diâmetro entre 20 a 25 nm [12, 28, 35, 37, 38].

Em condições neurodegenerativas, a perda de microtúbulos determina alterações estruturais e funcionais, conduzindo à morte celular e à formação de emaranhados neurofibrilares (formados por uma alteração do estado de fosforilação de proteínas associadas a microtúbulos, sendo uma delas a proteína Tau). A presença de emaranhados neurofibrilares é considerada fundamental para o desenvolvimento da DA, e sua concentração e distribuição têm sido correlacionadas com a gravidade da demência. A proteína Tau promove a polimerização da proteína Tubulina *in vitro* e a agregação de microtúbulos *in vivo*. A β -Tubulina é uma proteína microtubular hiperfosforilada na DA e possivelmente interage com a proteína PPA [12, 28, 35, 37, 38].

4.4.3 A proteína Vimentina

A Vimentina é uma fosfoproteína de 53653 Da, constituinte dos filamentos intermediários, que existe em fibroblastos, glóbulos brancos e em células musculares, geralmente formando polímeros entre si ou associada a outras proteínas, como a Desmina [39]. A Vimentina encontra-se em tecidos, incluindo a pele e pode sofrer alterações por acetilação .

Os filamentos intermediários têm um diâmetro intermédio (7 a 11 nm) entre os filamentos de actina e os microtúbulos. Os filamentos intermediários têm um aspecto de cordas e mantêm as células resistentes ao stress mecânico, pois são muito resistentes e flexíveis, sendo particularmente importantes em células que não tenham exoesqueleto. São estruturas relacionadas com a sustentação celular e não com o movimento celular. São extremamente insolúveis e formam uma rede estrutural que conecta com as membranas celulares, organelos citoplasmáticos e o núcleo [39]. Os filamentos intermediários nas células dos vertebrados são distribuídos nos tecidos da seguinte forma: Citoqueratinas (tecido epitelial), Vimentina (tecido mesenquimal), Desmina (tecido muscular) e neurofilamentos (neurónios). Os filamentos intermediários são constituídos por vários tipos de proteínas, existindo cerca de 65 tipos diferentes de proteínas que compõem os filamentos intermediários. Os filamentos intermediários são constituídos por um único tipo destas proteínas ou por combinações entre várias. O tipo de proteína que

constitui o filamento intermediário é muito específico do tipo de célula e da função que essa desempenha [39].

O alto grau de insolubilidade da Vimentina sugere a sua função estrutural no citoplasma. A Vimentina é localizada em células de origem mesodérmica e pode estar associada a processos como a tumorigenese, invasão celular e metástase. Algumas evidências bioquímicas e morfológicas indicam que os filamentos de Vimentina estão associados à membrana nuclear e plasmática, mantendo a posição do núcleo e do fuso mitótico, durante a vida da célula. Durante a mitose, a Vimentina sofre fosforilação no seu domínio N-terminal e dispersa-se em agregados, contendo formas filamentosas [39]. Uma vez que os filamentos intermediários são os principais componentes da matriz intracelular, distúrbios na sua síntese, renovação ou organização estrutural podem ser observados, sendo comuns de doenças neurodegenerativas, nomeadamente na DA [39].

A localização da proteína Vimentina e do péptido A β 42 é comum no córtex cerebral, cerebelo e no hipocampo. Adicionalmente, os neurónios pertencentes às regiões do cérebro afectadas pela DA, expressam a proteína Vimentina, provocando o deposição intraneuronal e extracelular do péptido A β 42, enquanto que as outras regiões do cérebro não afectadas, não expressam essa proteína. A quantidade da proteína Vimentina aumenta proporcionalmente com a evolução da doença. Quando ocorrem danos neuronais, como perdas sinápticas e retracção dos dendritos, a Vimentina é expressa e transportada para os dendritos com o objectivo de restabelecer as sinapses [40].

4.4.4 A proteína Histona

As Histonas são as principais proteínas que compõem a cromatina, localizando-se no núcleo das células eucariontes. Actuam como matriz, na qual o DNA se enrola e têm um papel importante na regulação dos genes. Geralmente, os genes mais activos têm menos Histonas ligadas, durante a interfase as Histonas estão intimamente associadas a genes inactivos. Ao compactarem o DNA, permitem que o genoma eucarionte de grande dimensão permaneça dentro do núcleo das células. As Histonas podem sofrer modificações pós-translacionais essencialmente nos N-terminais e também nos domínios globulares, incluindo metilação, acetilação e fosforilação [31].

As Histonas são ricas em aminoácidos como a lisina e arginina, solúveis em água, insolúveis em amónia diluída e não são coaguláveis pelo calor. As Histonas, sendo básicas, estabelecem ligações iónicas com substâncias ácidas, como a hemoglobina e ácidos nucleicos [31]. A estrutura das Histonas tem sido bem conservada em termos

evolutivos e são conhecidas 5 classes de Histonas: H1, H2A, H2B, H3 e H4. As Histonas H1.3 têm um peso molecular de 22350 Da, as Histonas H2A.2 14135 Da e as Histonas H2B.1 A 13950 Da. As Histonas H2A e H2B são ricas em lisinas. As Histonas H3 de 15404 Da e H4 de 11367 Da são ricas em arginina.

As Histonas são fosfoproteínas, reguladoras da transcrição e através da acetilação activam ou desactivam a transcrição dos genes. O nucleosoma é um octamero de Histona que contem duas moléculas, cada uma, de H2A, H2B, H3 e de H4, formando um heterotetramero H3-H4 e dois heterodimeros de H2A-H2B. O octamero envolve aproximadamente 147 pares de bases (bp) do DNA [31].

4.4.5 A proteína Stress-70 mitocondrial

A proteína Stress-70 mitocondrial encontra-se em tecidos do músculo, fígado e cérebro, desempenhando funções no controle da proliferação celular, no envelhecimento celular e no processo anti-apoptose, podendo actuar semelhantemente como as proteínas chaperonas [41].

