



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Fibrilhação e neurotoxicidade da proteína priónica

Cátia Pires

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

2012

Dissertação para obtenção do grau de mestre em Engenharia Biológica

Tese orientada pelo professor Doutor Eduardo Rodrigues Pinho e Melo

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito.
Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da
listagem de referências incluída.

Cátia Pires

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Eduardo Melo, pela oportunidade de realizar este projeto, por todo o apoio e disponibilidade prestados.

Ao Carlos Lopes, que me ensinou, auxiliou e apoiou, ao Evandro Tavares pela ajuda na cultura de células e apoio durante todo o percurso e aos restantes colegas de laboratório Joana Macedo, Vanessa Ochoa e Nídia Infante pelo apoio, sempre que necessitei.

Ao professor Paulo Martel, coordenador científico do CBME (Centro de Biomedicina Molecular e Estrutural), pela oportunidade de participar neste projeto. Assim como a todos os membros deste grupo responsáveis pela minha aprendizagem contínua.

À Cláudia Florindo, *da Cell Imaging Unit* (CIU), do Departamento de Medicina, pela instrução no *Axiomager Z2* e pela disponibilidade prestada.

E, um agradecimento muito especial, aos meus pais e irmã por toda a força e carinho que me deram (e a paciência que tiveram para me ouvir!). Ao meu sobrinho, pelos momentos de animação, que me proporcionou quando mais precisava deles e ao meu cunhado pelo apoio incondicional. Ao meu namorado tenho também um agradecimento especial, pois apoiou-me nos momentos mais difíceis, aconselhou-me e incentivou-me. E claro, às minhas amigas, que estiveram lá sempre que mais precisei!

RESUMO

A acumulação de fibrilhas no cérebro tem sido associada a diversas doenças neurodegenerativas, como *Alzheimer*, *Parkinson* e encefalopatias espongiformes, entre outras. Estes agregados proteicos resultam do *misfolding* das proteínas, que perdem a estrutura nativa dando origem às fibrilhas. Apesar dos debates sobre a causa da toxicidade celular ser devido a estados intermediários ou a fibrilhas maduras, a progressão das doenças resulta sempre em morte celular. O estudo de compostos capazes de inibir a fibrilhação é por isso indispensável.

O objetivo deste trabalho teve por base a análise da formação de fibrilhas da proteína priónica na presença dos osmólitos arginina e glicerol e a avaliação da toxicidade das fibrilhas nestas condições. Através da coloração do núcleo de células *N2a* com um fluoróforo identificou-se a quantidade de células em apoptose nas várias condições. Paralelamente foi realizado um ensaio de viabilidade celular, permitindo determinar a quantidade de células viáveis durante o tempo de exposição às fibrilhas. Para se observar a interação das fibrilhas com as células neuronais, utilizou-se um fluoróforo para marcar as fibrilhas, permitindo acompanhar a sua deslocação e internalização pelas células.

A análise dos resultados permite afirmar que apesar de ocorrer um atraso da fibrilhação na presença dos osmólitos, a diferença nos níveis de toxicidade entre as diversas condições não foi significativa. Relativamente à interação das fibrilhas com as células verificou-se que se associam muito rapidamente com a membrana celular, sendo que após algumas horas já ocorreu internalização das fibrilhas nas células. Após internalização, as fibrilhas deslocam-se pelas dendrites, o que pode constituir um mecanismo de transmissão das fibrilhas e infecciosidade entre as células.

Um conhecimento mais profundo sobre os mecanismos de toxicidade celular das fibrilhas e uma avaliação do efeito dos osmólitos na estrutura e morfologia das fibrilhas contribuirão certamente para o aprofundamento dos conhecimentos sobre as doenças priónicas.

Palavras-chave: Doenças neurodegenerativas; proteína priónica; fibrilhas proteicas; osmólitos; neurotoxicidade.

ABSTRACT

The accumulation of amyloid fibrils in the brain has been associated with several neurodegenerative diseases, such as Alzheimer, Parkinson and spongiform encephalopathies, among others. These protein aggregates result from the misfolding of proteins, when lose their native structure leading to fibrils. Despite some debate on whether the cause of cell toxicity is due to intermediate states or mature fibrils, disease progression always results in cell death. So, compounds capable of inhibiting protein fibrillation are being studied.

The objective of this work was to analyze the formation of fibrils from the prion protein in the presence of the osmolytes, arginine and glycerol, and to understand if the cell toxicity of these species in the presence of such compounds was affected. Through nuclear staining of neuroblastoma N2a cells with a fluorophore it was possible to identify apoptotic cells upon incubation with fibrils formed in the absence and presence of osmolytes. Simultaneously, an assay of cell viability was performed to determine the amount of viable cells upon incubation with fibrils. The interaction and internalization of fibrils by neuroblastoma cells was characterized after labeling fibrils with a fluorophore.

Results show that osmolytes delay fibrillation of the prion protein but not affect significantly neurotoxicity. Labeling of fibrils shows that these species interact very quickly with the cell membrane and cell internalization occurs after few hours. Once internalizes, fibrils seem to traffic through dendrites in what might be a possible route to cell to cell transmission of fibrils and infectivity.

Deeper insight on the mechanism of the cell toxicity caused by fibrils and a better evaluation of the effect of osmolytes on the structure and morphology of fibrils will certainly contribute to an improved knowledge of prion diseases.

Keywords: Neurodegenerative diseases; prion protein; protein fibrils; osmolytes; neurotoxicity.