As proteínas Chaperonas estando sempre associadas a outras proteínas, hidrolisam ATP para desenovelar proteínas, usando esta energia para auxiliar o enovelamento proteico de forma correcta ou no local correcto ou encaminhando a proteína à destruição, caso não seja possível atingir a sua configuração correcta [42-44]. As Chaperonas regulam interacções proteína-proteína, suprimem a apoptose, a neurotoxicidade, interagem com proteínas chaves das vias que regulam o ciclo celular e a inflamação. Devido às funções que exercem, em neurónios do hipocampo reduzem a agregação e alterações estruturais de proteínas e desempenham efeitos neuroprotectores no cérebro, sendo por isso, consideradas potenciais proteínas no tratamento de doenças neurodegenerativas, como a DA [45-48].

Um sistema de fosforilação desequilibrado é reconhecido como a principal razão da DA, ocorrendo hiperfosforilação de proteínas do citoesqueleto. No entanto, pouco se conhece sobre os mecanismos que causam esta hiperfosforilação proteica. Estudos demonstram que níveis elevados de proteína Stress-70 mitocondrial, são observados em cérebros com a DA. Sugerindo-se que a proteína Stress-70 mitocondrial participe no processo de fosforilação anormal da Tau e formação dos emaranhados neurofibrilares, sendo desconhecido o mecanismo [49].

4.4.6 As Ribonucleoproteínas heterogêneas

As Ribonucleoproteínas são componentes dos ribonucleosomas e localizam-se a nível subcelular no núcleo. As Ribonucleoproteínas heterogêneas (hnRNPs) são complexos de RNA e proteínas presentes no núcleo celular durante a transcrição e modificações pós-transcricionais do recém RNA sintetizado (pré-mRNA). A presença das proteínas ligadas a uma molécula de pré-mRNA fornece a informação de que o pré-mRNA não está totalmente processado e apto para ser exportado para o citoplasma. As hnRNPs incluem a proteína K e a proteína PTB, reguladas por fosforilação e responsáveis pela supressão do splicing do RNA através do bloqueio ao acesso do spliciossoma [50-52].

Estudos de imuno-histoquímica demonstram que no cérebro de pacientes com a DA, as hnRNPs apresentam diferentes respostas e a regulação pós-transcricional é afectada [36, 53].

4.4.8 As proteínas Ribossomais

As proteínas Ribossomais são constituintes dos ribossomas. Os ribossomas são organelos que catalisam a tradução do RNA mensageiro em proteínas. Cada ribossoma consiste num complexo multienzimático formado por proteínas ribossomais e moléculas de RNA que se estruturam em domínios funcionais. Na composição dos ribossomas em células eucarióticas existem ribossomas de tamanho 80S formados por duas subunidades 60S e 40S [54, 55].

As proteínas ribossomais são sintetizadas no citoplasma, sendo os seus genes transcritos pela RNA polimerase II. Estas proteínas são transportadas do citoplasma para o núcleo onde são unidas com os pré-rRNAs para formar partículas pré-ribossomais. As partículas pré-ribossomais amadurecem, sendo transportadas para o citoplasma como subunidades grandes (rRNAs 5S, 58S e 28S) e subunidades pequenas (rRNA 18S). As subunidades pequenas amadurecem mais rapidamente. A exportação de partículas pré-ribossomais a partir do núcleo, parece ser devida a sinais de exportação presentes nas proteínas ribossomais [54, 55].

Foram identificadas as proteínas Ribossomais 40S de S18, S4, S16 e S15 e as proteínas Ribossomais 60S de L6, L13, L4 (CAG-ISL 7), L4 (L1), L17, L10 e L15, que diferenciam-se no número de aminoácidos e em algumas propriedades. Por exemplo, a proteína Ribossomal 40S de S15 é constituída por 145 aminoácidos e pode sofrer

acetilação, enquanto a proteína Ribossomal 40S de S16 tem 146 aminoácidos e não sofre acetilação [56, 57].

4.4.9 A proteína Fibrilarina

A proteína Fibrilarina localiza-se a nível subcelular no núcleo e tem uma massa relativa de 33784 Da. Esta proteína desempenha funções no processamento do pré-rRNA, utilizando o dador metil S-adenosil-L-metionina para catalisar o local específico de metilação 2'-hidroxil da ribose no pré-RNA [58].

As proteínas Fibrilarinas são componentes das partículas nucleolares pequenas das Ribonucleoproteínas (snoRNPs) e estão associadas com o U3, U8, U13 e pequenos RNAs nucleares [58].

4.4.10 A proteína factor de alongação 1- α

A proteína factor de alongação 1- α tem um peso molecular de 50141 Da e localiza-se no citoplasma, sendo específica dos tecidos do cérebro, placenta, pulmão, fígado, rim, coração e musculo esquelético. Esta proteína promove a ligação do GTP dependente do aminoacil-tRNA para o sítio A dos ribossomas durante a biossíntese proteica [59].

A tradução ocorre em três etapas (iniciação, alongamento e terminação), nas quais a informação presente no mRNA é organizada em codões, e reconhecida pelos anticodões presentes nos tRNA's que transportam os resíduos de aminoácidos. O factor de alongação 1- α , como o nome induz, está presente na fase de alongamento da tradução. Quando o complexo 80S é formado pelo complexo de iniciação e a subunidade ribossomal 60S é iniciada, a etapa de alongamento da cadeia peptídica e os factores de início inactivam-se, estando o ribossoma disponível para receber o segundo aminoacil-tRNA e formar a primeira ligação peptídica, catalisada por uma peptidil-transferase. As duas subunidades do ribossoma contêm 3 locais adjacentes para a associação às moléculas de tRNA: locais aminoacilo (A), peptidilo (P) e de saída (E). No decorrer do processo, as moléculas de tRNA ligam-se numa primeira fase ao local A, sendo depois deslocadas para o local P e finalmente para o local E. A alongação tem início quando o anticodão do segundo aminoacil-tRNA encontra o local A, complementar do codão do mRNA existente nesta posição. Este processo é dependente de GTP e de determinados factores de alongação [31].

4.4.11 A proteína Nucleolina

A proteína Nucleolina (HB-19) é uma fosfoproteína nuclear não ribossômica. A Nucleolina está envolvida na organização da cromatina nuclear, transcrição de DNA, empacotamento de pré-RNA, montagem dos ribossomos, transporte nucleocitoplasmático, citocinese, nucleogênese e apoptose. A sua presença na superfície de células cancerosas, sugere que possa ser um importante marcador no diagnóstico de cancro [60]. Evidências sugerem que a Nucleolina é uma proteína altamente liberada em células endoteliais, que são especializadas em gerar novos vasos sanguíneos. Ao actuar de modo simultâneo em células tumorais e células endoteliais, o tratamento com a HB-19 inibe o crescimento do tumor e a neoangiogénese (formação de novos vasos sanguíneos) [60].

A proteína Nucleolina está sujeita à fosforilação e à metilação, sendo através do seu domínio N-terminal que estabelece a ligação com o DNA e Histonas H1 e é fosforilada pela acção das proteínas caseína cinase II (CKII) e cinase Cdc2, *in vitro* e *in vivo*, durante a mitose. Estes dados sugerem que as modificações pós-translacionais provavelmente regulam a função da Nucleolina. A proteína Nucleolina está envolvida na biossíntese ribossomal e é um marcador da proliferação celular. Estudos revelam que a Nucleolina foi localizada não somente no núcleo mas também no citoplasma e na membrana plasmática de neurónios através de métodos imunocitoquímicos. No entanto, a quantidade de Nucleolina fora do núcleo é insuficiente para a sua detecção em condições normais, sugerindo que a detecção desta proteína no citoplasma e na membrana seja possível apenas sob determinadas condições. Em pacientes com a DA, a Nucleolina fosforilada pela proteína Cdc2 está presente nos emaranhados neurofibrilares, sendo um marcador para o início da formação dos emaranhados neurofibrilares. Estas informações sugerem que a fosforilação da Nucleolina pela cinase Cdc2 seja um evento crítico e o ponto de convergência entre duas vias distintas, como a mitose e a neurodegeneração [61, 62].

As funções da Nucleolina têm sido estudadas em cultura de células *in vitro*. No entanto, a distribuição e a função da Nucleolina em células cerebrais humanas permanecem desconhecidas. A Nucleolina apresenta diferentes distribuições quando comparada entre os cérebros humanos normais e cérebros humanos com a DA, sendo a variabilidade dessa distribuição um indicativo de uma função dinâmica da Nucleolina em neurónios [61, 62].

4.4.12 A proteína com domínio “zinc-finger”

As proteínas com domínio “zinc-finger” são capazes de interagir com o DNA através de átomos de zinco que estabelecem ligações com aminoácidos da região peptídica das proteínas (cisteína, histidina). Formam duas principais classes, mas todas elas apresentam uma hélice S para a ligação directa à molécula de DNA.

As proteínas com domínio “zinc-finger” podem interagir com a proteína PPA, podendo activar a actividade transcricional do gene PPA e o domínio de activação transcricional localiza-se no N-terminal do domínio “zinc finger” da proteína [63].

Com o auxílio de ferramentas bioinformáticas, utilizando-se o software “Information hyperlinked over proteins” (iHOP) é possível visualizar a interacção da proteína com domínio “zinc-finger” com a proteína PPA (figura 11).

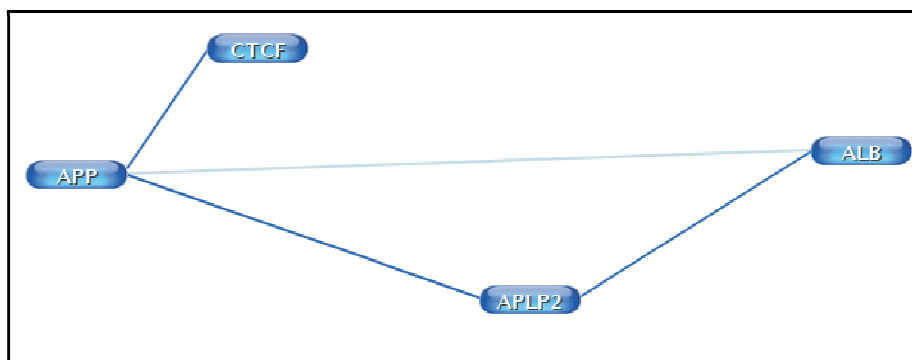


Figura 11 - Diagrama da interacção da proteína com domínio “zinc-finger” (CTCF) com a proteína PPA.

4.5 Fosforilação e Interacção proteína-proteína

O papel fundamental da PPA é inquestionável na DA, mesmo que muitas proteínas possam contribuir ao estado desta doença [22]. A proteína PPA é modelada directa ou indirectamente pela fosforilação e por eventos dependentes de fosforilação que alvejam em diferentes vias intracelulares. A fosforilação na PPA possibilita uma modificação conformacional total no AICD e permite a ligação de outras proteínas a este fragmento citoplasmático da proteína PPA [22, 23, 64]. A fosforilação anormal no AICD foi relatada recentemente em cérebros de pacientes com a DA [65]. Dadas as características do AICD, a rede complexa das interacções da proteína-proteína que se centraram em torno dele tornou-se um alvo novo, para a intervenção terapêutica [66, 67].

Resultados e Discussão

Um aspecto importante da fosforilação proteica, como mecanismo de controlo metabólico, é o facto de ser um processo reversível e dinâmico, em que uma proteína cinase transfere um grupo de fosfato do ATP a um substrato, alterando a conformação e função dos últimos. Uma proteína fosfatase remove o fosfato e a proteína reverte ao seu estado desfosforilado [22, 28].