ÍNDICE	
AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABELAS	XIII
LISTA DE ABREVIACÕES	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Doenças priônicas	1
1.2 Proteínas priônicas: PrP ^C e PrP ^{Sc}	2
1.3 Agregados proteicos amilóides	6
1.3.1 Fatores que favorecem a formação de agregados amilóides	8
1.3.2 Toxicidade dos agregados	9
1.4 Estabilidade de proteínas e efeito dos osmólitos	12
1.4.1 Arginina	15
1.4.2 Glicerol	16
1.5 Proteínas usadas neste trabalho.....	18
1.5.1 Proteína priônica de ratinho.....	18
1.5.2 Proteína S6 de <i>Thermus thermophilus</i>	19
2. METODOLOGIA	21
2.1 Materiais e reagentes	21
2.2 Produção e purificação da proteína priônica.....	21
2.2.1 Processo de produção e purificação da proteína.....	22
2.2.1.1 Produção da PrP.....	22
2.2.1.2 Purificação da PrP.....	23
2.2.1.3 SDS-PAGE	25
2.3 Formação de agregados fibrilares	27
2.4 Cultura de células N2a do neuroblastoma de ratinho	28
2.5 Neurotoxicidade das fibrilhas em células N2a avaliada com o fluoróforo Hoechst 33342	29
2.6 Viabilidade celular avaliada por atividade das desidrogenases	30
2.7 Derivatização da proteína priônica com o fluoróforo Alexa 568	31
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33

3.1	Produção da proteína priónica	33
3.2	Purificação da proteína priónica	34
3.3	Formação das fibrilhas na ausência e presença de osmólitos	37
3.4	Neurotoxicidade das fibrilhas em células N2a de rato.....	43
3.4.1	Células em apoptose	43
3.4.2	Porcentagem de células mortas na presença de fibrilhas obtidas na ausência e presença de osmólitos	46
3.5	Viabilidade celular na presença de fibrilhas obtidas na ausência e presença de osmólitos	49
3.6	Fluorescência do núcleo celular pelo <i>Hoechst 33342</i> comparada com a reação enzimática durante a proliferação celular	56
3.7	Internalização e transporte das fibrilhas em células do neuroblastoma de ratinho	59
4.	CONCLUSÕES GERAIS.....	65
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
	ANEXOS	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. 1 – Representação esquemática da proteína priónica (Jain & Udgaonkar, 2011).....	4
Figura 1. 2 – Modelos de conversão da PrP ^C e PrP ^{Sc} (Jain & Udgaonkar, 2011)	5
Figura 1. 3 – Representação da estrutura fundamental das fibrilhas amilóides (MacPhee & Woolfson, 2004).....	6
Figura 1. 4 – Representação esquemática da proteína (<i>mis</i>) <i>fold</i> ing na célula (Muñoz, 2008).....	8
Figura 1. 5 – Estrutura química representativa dos compostos osmóticos (Singh <i>et al.</i> 2011)..	14
Figura 1. 6 – Estrutura do aminoácido arginina (Quintas <i>et al.</i> , 2008).	15
Figura 1. 7 – Representação da estrutura secundária da proteína priónica de rato	18
Figura 1. 8 – Representação da proteína ribossomal S6 do <i>Thermus thermophilus</i>	19
Figura 2. 1 – Esquema representativo de ambos os <i>constructs</i> da proteína priónica utilizados (adaptado de Cordeiro <i>et al.</i> , 2005).....	22
Figura 2. 2 – Mecanismo de deteção da viabilidade celular com o CCK-8	30
Figura 3. 1 – Gel de SDS-PAGE indicativo da expressão da proteína priónica em células de <i>E.coli</i> BL21 (DE3)	33
Figura 3. 2 – Representação gráfica da curva de crescimento das células de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) contendo o gene da PrP ₂₃₋₂₃₁	34
Figura 3. 3 – Representação gráfica do cromatograma obtido no processo de cromatografia para eluição da proteína priónica	35
Figura 3. 4 – Gel de SDS-PAGE indicativo do corte com a trombina, diálise e liofilização.....	36
Figura 3. 5 – Molécula de tioflavina T mostrando o eixo de rotação da molécula que é restringido quando esta se incorpora nas fibrilhas proteicas (Sulatskaya <i>et al.</i> , 2011).	37
Figura 3. 6 – Representação gráfica do desenvolvimento das fibrilhas da PrP ₂₃₋₂₃₁ em tampão acetato de sódio 20 mM sem osmólitos, com glicerol 0,9 M e 1,8 M e com arginina 0,2 M e 0,3 M.	38
Figura 3. 7 – Representação gráfica do desenvolvimento das fibrilhas da PrP _{Δ23-128} em tampão acetato de sódio 20 mM sem osmólitos, com glicerol 0,9 M e 1,8 M e com arginina 0,2 M e 0,3 M.	40
Figura 3. 8 – Representação gráfica do perfil de fibrilhação da PrP ₂₃₋₂₃₁ e da PrP _{Δ23-128}	41
Figura 3. 9 – Células N2a expostas às fibrilhas durante 72 h, coradas com <i>Hoechst</i> 33342	43
Figura 3. 10 – Células N2a na presença de fibrilhas da PrP ₂₃₋₂₃₁ nas várias condições testadas..	44
Figura 3. 11 – Células N2a na presença de fibrilhas da PrP _{Δ23-128} nas várias condições testadas	45