A fosforilação da proteína, pode ser associada com o processo de funcionamento cerebral e de memória, tendo um papel no processamento de sinais neuronais e na modulação a curto prazo ou a longo prazo da transmissão sináptica. Na DA há evidências para o regulamento anormal da fosforilação da proteína PPA [66].

A PPA é uma fosfoproteína, com os locais bem definidos de fosforilação, no entanto, a sua função é ainda alvo de estudo. A PPA, quer no seu ectodomínio quer no seu domínio intracelular, é modelada directa ou indirectamente pela fosforilação, *in vitro* e *in vivo* e por eventos dependentes de fosforilação que alvejam em diferentes vias intracelulares. Usando-se anticorpos específicos, como ferramenta altamente sensível para a fosforilação, foi detectado *in vivo* fosforilação em Thr⁶⁵⁴, Ser⁶⁵⁵ e Thr⁶⁶⁸ no AICD [22, 68].

A isoforma PPA695 contém 5 locais potenciais de fosforilação nos seus 47 aminoácidos da cauda citoplasmática (AICD), sendo T654, S655, T668, Y687 e Y692, que pertencem a três motivos funcionais da PPA, ⁶⁶⁷VTPEER⁶⁷², ⁶⁸²YENPTY⁶⁸⁷ e ⁶⁵³YTSI⁶⁵⁶ críticos para a interacção com outras proteínas [65]. O AICD não fosforilado está predominantemente no núcleo. Um mutante de AICD (AICDA), em que T668 do AICD é substituído pela Ala, foi igualmente localizado predominantemente no núcleo [69].

A fosforilação da PPA em T668 localiza-se nos tecidos cerebrais e nos neurónios, particularmente nas pontas das neurites, desempenhando funções importantes na orientação axial. No entanto, por estímulos de stress, a fosforilação pode ser induzida mesmo em células não neuronais [64].

A PPA fosforilada aumenta significativamente durante a apoptose e a secreção da espécie neurotóxica Aβ42 aumenta durante a apoptose induzida pelo PC12 [23]. As proteínas Tau, Presenilinas, β-Tubulina e outras proteínas podem também ser fosforiladas. Na DA a proteína Tau é anormalmente hiperfosforilada em vários locais Ser/Thr [28].

4.6 Estudo do proteoma

Visando realizar a finalização do objectivo principal, que centra-se na caracterização e relação das proteínas identificadas por espectrometria de massa, para cada amostra, realizou-se o estudo do proteoma. O estudo do proteoma evidenciou as funções e efeitos em determinados processos biológicos característicos para cada proteína, com possível relação biológica com a DA (tabela 7).

Tabela 7 – Caracterização e relação das proteínas identificadas por espectrometria de massa com a DA.

Proteínas identificadas	Caracterização e relação com a DA
α-Actina	<input type="checkbox"/> Funções celulares <ul style="list-style-type: none"> • Transporte axonal • Formação de sinapses • Migração e adesão neuronal
β-Tubulina	<input type="checkbox"/> Proteína microtubular hiperfosforilada na DA
Vimentina	<input type="checkbox"/> Provoca a deposição intraneuronal e extracelular do péptido A β 42 e sua quantidade aumenta com a evolução da doença <input type="checkbox"/> Quando ocorre perdas sinápticas e retracção dos dendritos, a Vimentina é expressa e transportada para os dendritos com o objectivo de restabelecer as sinapses
Stress-70, mitocondrial	<input type="checkbox"/> Reduz a agregação e alterações estruturais de proteínas e desempenha efeitos neuroprotectores no cérebro (hipocampo) <input type="checkbox"/> Níveis elevados são observados na DA, sugerindo-se que participe no processo de fosforilação anormal da Tau e formação dos emaranhados neurofibrilares
Nucleolina	<input type="checkbox"/> Presente nos emaranhados neurofibrilares, quando fosforilada pela proteína Cdc2, sendo um marcador para o início da formação destes e para a neurodegeneração na DA
Proteínas com domínio “zinc-finger”	<input type="checkbox"/> Pode activar a actividade transcricional do gene PPA e o domínio de activação transcricional localiza-se no N-terminal do domínio “zinc-finger” da proteína
Ribonucleoproteínas heterogéneas (hnRNPs)	<input type="checkbox"/> Estudos de imuno-histoquímica demonstram que no cérebro de pacientes com a DA, as hnRNPs apresentam diferentes respostas e a regulação pós-transcricional é afectada

5. CONCLUSÕES

5.1 Concentração óptima para a transfecção

Determinou-se que a concentração óptima para a transfecção seria de 4µg de cDNA PPA695. Com a utilização desta concentração de cDNA PPA695 obteve-se um aumento dos níveis de transfecção de PPA695, observando-se aumento dos níveis extracelulares das isoformas matura e imatura de PPA695 transfectada, cujo peso molecular é superior ao das endógenas. Após otimizar esta técnica para as caixas com diâmetro de 42mm, extrapolou-se a concentração de transfecção a utilizar para as caixas com diâmetro de 100mm, com base no aumento da área relativa de superfície e segundo o protocolo do método de transfecção com fosfato de cálcio (www.flemingtonlab.com). Assim sendo, para a transfecção da linha celular COS-7 com as caixas de 100mm, utilizou-se 25µg de DNA.

5.2 SDS-PAGE das amostras para posterior identificação de proteínas que ligam à PPA

Pelos resultados obtidos pelo SDS-PAGE das amostras imunoprecipitadas, foi possível concluir-se que nas amostras imunoprecipitadas com o 22C11, após transfecção obteve-se um aumento dos níveis das isoformas matura e imatura de PPA695 transfectadas, comparativamente com a amostra não transfectada. Na amostra transfectada e com adição do peptídeo Aβ observou-se diminuição dos níveis das isoformas matura e imatura de PPA695 transfectadas, comparativamente com a amostra transfectada. Nas amostras imunoprecipitadas com o GFP foi possível detectar as formas exógenas (transfectadas) porque apenas estas possuem a proteína PPA com o GFP (green fluorescent protein).

5.3 Estudo de proteínas que ligam à PPA

Através do estudo do proteoma identificámos proteínas que ligam à PPA em células COS-7, em determinadas condições (transfectadas com fosfato de cálcio utilizando 25µg de cDNA APP695 e não transfectadas e imunoprecipitando com diferentes anticorpos; 22C11 e C-terminal), proporcionando obter informações que contribuem para melhorar a

Conclusões

base molecular e podem conduzir ao desenvolvimento de potenciais alvos terapêuticos para a DA.

O estudo das interações proteína-proteína é uma condição prévia importante para explorar novas formas de manipular a produção de A β . Com esta questão em mente, procurámos identificar proteínas que interagem com a APP, caracteriza-las e relaciona-las com a DA.

De acordo com as proteínas identificadas, foi possível agrupar estas proteínas em dois grupos, segundo a sua localização celular: as nucleares e as citoplasmáticas. No núcleo localizam-se as seguintes proteínas, Histona, Ribonucleoproteína heterogénea, Nucleolina e a proteína Fibrilarina. No citoplasma localizam-se as seguintes proteínas, β -Actina, α -Actina, β -Tubulina, α -Tubulina, Vimentina, Queratina, Stress-70 mitocondrial, proteína Ribossomal, factor de alongação e a Albumina sérica.

Para facilitar a caracterização das proteínas identificadas, estas foram agrupadas em dois grupos: proteínas do citoesqueleto e proteínas reguladoras da expressão génica. Sendo as proteínas do citoesqueleto: Actina, Tubulina, Vimentina e Queratina. As proteínas pertencentes ao grupo das reguladoras da expressão génica são: Histonas, Ribonucleoproteínas heterogéneas, Ribossomais, Nucleolina, Factor de alongação 1- α , Fibrilarina e as proteínas com domínio “zinc-finger”. As proteínas Albumina e Stress-70 mitocondrial não são agrupadas em nenhum destes grupos, pois não pertencem ao citoesqueleto e também não são reguladoras da expressão génica.

Apenas na amostra transfectada e imunoprecipitada com o anticorpo 22C11, foi possível identificar uma modificação pós-transducional, sendo uma oxidação e correspondendo à proteína ribossomal 60SL6. Não se obteve grandes diferenças nos grupos de proteínas identificadas para cada amostra.

Nas amostras imunoprecipitadas com o anticorpo C-terminal, é eventualmente possível a detecção de proteínas que interagem especificamente com o C-terminal da PPA e na amostra imunoprecipitada com o anticorpo 22C11, proteínas que interagem especificamente com o N-terminal da PPA e proteínas que poderão não ter interação com a PPA e relação com a DA. O facto de algumas proteínas terem sido apenas identificadas numa amostra imunoprecipitada com determinado anticorpo, não determina necessariamente que essas proteínas interajam especificamente com determinada região da PPA, pois este estudo baseou-se principalmente na identificação de proteínas que pudessem interagir com a PPA e que eventualmente tivessem uma relação com a DA, não tendo sido alvo de estudo a localização das interações entre as proteínas e a PPA.

Conclusões

A relevância deste estudo baseia-se na identificação de proteínas que ligam à PPA, podendo estas ser usadas como alvos no tratamento da DA, sendo a α -Actina, β -Tubulina, Vimentina, Nucleolina, Stress-70 mitocondrial e a proteína com domínio “zinc-finger”.

Com o auxílio de ferramentas bioinformáticas, utilizando-se o software “Information hyperlinked over proteins” (iHOP) foi possível visualizar-se as interações das proteínas α -Actina, Albumina e proteína com domínio “zinc-finger” com a proteína PPA.

Futuramente, seria de interesse para melhorar a compreensão da base molecular na DA, contribuindo para aperfeiçoar-se os métodos de diagnósticos e a previsão da evolução da doença, avaliar se as interações das proteínas com a PPA afectam a seu processamento e a produção de $A\beta$. Tendo estas diferentes funções é possível sugerir que pudessem provocar diferentes efeitos no processamento da PPA e na formação dos emaranhados neurofibrilares.

6. REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

1. Henriques, A.G.d.S.C., *The effect of cellular stress on the Alzheimer's amyloid precursor protein*. Universidade de Aveiro, departamento de Biologia, 2003.
2. Cañas Benito, D.L.p.-F., Antonio Ramos-Fernández, Emilio Camafeita and Enrique Calvo, *Mass spectrometry technologies for proteomics*. Briefings in functional genomics and proteomics, 2006. **4**(4): p. 295-320.
3. Lap Hoa, N.S., Laurel Blackmana, Eugene Festaa, and G.M.P. Guru Reddyb, *From proteomics to biomarker discovery in Alzheimer's disease*. Brain Research Reviews, 2005. **48** p. 360- 369.
4. Thomas Anne V., B.O., Hyman Bradley T., Arnim Christine A.F. von, *Visualizing interaction of proteins relevant to Alzheimer's disease in intact cells*. Methods, 2007. **44**: p. 299-303.
5. Marcello Elena, E.R., Luca Monica *Amyloid flirting with synaptic failure: Towards a comprehensive view of Alzheimer's disease pathogenesis*. European Journal of Pharmacology, 2008: p. 1-10.
6. Yates Darran, M.D., *The molecular pathology of Alzheimer's disease*. Elsevier Ltd, 2007: p. 1-5.
7. Parihar M.S., H.T., *Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions*. Journal of Clinical Neuroscience, 2004. **11**(5): p. 456–467.
8. Koo, H.Z.a.E.H., *Molecular Neurodegeneration The amyloid precursor protein: beyond amyloid*. licensee BioMed Central Ltd., 2006: p. 1-12.
9. Alois, A., *Über eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde*. Allg. Zschr. F. Psychiatr. Psychisch- Gerichtl. Mediz., 1907. **64**: p. 146-148. .
10. Izabella Dutra de Abreu, O.V.F., Hélio Lauar de Barros, *Alzheimer Disease: correlation between memory and autonomy*. Revista de Psiquiatria Clínica, 2005. **32**(3): p. 131-136.
11. José Galluci Neto, M.G.T., Orestes Vicente Forlenza, *The Differential Diagnosis of Dementia*. Revista de Psiquiatria Clínica, 2005. **32**(3): p. 119-130.