Figura 3. 12 – Células N2a na presença de fibrilhas da proteína S6 formadas na presença de NaCl, pH 2	46
Figura 3. 13 – Representação gráfica da percentagem de células mortas expostas a fibrilhas da proteína S6, da PrP ₂₃₋₂₃₁ e da PrP _{Δ23-128} , após 72 h de cultura.....	47
Figura 3. 14 – Representação gráfica de duas das retas padrão utilizadas para os ensaios de viabilidade celular.	49
Figura 3. 15 – Representação gráfica da proliferação celular na presença de fibrilhas da PrP ₂₃₋₂₃₁ , ao longo do tempo, para cada condição testada.....	52
Figura 3. 16 – Representação gráfica da proliferação celular na presença de fibrilhas da PrP _{Δ23-128} , ao longo do tempo, para cada condição testada.....	53
Figura 3. 17 – Representação gráfica da percentagem de células viáveis expostas a fibrilhas da proteína S6, da PrP ₂₃₋₂₃₁ e da PrP _{Δ23-128} , após 72 h de cultura.....	55
Figura 3. 18 – Representação gráfica da percentagem de proliferação celular ao longo de 72 h de cultura, no ensaio de viabilidade e percentagem de células vivas após 72 horas de cultura, no ensaio de coloração no núcleo celular com <i>Hoechst</i> , na presença de fibrilhas da PrP ₂₃₋₂₃₁ (A) e de fibrilhas da PrP _{Δ23-128} (B) nas várias condições testadas.....	57
Figura 3. 19 – Representação gráfica do desenvolvimento das fibrilhas da PrP ₂₃₋₂₃₁ não marcada e marcada com <i>Alexa 568</i>	60
Figura 3. 20 – Fibrilhas da PrP ₂₃₋₂₃₁ marcadas com o fluoróforo <i>Alexa 568</i> presentes em células N2a, após 72 h de cultura	61
Figura 3. 21 – Fibrilhas da PrP ₂₃₋₂₃₁ marcadas com o fluoróforo <i>Alexa 568</i> presentes em células N2a após 30 minutos de cultura (A), após 1h (B), 2h (C), 4h (D), 1 dia (E), 2 dias (F) e após 3 dias em cultura (G).....	63
Figura 3. 22 – Fibrilhas da PrP ₂₃₋₂₃₁ na dendrite da célula neuronal.	64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. 1 – Comparação entre PrP ^C e PrP ^{Sc} (Adaptação de Ryou, 2007 e Nunnally & Krull, 2004).	3
Tabela 2. 1 – Reagentes e quantidades utilizadas na preparação de 2 géis SDS-PAGE.	25
Tabela 3. 1 – Absorvância a 280 e 340 nm, coeficiente de extinção molar (ϵ) e peso molecular (PM) da PrP ₂₃₋₂₃₁ , concentração, em molaridade (M) e em mg/ml, da proteína priónica produzida após a diálise.	36
Tabela 3. 2 – Percentagem de células mortas (e respetivo desvio padrão) para cada condição testada. São apresentados os resultados para as fibrilhas da PrP ₂₃₋₂₃₁ e da PrP _{Δ23-128}	47
Tabela 3. 3 – Percentagem de células mortas na presença de fibrilhas da S6.	47
Tabela 3. 4 – Densidade celular (e respetivos desvios padrão) em células por cm ² , às 0, 24, 48 e 72 horas na presença de fibrilhas da PrP ₂₃₋₂₃₁	50
Tabela 3. 5 – Densidade celular (e respetivos desvios padrão) em células por cm ² , às 0, 24, 48 e 72 horas na presença de fibrilhas da PrP _{Δ23-128}	51
Tabela 3. 6 – Densidade celular em células por cm ² , às 0, 24, 48 e 72 horas na presença de fibrilhas da proteína S6.	51
Tabela 3. 7 – Percentagem de células viáveis (e respetivos desvios padrão) para cada versão da proteína (PrP ₂₃₋₂₃₁ e PrP _{Δ23-128}) nas várias condições testadas, após 72 h de cultura.	54
Tabela 3. 8 – Percentagem de células viáveis na presença de fibrilhas da proteína S6.	54

LISTA DE ABREVIÇÕES

AFM	microscopia de força atômica
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
APS	<i>ammonium persulfate</i>
BSE	encefalopatia espongiforme bovina
CCK-8	<i>cell counting kit-8</i>
CD	dicroísmo circular
CJD	doença de <i>Creutzfeldt-Jakob</i>
DMSO	<i>dimethylsulfoxide</i>
DO	densidade ótica
EDTA	<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
RE	retículo endoplasmático
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FFI	insônia familiar fatal
FTIR	espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
GPI	glicosilfosfatidilinositol
IF	intensidade de fluorescência
IMAC	cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados
IPTG	<i>Isopropyl-β-D-Thiogalactopyraosid</i>
LB	meio <i>Luria Broth</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PEG	<i>polyethylene glycol</i>
PMSF	<i>phenylmethanesulfonyl fluoride</i>
PrP ^C	proteína priônica celular
PrP ^{Sc}	proteína priônica infecciosa (<i>scrapie</i>)
PrP ₂₃₋₂₃₁	proteína priônica versão longa
PrP _{Δ23-128}	proteína priônica versão curta
ORF	<i>open reading frame</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine</i>
ThT	tioflavina T
TEM	microscopia eletrônica de transmissão
TSE	encefalopatia espongiforme transmissível
UV	ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças priónicas

As doenças priónicas em mamíferos, também conhecidas como encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSE), são um grupo de doenças neurodegenerativas mortais que incluem *scrapie* em ovelhas e cabras, encefalopatia espongiforme bovina (BSE) em bovinos e a doença de *Creutzfeldt-Jakob* (CJD) em humanos (Martins *et al.*, 2003). As TSE são caracterizadas pela degeneração espongiforme do sistema nervoso central, astrogliose e deposição de fibrilhas amilóides no cérebro (Corsaro *et al.*, 2002).

As doenças priónicas são das doenças mais peculiares na natureza. Estas não são abrangidas pelo dogma central da biologia moderna, que descreve o ácido nucleico como a forma central de informação replicativa, como acontece noutras doenças infecciosas causadas por agentes patogénicos convencionais, como vírus e bactérias. No entanto, depois de vários debates, a ideia de que um agente infeccioso desprovido de material genético se poderia replicar (*protein-only hypothesis*) tornou-se o paradigma mais aceite para a propagação de priões e representa um novo fenómeno fisiopatológico (Ryou, 2007).

Kuru, uma doença priónica do povo Fore em Papua Nova Guiné, que praticava o canibalismo, e a CJD foram descritas pela primeira vez há várias décadas. A *scrapie*, por sua vez, já é conhecida clinicamente há séculos. No entanto, nenhuma destas doenças levou à devastação global causada pela BSE, que surgiu no Reino Unido e se espalhou por outros países europeus. Posteriormente, esta doença em bovinos foi relatada em 25 outros países do mundo e já se espalhou por países não europeus, como o Canadá, Estados Unidos e Japão (Ryou, 2007).

As doenças priónicas manifestam-se como formas esporádicas, infecciosas, ou hereditárias. As hereditárias, incluindo a doença de *Creutzfeldt-Jakob* (CJD), a doença de *Gerstmann-Straussler-Scheinker* e a insónia familiar fatal (FFI), são transmitidas como distúrbios autossomais dominantes e são causadas por mutações no gene da proteína priónica humana (PrP), designado *Prnp*. As doenças priónicas infecciosas, como Kuru, CJD, *Scrapie* e BSE são transmitidas pelos tecidos cerebrais infetados. Por exemplo, a *Scrapie* parece ser transmitida de animal para animal através de alimentos contaminados com tecidos nervosos. A CJD, por sua vez, pode ser transmitida de

paciente para paciente através de instrumentos utilizados em cirurgias ao cérebro de pacientes infetados. Também já foi referenciado que pacientes que adquiriram injeções da hormona do crescimento, preparadas de pessoas infetadas, podem ter contraído a doença. As doenças priónicas esporádicas ocorrem, ocasionalmente, em pessoas que não têm histórico familiar da doença e que não tiveram expostas aos priões. A sua causa não é conhecida. A CJD e a FFI, para além de doenças hereditárias, podem também manifestar-se como formas esporádicas (Nunnally & Krull, 2004).

Apesar de todos os factos conhecidos, ainda permanecem muitas incógnitas sobre as doenças priónicas não havendo testes pré-clínicos fiáveis nem tratamentos eficazes (Ryou, 2007; Liu *et al.*, 2010). É importante analisar a ameaça potencial destas doenças e desenvolver diagnósticos e terapêuticas adequadas. Para tal é primeiro necessário entender os mecanismos básicos da doença, nomeadamente como apareceram, como se replicam e como se transmitem os priões (Ryou, 2007).

1.2 Proteínas priónicas: PrP^C e PrP^{Sc}

De acordo com Prusiner (1997) um prião é uma partícula proteica infecciosa que não possui ácidos nucleicos e parece ser composto, exclusivamente, por uma isoforma modificada da proteína priónica, designada por PrP^{Sc} (Sc de *scrapie*).

Ao contrário de outros agentes infecciosos, os priões são extraordinariamente resistentes aos vários tratamentos químicos e físicos normalmente usados para inativar outros patógenos convencionais, como fungos, vírus e bactérias. Apesar dos tratamentos intensivos dos tecidos infetados com radiação ultravioleta, calor e nucleases que danificam os ácidos nucleicos, a infecciosidade dos agentes priónicos não diminui (Ryou, 2007).

Estudos sobre a PrP^{Sc} evoluíram rapidamente com a sua sequenciação, conduzindo à demonstração de que a informação genética desta proteína está contida num único gene contendo um único exão (*open reading frame* – ORF) (Nunnally & Krull, 2004). Através desta sequenciação deu-se a descoberta da proteína priónica celular (PrP^C), a qual é codificada pelo gene celular *Prnp* (Linden *et al.* 2008). Estudos subsequentes estabeleceram que a proteína é expressa em cérebros normais (não infetados), assim como em cérebros infetados (*scrapie*), mas as propriedades físico-químicas das isoformas celular e *scrapie* da proteína diferem (Nunnally & Krull, 2004).

Ambas as isoformas – PrP^C e PrP^{Sc} – partilham a mesma sequência de aminoácidos e são codificadas pelo mesmo gene (Linden *et al.* 2008). Porém, as suas conformações tridimensionais são diferentes, o que naturalmente irá diferenciar as propriedades bioquímicas e biofísicas de ambas as isoformas (Ryou, 2007). Por exemplo, ao contrário da PrP^C que apresenta, predominantemente, hélices α na sua estrutura e é extremamente sensível à digestão por proteases, a PrP^{Sc} é rica em folhas β , parcialmente resistente a digestão por proteases e tende a polimerizar em amilóides, as quais são conhecidas por possuir um grande conteúdo de folhas β (Sanghera *et al.*, 2008) (tabela 1.1).

Tabela 1. 1 - Comparação entre PrP^C e PrP^{Sc} (Adaptação de Nunnally & Krull, 2004 e Ryou, 2007).

Propriedades	PrP^C	PrP^{Sc}
Proteína	Normal, proteína celular	Alterada, proteína associada a doenças
Infecciosidade	Não infecciosa	Infecciosa; patogénica
<i>Folding</i>	Dominada por hélices α	Conformação abundante de folhas β
Solubilidade	Facilmente solúvel (hidrofílica)	Insolúvel (hidrofóbica)
Digestão por proteases	Sensível	Parcialmente, mas muito resistente
Biossíntese ($t_{1/2}$)	< 1h	15h
Degradação ($t_{1/2}$)	3-6h	> 24h
Agregação	Não agrega	Agrega
Reatividade a anticorpos	Muito reativa à maioria dos anticorpos anti-PrP	Não reativa à maior parte dos anticorpos anti-PrP ^a

^a Disponibilidade de anticorpos específicos para a PrP^{Sc} é controversa.

A PrP^C madura é uma glicoproteína com 209 aminoácidos e está ancorada à superfície celular através de uma cauda de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Ryou, 2007; Nunnally & Krull, 2004). É composta por uma região N-terminal não estruturada, com cerca de 100 aminoácidos e uma região C-terminal (resíduos 121-231). O domínio C-terminal é constituído maioritariamente por estruturas em hélice α (3 hélices α e 2 folhas β antiparalelas) e é estabilizado por uma ligação dissulfureto que liga as hélices 2 e 3 (figura 1.1) (Uversky & Fink, 2006).

A PrP^{Sc} está associada a polissacarídeos (5-15%) e a pequenas quantidades de esfingolípido e colesterol, o que não é surpreendente, visto que os lípidos representam o ambiente celular para a conversão dos príões (Baskakov & Breydo, 2007). Esta proteína existe em múltiplas conformações, o que se acredita serem resultado da infeção de animais com diferentes estirpes do agente das TSE. A existência de diferentes

estirpes de príões foi reconhecida há muitos anos, mas só recentemente foi ligada à diversidade conformacional da PrP^{Sc}.