Referências Bibliográficas

12. McGaugh, J.L., *Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective*. Trends Neurosci, 2002. **25**(9): p. 456.
13. Hecht, K.W.a.M.H., *Mutations Enhance the Aggregation Propensity of the Alzheimer's A β peptides*. J.Mol.Biol., 2008. **377**: p. 565-574.
14. Yokes, M.B., *Molecular genetics of Alzheimer's Disease*. Journal of Cell and Molecular Biology 2007. **6**(2): p. 73-97.
15. Fridman Cintia, G.S., Neto Emmanuel, Ojapi Élide *Alterações genéticas na doença de Alzheimer*. Rev. Psiq. Clín., 2004. **31**(1): p. 19-25.
16. Smith, M.d.A.C., *Doença de Alzheimer*. Rev. Bras. Psiq., 1999. **21**: p. 3-7.
17. Forlenza, O.V., *Pharmacological Treatment of Alzheimer's Disease*. Revista de Psiquiatria Clínica, 2005. **32** (3): p. 137-148.
18. Cotran, R.a., *Pathologic Basis of Disease*, ed. t. edition. 2004: Elsevier Saunders.
19. Turner Paul, C.K., Tate Warren, Abraham Wickliffe *Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory*. Progress in Neurobiology, 2003. **70**: p. 1-32.
20. Xu, Y.-w.Z.a.H., *Molecular and Cellular Mechanisms for Alzheimer's Disease: Understanding APP Metabolism*. Current Molecular Medicine, 2007. **7**: p. 687-696.
21. Orestes Vicente Forlenza, W.F.G., *Influência de mecanismos colinérgicos nos processos neurodegenerativos relacionados à formação de amiloide e à fosforilação da proteína tau* Revista de Psiquiatria Clínica, 1998. **25**(3): p. 114-117.
22. Da Cruz e Silva, E.F.a.d.C.e.S., O.A., *Protein phosphorylation and APP metabolism*. Neurochem Res, 2003. **28**: p. 1553-1561.
23. Sodhi Chihinder, P.R., Gottardi-Littell Numa, *Phosphorylation of β -amyloid precursor protein (APP) cytoplasmic tail facilitates amyloidogenic processing during apoptosis*. Brain Research, 2008. **1198**: p. 204-212.

Referências Bibliográficas

24. Nassif Melissa, H.J., Salbego Christianne, *Colesterol, ApoE ϵ 4 e estatinas: Implicações na doença de Alzheimer*. Infarma, 2005. **17**(5/6): p. 46-49.
25. Sudhof, Q.L.a.T.C., *Cleavage of Amyloid- Precursor Protein and Amyloid- Precursor-like Protein by BACE*. The Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(11): p. 10542–10550.
26. Konietzko Uwe, G.Z., Meyer Michelle, Kohli Bernhard, Bosset Jérôme, Lahiei Debomoy, Nitsch Roger *Co-localization of the amyloid precursor protein and Notch intracellular domains in nuclear transcription factories*. Neurobiology of Aging, 2008. **7047**: p. 1-16.
27. Vardy Emma, C.A.a.H.N., *Proteolytic mechanisms in amyloid- β metabolism: Therapeutic implications for Alzheimer's disease*. Molecular Medicine, 2005. **11**(10): p. 464-472.
28. Da Cruz e Silva, O.A., Fardilha, M., Henriques, A.G., Rebelo, S., Vieira, S. and da Cruz e Silva, E.F. , *Signal transduction therapeutics: relevance for Alzheimer's disease*. J Mol Neurosci, 2004. **23**: p. 123-142.
29. Mattson, W.A.P.a.M.P., *Effects of Amyloid Precursor Protein Derivatives and Oxidative Stress on Basal Forebrain Cholinergic Systems in Alzheimer's Disease*. Int. J. Devl Neuroscience, 1998. **16**(7/8): p. 737-753.
30. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**: p. 680-685.
31. Campbell, M.K., *Bioquímica*. Artmed, 2005: p. 337-338.
32. Kabsch, W., Mannherz, E.G., Suck, D., Pai, E.F., and Holmes, K.C. , *Atomic structure of the actin:DNase I complex*. Nature, 1990. **347**: p. 37-44.
33. Wiggan, J.R.B.a.O.N.P., *ADF/cofilin and actin dynamics in disease*. TRENDS in Cell Biology 2002. **12**(12): p. 598-605.
34. Yoshida K., S.Y., Yamamoto K., Watanabe M., Sinohara H., *Cloning and sequencing of complementary DNAs encoding alpha-2-HS glycoprotein, alpha-1-antitrypsin, and beta-actin from African green monkey, Cercopithecus aethiops*,. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases, 1997.