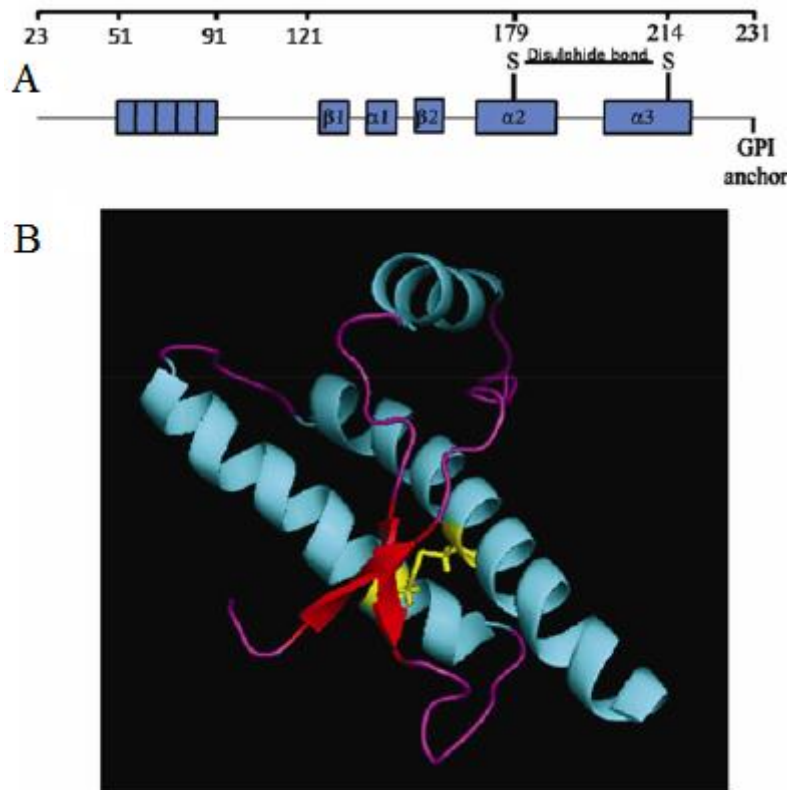


Figura 1. 1 – Representação esquemática da proteína priônica. **A** – estrutura primária da proteína priônica celular que contém 209 aminoácidos e consiste em 2 domínios: domínio N-terminal (23-120), que não é estruturado e contém 4-5 repetições de octapeptídeos (caixas azuis, resíduos 51-91); domínio C-terminal (121-231) que contém 3 hélices α e 2 folhas β . Esta proteína é ancorada à membrana celular através da cauda de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Uma ligação dissulfureto liga as hélices 2 e 3. **B** – estrutura NMR do domínio C-terminal da proteína priônica humana recombinante; a ligação dissulfureto é mostrada a amarelo, a vermelho são as folhas β e a azul as hélices α (Jain & Udgaonkar, 2011).

Foi colocada a hipótese da PrP^{Sc} agir como um modelo de conformação, conduzindo à conversão da PrP^C em mais PrP^{Sc}. A isoforma PrP^{Sc} é então derivada da PrP^C após um processo pós-traducional, no qual se pensa estar envolvido uma mudança conformacional da proteína (Nunnally & Krull, 2004). A comparação das duas isoformas, através de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e estudos de dicroísmo circular (CD) mostraram que a PrP^C contém uma estrutura com cerca de 40% em hélices α e apenas uma pequena parte em folhas β , enquanto a PrP^{Sc} é composta por cerca de 20-30% de hélices α e cerca de 30-40% de folhas β (Prusiner *et al.*, 1998; Riesner, 2003). Estes números, apesar de não serem muito precisos, visto que a análise da PrP^{Sc} é feita em amostras insolúveis, mostram que

a PrP^C é composta predominantemente por hélices alfa, possuindo poucas estruturas em folhas β , enquanto a PrP^{Sc} apresenta mais estruturas em folhas β (Riesner, 2003).

Atualmente existem dois modelos que descrevem o mecanismo de conversão da PrP^C em PrP^{Sc}: o *refolding model* e o *seeding model* (figura 1.2). O *refolding model*, também conhecido como *heterodimer model*, propõe a existência de um dímero composto por um monómero da PrP^{Sc} e um monómero da PrP^C. O monómero da PrP^{Sc} atua então como molde e interage com o monómero da PrP^C, induzindo uma alteração conformacional e convertendo-a em PrP^{Sc}. As duas moléculas, agora ambas PrP^{Sc}, separam-se e o processo continua. O *seeding model*, também conhecido como *seeded polymerization model* ou *nucleation-polymerization model*, diz que a PrP^{Sc} existe como oligómeros, cuja formação a partir da PrP^C envolve um equilíbrio de reação desfavorável. A PrP^{Sc} é então considerada como o núcleo de uma reação de polimerização clássica (dependente da nucleação). Após a formação da PrP^{Sc}, esta age como uma “semente”, convertendo mais PrP^C em PrP^{Sc}, levando à formação de fibrilhas. Uma vez que a formação de PrP^{Sc} é sempre vista como estando associada com a oligomerização, o *seeding model* tem sido amplamente aceite como o mecanismo mais plausível para a replicação da PrP^{Sc} (Lansbury & Caughey, 1996; Jain & Udgaonkar, 2011).

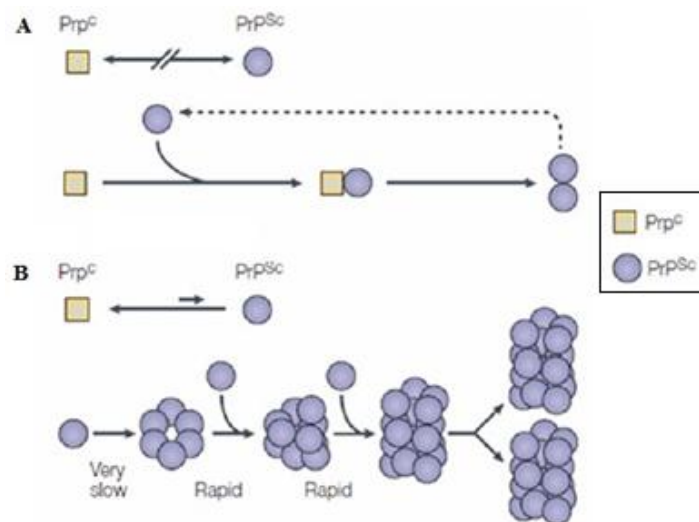


Figura 1. 2 – Modelos de conversão da PrP^C em PrP^{Sc}. **A** – *refolding model*; **B** – *seeding model*, neste modelo devido à presença de um passo de nucleação desfavorável, há uma fase *lag* na reação. A natureza exponencial da cinética desta reação sugere que os agregados são submetidos a uma fragmentação contínua para produzirem mais “sementes” para o seu crescimento (Jain & Udgaonkar, 2011)

1.3 Agregados proteicos amilóides

Mais de 15 doenças graves, incluindo doenças priónicas, *Alzheimer* e *Parkinson*, estão relacionadas com a formação de agregados proteicos filamentosos, estáveis e com estruturas predominantes em folhas β , conhecidos como fibrilhas amilóides ou apenas amilóides (Bocharova *et al.* 2006; Uversky & Fink, 2006). Já são conhecidas mais de 20 proteínas que estão envolvidas na formação destes agregados (Ferreira *et al.*, 2007; Hatters & Griffin, 2011; Uversky & Fink, 2006).

Estas agregações proteicas são um fenómeno no qual a proteína perde a sua estrutura nativa e adota uma conformação não nativa, ou seja, há uma conversão das proteínas no seu estado nativo solúvel para agregados fibrilares altamente organizados (Idicula-Thomas & Balaji, 2007; Chiti & Dobson, 2006). As fibrilhas de diferentes patologias apresentam diversas propriedades em comum, incluindo as estruturas centrais em folhas β , formadas por cadeias β dispostas perpendicularmente ao eixo longitudinal das fibrilhas e por ligações de hidrogénio paralelas ao eixo (figura 1.3) (Ross & Poirier, 2004; Uversky & Fink, 2006). No geral, todas as fibrilhas apresentam morfologias semelhantes, isto é, são estruturas torcidas, semelhantes a cordas, que retratam subestruturas filamentosas (Uversky & Fink, 2006). Atualmente existem evidências que indicam que a capacidade de fibrilhação é uma propriedade intrínseca das cadeias polipeptídicas e que qualquer proteína é potencialmente capaz de formar fibrilhas amilóides em condições adequadas (Uversky & Fink, 2006; Chiti & Dobson, 2006; Liu *et al.*, 2010).

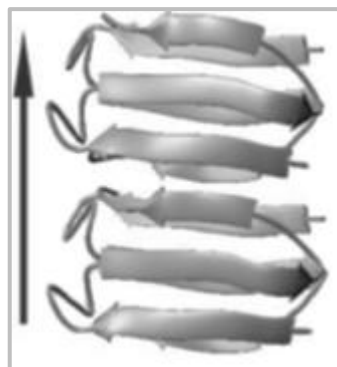


Figura 1. 3 – Representação da estrutura fundamental das fibrilhas amilóides, onde as folhas β antiparalelas são dispostas perpendicularmente ao eixo longitudinal das fibrilhas. A seta preta indica a direção das ligações de hidrogénio (MacPhee & Woolfson, 2004).

Apesar das diversas pesquisas feitas nos últimos anos, há ainda muitas questões em aberto relativamente à formação das fibrilhas amilóides, como sejam os fatores que determinam a sua formação através de proteínas solúveis normais, o mecanismo de toxicidade associado às doenças neurodegenerativas, a estrutura das fibrilhas amilóides maduras e as espécies intermediárias que aparecem durante a formação das fibrilhas.

À medida que novas tecnologias foram desenvolvidas, foi possível uma compreensão mais detalhada da formação das fibrilhas amilóides. Inicialmente era utilizada a microscopia e corantes histopatológicos, como a tioflavina T (ThT) e o vermelho Congo, para a sua caracterização. A associação das estruturas fibrilares com as propriedades tintoriais apresentadas pelos depósitos amilóides proporcionaram a base para o isolamento destas fibrilhas. Foi também descoberto que as fibrilhas amilóides formadas *in vitro* a partir de proteínas recombinantes ou sintéticas são semelhantes às fibrilhas formadas *in vivo*. Esta descoberta abriu as possibilidades de realizar a caracterização biofísica deste processo e enfrentar o desafio de desvendar a estrutura e organização das fibrilhas amilóides (Muñoz, 2008).

Na década de 1970, a descoberta de que extratos lisossomais são suficientes para converter proteínas amiloidogénicas em fibrilhas amilóides introduziu a suposição de que o processamento proteolítico foi o determinante amiloidogénico. Porém, com base em diversas evidências de investigações independentes, é agora aceite que o *misfolding* da proteína é a base molecular de todas as desordens amilóides. Mudanças conformacionais de proteínas no seu estado nativo (enroladas ou não enroladas) têm sido demonstradas como precedentes da formação de estruturas amilóides. Mesmo assim a proteólise continua a ter um papel importante na geração de fragmentos de proteínas anormais altamente propensos à formação de amilóides. Por exemplo, a proteína precursora amilóide (APP – *amyloid precursor protein*) não forma fibrilhas enquanto o péptido A β (produto de proteólises) não for o componente maioritário (Muñoz, 2008).

Em determinadas condições, todas as proteínas amiloidogénicas podem adotar um estado propenso a amilóides, o qual favorece as interações intermoleculares que levam à formação de espécies oligoméricas. Uma cadeia polipeptídica nativa enrolada perde ou simplesmente não é capaz de atingir a sua estrutura tridimensional, originando conformações intermediárias em equilíbrio (figura 1.4). Nesses intermediários propensos a formar amilóides, a proteína pode nuclear conjuntos oligoméricos iniciais onde o teor de estruturas β secundárias é geralmente maior. Estas "sementes" ou

"núcleos" fornecem um tipo de modelo, onde outras moléculas parcialmente enroladas ou enroladas incorretamente (*misfolded proteins*) são recrutadas, aumentando assim o tamanho dos conjuntos que dão finalmente origem às fibrilhas (Muñoz, 2008).