Referências Bibliográficas

35. Opii Wycliffe O., G.J., Elizabeth Head, N. William Milgram, Bruce A. Muggenburg, Jon B. Klein, William M. Pierce, Carl W. Cotmanb, D. Allan Butterfield, *Proteomic identification of brain proteins in the canine model of human aging following a long-term treatment with antioxidants and a program of behavioral enrichment: Relevance to Alzheimer's disease*. *Neurobiology of Aging* 2008. **29**: p. 51-70.
36. Małgorzata Różga, M.K., Agnieszka Jabłonowska, Michał Dadlez, Wojciech Bal, *The binding constant for amyloid Ab40 peptide interaction with human serum albumin*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007. **364**: p. 714-718.
37. ALMEIDA, O.P., *Biologia molecular da doença de Alzheimer: uma luz no fim do túnel?* *Rev Ass Med Brasil* 1997. **43**(1): p. 77-81.
38. Shrijay Vijayana, E.E.-A., Inge Grundke-Iqbal, Khalid Iqbal, *A pool of L-tubulin is hyperphosphorylated at serine residues in Alzheimer disease brain*. *FEBS Letters* 2001. **507**: p. 375-381.
39. Machado Gisele F., F.F.M., Ribeirão Preto, *FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS*. *Medicina, Ribeirão Preto* 1996. **29**: p. 104-113.
40. Eli C. Levina, N.K.A., Jonathan C. Sedeyn, Venkateswar Venkataraman, and H.-Y.W. 6 Michael R. D'Andrea, Robert G. Nagele, *Neurons express vimentin in the Alzheimer's disease brain and may be part of a generalized dendritic damage-response mechanism*. *Brain Research*, 2009. **14**: p. 1-14.
41. Matsuoka S., B.B.A., Smogorzewska A., McDonald E.R. III, Hurov K.E., Luo J., Bakalarski C.E., Zhao Z., Solimini N., Lerenthal Y., Shiloh Y., Gygi S.P., *ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage* *Science* 2007. **316**: p. 1160-1166.
42. Mayer, M.a.B., *Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism*. *B Cell Mol Life Sci.*, 2005. **62**: p. 670-684.
43. Fenton, W.a.H., *Chaperonin-mediated protein folding: fate of substrate polypeptide*. *AL Q Rev Biophys* 2003. **36**(2): p. 229-256.
44. Bukau, M.P.M.a.B., *Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism*. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* , 2005. **62**: p. 670-684.

Referências Bibliográficas

45. Rona G. Giffard, L.X., Heng Zhao, Whitney Carrico, Yibing Ouyang, Yanli Qiao, Robert Sapolsky, Gary Steinberg, Bingren Hu and Midori A. Yenari, *Chaperones, protein aggregation, and brain protection from hypoxic/ischemic injury*. The Journal of Experimental Biology 2004. **207**: p. 3213-3220.
46. Kang Soo Leea, J.H.C., Byung Hoon Oh, Chang Hyung Hong, *Increased plasma levels of heat shock protein 70 in patients with vascular mild cognitive impairment*. K.S. Lee et al. / Neuroscience Letters 2008. **436** p. 223-226.
47. Jordi Magrané, R.C.S., Kenneth Walsh, and Henry W. Querfurth, *Heat Shock Protein 70 Participates in the Neuroprotective Response to Intracellularly Expressed Beta-Amyloid in Neurons*. The Journal of Neuroscience, 2004. **24**(7): p. 1700 -1706.
48. T. B. Franklin, A.M.K., D. B. Clarke, A. P. Arrigo, & R. W. Currie, *The role of heat shock proteins Hsp70 and Hsp27 in cellular protection of the central nervous system*. Int. J. Hyperthermia, 2005. **21**(5): p. 379-392.
49. Ya Fei Xu, Y.J.Z., Ai Hong Zhang, Qi Zhang, Tangchun Wu, and Jian-Zhi Wang, *Attenuation of okadaic acid-induced hyperphosphorylation of cytoskeletal proteins by heat preconditioning and its possible underlying mechanisms*. Cell Stress & Chaperones 2004. **9**(3): p. 304-312.
50. Takimoto M, T.T., Matunis M, Avigan M, Krutzsch H, Dreyfuss G, Levens D. , *Specific binding of heterogeneous ribonucleoprotein particle protein K to the human c-myc promoter, in vitro*. J Biol Chem., 1993. **268**(24): p. 18249-58.
51. Watson JD, B.T., Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. , *Molecular Biology of the Gene, ch. 9 and 10*. Peason Benjamin Cummings; CSHL Press, 2004. **5th ed.**
52. Xie J, L.J., Kress TL, Mowry KL, Black DL., *Protein cinase A phosphorylation modulates transport of the polypyrimidine tract-binding protein*. Proc Natl Acad Sci USA 100, 2003. **15**: p. 8776-81.
53. Katsuyoshi Mizukamia, M.I., Masahiko Iwakiri, Milos D. Ikonovic, Steven T. Dekosky, Hiroshi Kamma, Takashi Asada, *Immunohistochemical study of the hnRNP A2 and B1 in the hippocampal formations of brains with Alzheimer's disease*. Neuroscience Letters 2005. **386**: p. 111-115.