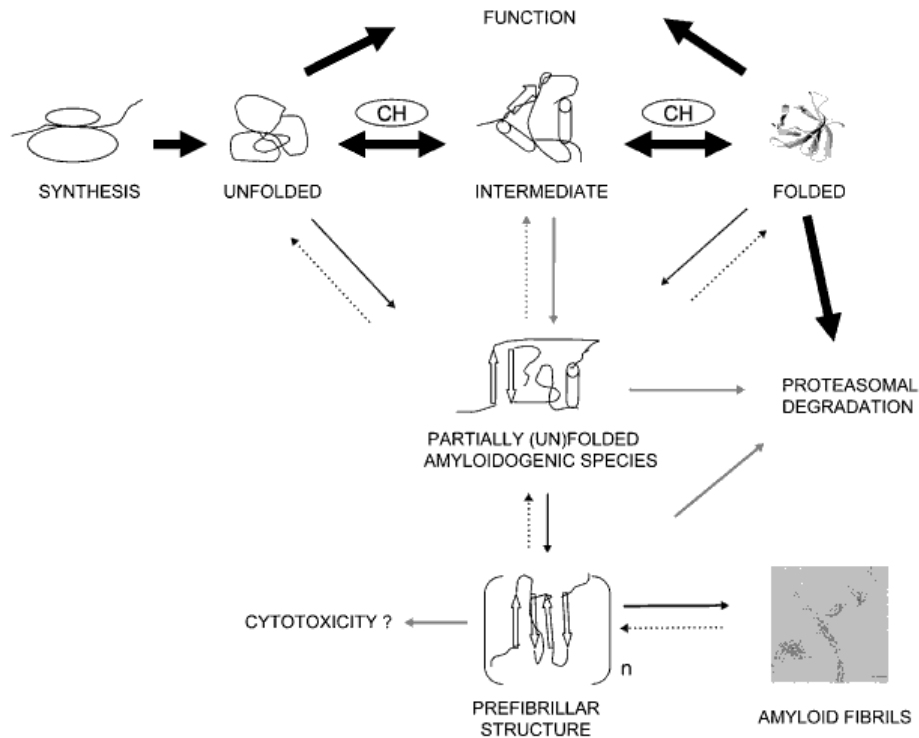


Figura 1. 4 – Representação esquemática do (*mis*)folding proteico na célula. As setas grossas representam os processos fisiológicos que conduzem à função normal da proteína; as setas finas correspondem aos eventos envolvidos na formação de amilóides; as setas cinzentas indicam os passos do processo formação das estruturas amiloides, ainda não completamente esclarecidos. Por exemplo a identidade das espécies precursoras amiloidogênicas, das espécies citotóxicas ou das espécies que podem ser alvo de degradação ainda é objeto de estudo; as setas a tracejado indicam os processos que não são favorecidos; CH são chaperonas e catalisadores de *folding* (Muñoz, 2008).

1.3.1 Fatores que favorecem a formação de agregados amilóides

No ambiente celular, o começo da agregação pode ser desencadeado por qualquer fator que resulte num aumento da concentração do precursor amiloidogênico, deslocando assim o equilíbrio entre as moléculas corretamente enroladas e parcialmente desenroladas. Mutações nas proteínas, mudanças ambientais e modificações químicas são relatadas como favoráveis à formação de fibrilhas em diversas proteínas patológicas (Muñoz, 2008).

As mutações podem modular a extensão da formação de amilóides, reduzindo a estabilidade conformacional da proteína ou aumentando especificamente a tendência

para formar amilóides. Interações com componentes celulares podem também favorecer a formação de amilóides. Têm sido relatadas associações de diversas proteínas com depósitos amilóides encontrados na doença de *Alzheimer* e em outras doenças do sistema nervoso central ou em desordens sistêmicas. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que muitos destes elementos podem regular a formação de amilóides (Muñoz, 2008). Algumas evidências indicam que glicoproteínas presentes na matriz extracelular podem estar implicadas na patofisiologia das amilóides, provavelmente através da estabilização das fibrilhas (Guest *et al.*, 2011; Muñoz, 2008). Também têm sido relatadas várias mutações pontuais, associadas a formas genéticas das doenças priónicas. Muitas delas estão localizadas no domínio globular C-terminal e por isso acredita-se que esta região esteja diretamente associada à formação de fibrilhas e agregados. No entanto, não se pode desprezar a importância da região N-terminal (Cordeiro *et al.*, 2005).

Valores de pH ácido e iões metálicos parecem também estar relacionados com a aceleração da formação de fibrilhas *in vivo*. Vários estudos propõem que a formação de fibrilhas se dá no sistema endossomal, que apresenta pH ácido, enquanto que a ligação dos péptidos a iões metálicos induz uma mudança conformacional nas folhas β , que favorece a formação das fibrilhas (Guest *et al.*, 2011; Muñoz, 2008).

Outros fatores que podem favorecer a formação de amilóides são as modificações pós-traducionais covalentes das proteínas, como a fosforilação e a glicosilação, por exemplo, e condições que aumentem a acumulação de intermediários enrolados incorretamente, tais como choques térmicos, *stress* oxidativo e modificações químicas (Muñoz, 2008).

1.3.2 Toxicidade dos agregados

A maioria das proteínas deve adquirir estruturas tridimensionais bem definidas, a fim de cumprir as suas funções biológicas. Este processo fundamental é auxiliado por uma complexa maquinaria celular de chaperones moleculares, que atuam para evitar o *misfolding* e a agregação. A falha de uma proteína para se enrolar corretamente, ou para reter o seu estado nativo, tem emergido como a causa de várias doenças. O *fold*ing incorreto da proteína é frequentemente o resultado de mutações desestabilizadoras e pode causar a perda de funções críticas. Contudo, num número cada vez maior de

doenças, o *misfolding* e a agregação resultam num ganho de função tóxica (Olzscha *et al.*, 2011).