Referências Bibliográficas

54. Cooper, G.M., *The Cell. A Molecular approach*. AMS Press, U.S.A. , 2004. **3rd ed.**
55. Alberts, B., Lewis, Raff, Roberts and Watson, *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc. New York. , 2002. **4th ed.**
56. Vladimirov S.N., I.A.V., Karpova G.G., Musolyamov A.K., Egorov T.A., Thiede B., Wittmann-Liebold B., Otto A., *Characterization of the human small-ribosomal-subunit proteins by N-terminal and internal sequencing, and mass spectrometry*. Eur. J. Biochem., 1996. **239**: p. 144-149.
57. Imami K., S.N., Kyono Y., Tomita M., Ishihama Y. , *Automated phosphoproteome analysis for cultured cancer cells by two-dimensional nanoLC-MS using a calcined titania/C18 biphasic column*. Anal. Sci., 2008. **24**: p. 161-166.
58. Jansen R.P., H.E.C., Kern H., Lehtonen H., Carmo-Fonseca M., Lapeyre B., Tollervey D. , *Evolutionary conservation of the human nucleolar protein fibrillarin and its functional expression in yeast*. J. Cell Biol., 1991. **113**: p. 715-729.
59. Ann D.K., W.M.M.J., Huang T., Carlson D.M., Wu R. , *Retinol-regulated gene expression in human tracheobronchial epithelial cells. Enhanced expression of elongation factor EF-1 alpha*. J. Biol. Chem., 1988. **263**: p. 3546-3549.
60. Damien Destouches, D.E.K., Yamina Hamma-Kourbali, Bernard Krust, Patricia Albanese, Panagiotis Katsoris, Gilles Guichard, Jean Paul Briand, Jose´ Courty, Ara G. Hovanesian, *Suppression of Tumor Growth and Angiogenesis by a Specific Antagonist of the Cell-Surface Expressed Nucleolin*. PLoS ONE 2008. **3(6)**: p. 1-12.
61. Malter, S.H.E.Z.a.J.S., *Nucleolin and Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein C Proteins Specifically Interact with the 3'-Untranslated Region of Amyloid Protein Precursor mRNA* The Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**: p. 17292-17298.
62. Alex Dranovskya, b., Inez Vincentc, Luisa Gregorib, Alexander Schwarzmanb, David Colfleshd, Jan Enghilde, Warren Strittmattere, Peter Daviesc, Dmitry Goldgaber, *Cdc2 phosphorylation of nucleolin demarcates mitotic stages and Alzheimer's disease pathology*. Neurobiology of Aging 2001. **22** p. 517-528.
63. Alexander A. Vostrov, M.J.T., and Wolfgang W. Quitschke, *A Region to the N-terminal Side of the CTCF Zinc Finger Domain Is Essential for Activating*

Referências Bibliográficas

- Transcription from the Amyloid Precursor Protein Promoter*. J. Biol. Chem. , 2002. **277**(2): p. 1619-1627.
64. Chang Keun-A, K.H.-S., Ha Tae-Young, Ha Ji-Won, Shin Ki Young, Jeong Yun Ha, Lee Jean- Pyo, Park Cheol- Hyoung, Kim Seognhan, Baik Tae-Kyoung and Such Yoo-Hun *Phosphorylation of Amyloid Precursor Protein (APP) at Thr668 regulates the Nuclear translocation of the APP Intracellular Domain and Induces Neurodegeneration*. Molecular and Cellular Biology, 2006. **26**: p. 4327-4338.
65. Lee, M.S., Kao, S.C., Lemere, C.A., Xia, W., Tseng, H.C., Zhou, Y., Neve, R., Ahlijanian, M.K. and Tsai, L.H. , *APP processing is regulated by cytoplasmic phosphorylation*. J Cell Biol. , 2003. **163**: p. 83-95.
66. Domingues, S.C.T.S., *The use of YTH to support the Notch-like signaling of APP*. Centro de Biologia Celular, Universidade Aveiro, 2005: p. 15-106.
67. Mukhopadhyay, R.M.a., *AICD and its Adaptors - In Search of New Players*. Journal of Alzheimer's Disease, 2007. **11**: p. 343-358.
68. Paz, S.I.M.P.V.G., Silva, Odete Abreu Beirão da Cruz e and S.e.E.F.d. Cruz, *O tráfego subcelular da Proteína Precursora de Amilóide de Alzheimer (PPA) é dependente de fosforilação* Tese de doutoramento, Universidade de Aveiro, 2006: p. 1-246.
69. Toshiharu, N.T.a.S., *Role of APP phosphorylation in Fe65-dependent gene transactivation mediated by AICD* Laboratory of Neuroscience, Genes to Cells, 2006. **11**: p. 633-645.

7. ANEXO

Preparação das soluções para a transfecção com fosfato de cálcio

HBS 2x	- 280 mM NaCl
	- 10 mM KCl
	- 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O
	- 12 mM dextrose
	- 50 mM HEPES

1º Dissolveu-se 1,6g de NaCl, 0,074g de KCl, 0,027g de Na₂HPO₄, 0,2 de dextrose e 1g de HEPES, minimum 99,5% Titration.

2º Ajustou-se o volume total para 90mL com H₂O destilada.

3º Ajustou-se o pH para 7,05 com 0,5 NaOH e ajustou-se o volume para 100mL com H₂O destilada.

4º Esterilizou-se a solução passando por um filtro de 0,22-micro.

5º Armazenou-se em aliquotas de 5mL a -20°C.

CaCl₂ 2M

1º Dissolveu-se 10,8g de CaCl₂.6H₂O em 20ml de H₂O destilada.

2º Esterilizou-se a solução passando por um filtro de 0,22-micro.

3º Armazenou-se em aliquotas de 1ml a -20°C.

HBS 2x

Preparou-se uma solução de 0,1x TE (pH 8,0) com 1mM de Tris-HCl e 0,1mM de EDTA.

1º Pesou-se 0,012g de Tris, dissolveu-se em pouca água destilada e verificou-se o pH desta solução.

2º Ajustou-se o pH desta solução a 8,0.

3º Adicionou-se à solução 0,0372g de EDTA e verificou-se a ligeira descida de pH.

4º Ajustou-se novamente o pH desta solução para 8,0.

5º Esterilizou-se a solução fazendo-a passar por um filtro de 0,22-micro.

6º Armazenou-se em aliquotas a 4°C.

DNA

Dissolveu-se o DNA ($\approx 20\mu\text{g}/10^6$ células) em 0,1xTE (pH 8,0) a concentração de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Esta solução só deve ser preparada no dia de realização da transfecção com fosfato de cálcio.

Preparação dos mini-geis

Gel de resolução a 6%, Lower gel, (vf= 10 mL)

H₂O ----- 4,95mL
30% Acrilamida/ 8% Bisacrilamida----- 2mL
LBG -----2,5mL
APS (10%) -----50 μl
TEMED -----5 μl

Gel de empacotamento a 3,5%, Upper gel, (vf= 5mL)

H₂O ----- 3,3mL
30% Acrilamida/ 8% Bisacrilamida----- 0,6mL
5*UBG -----1,0mL
APS (10%) -----50 μl
TEMED -----5 μl
SDS (10%) ----- 50 μl