Existem atualmente fortes evidências indicando que a formação de amilóides é a causa ou pelo menos o evento central na patogénese das amiloidogénese e não uma consequência da doença. Durante as últimas duas décadas, muitos modelos animais (nematode *Caenorhabditis elegans*, mosca da fruta *Drosophila melanogaster* e rato *Mus musculus*) foram usados para estudar a expressão das principais proteínas amiloidogénicas na sua forma nativa (*wildtype*) ou em versões com mutações (Muñoz, 2008).

A presença de depósitos amilóides associados a doenças amiloidogénicas sugeriu, inicialmente, que as fibrilhas maduras são as espécies responsáveis pela disfunção e morte celular. Porém, estudos feitos com material *post-mortem* mostraram que a acumulação de fibrilhas amilóides nos neurónios não está sempre correlacionada com a degeneração celular e com os sintomas clínicos (Muñoz, 2008). Por exemplo, em alguns animais modelo com *Alzheimer*, ou TSE ou doença de *Huntington* os danos neuronais e os sintomas clínicos eram observados antes da deteção de agregados amilóides. Além disso, estudos feitos em animais infetados com *scrapie*, através de microscopia eletrónica, revelaram a presença de estruturas não fibrilares dentro do espaço extracelular bem antes da deteção de fibrilhas amilóides (Sanghera *et al.*, 2008). Estes estudos indicam que as fibrilhas amilóides não são a forma tóxica. Em vez disso, os intermediários oligoméricos não-fibrilares, formados ao longo do mecanismo de fibrilhação, parecem ser a entidade responsável pela toxicidade celular. Seguindo este raciocínio, é possível que durante o processo de conversão da PrP^C para PrP^{Sc}, estados oligoméricos intermediários se acumulem. De facto, tem sido relatado que os oligómeros são a espécie mais infecciosa nas doenças priónicas (Jain & Udgaonkar, 2011), os quais induzem disfunção celular e apoptose neuronal (Sanghera *et al.*, 2008).

Assim, é necessário identificar e compreender a natureza destas entidades tóxicas, a estrutura e estabilidade termodinâmica e cinética dos intermediários formados durante o desenvolvimento amilóide, assim como as interações destas espécies com as membranas biológicas e outras macromoléculas dentro e fora das células (Radford & Weissman, 2012).

Apesar dos mecanismos ainda não serem inteiramente compreendidos, sugeriu-se que os oligómeros mais heterogéneos podem expor superfícies hidrofóbicas que podem mediar interações anormais com outras proteínas, levando a um perturbação funcional e

“sequestro”. Um outro modelo diz que, proteínas enroladas incorretamente (*misfolded proteins*) ao interagirem com componentes celulares como proteossomas e chaperones podem interferir com os mecanismos de controlo de qualidade na célula e com os mecanismos de limpeza, resultando possivelmente numa propagação dos defeitos no processo de *folding*. Finalmente, com base em experiências com membranas modelo, verificou-se que os intermediários oligoméricos podem comprometer a integridade das membranas lipídicas, as quais são vistas como o primeiro alvo da toxicidade amilóide (Olzscha *et al.*, 2011).

Foram propostos diversos mecanismos que explicam como é que estas espécies tóxicas podem causar perturbações na membrana. A “hipótese canal” (*channel hypothesis*) postula que as protofibrilhas formariam poros membranares não-específicos resultando num desequilíbrio do conteúdo de iões na célula. Foi proposto recentemente que estas perturbações podem também ocorrer através de um mecanismo de formação de poros independente, como a alteração na fluidez da membrana ou na sua condutância. Outra via também proposta é baseada na interação de oligómeros com iões metálicos (Cu^+ ou Fe^{2+}) produzindo peróxidos (H_2O_2). A peroxidação de proteínas e lípidos através deste processo pode comprometer as funções normais das proteínas membranares (ATPases, glucose, transportadores de glutamato) (Muñoz, 2008).

Todas estas vias de toxicidade podem atuar sinergicamente, perturbando a homeostasia iónica e o metabolismo energético, e assim, com níveis de *stress* oxidativo relativamente baixos os neurónios podem tornar-se vulneráveis à citotoxicidade e ocorre apoptose celular. Para além destes mecanismos, as patogénese amilóides podem ser causadas por perda de função da proteína solúvel ou mesmo pela acumulação das fibrilhas (Muñoz, 2008).

Como já exposto anteriormente, sabe-se que ainda não foram desenvolvidas terapêuticas ou medicamentos para a cura destas doenças associadas à deposição de amilóides no cérebro. Porém, têm surgido evidências de que é possível inibir ou reduzir a fibrilhação, assim como destabilizar fibrilhas já existentes. Estão a ser estudadas moléculas/compostos que sejam capazes de restringir a formação de espécies fibrilares, podendo esta ser uma medida de prevenção das doenças amiloidogénicas (Liu *et al.*, 2010).

1.4 Estabilidade de proteínas e efeito dos osmólitos

Estudos conduzidos *in vitro* permitiram observar que algumas proteínas tendem a agregar durante o seu *refolding*, quando o agente que provocou a sua desnaturação é retirado. Os resíduos não polares expostos durante a desnaturação intervêm nessa agregação. As interações intramoleculares levam ao *folding* das proteínas, conduzindo assim à estrutura nativa das mesmas, enquanto as interações intermoleculares levam à agregação das proteínas. Uma das estratégias para prevenir esta agregação pode basear-se na adição de co-solventes e solutos às soluções proteicas, nomeadamente aminoácidos, sais e osmólitos (Das *et al.*, 2007).

Enquanto alguns compostos estabilizam a estrutura nativa das proteínas, outros destabilizam ou desnaturam a sua estrutura. Porém, há também outros que suprimem efetivamente a agregação (Hamada *et al.*, 2009). Os efeitos destes aditivos na solubilidade das proteínas, na estabilização e agregação têm sido explicados a partir de 3 abordagens: os efeitos dos aditivos na estrutura da água; as interações dos aditivos com as cadeias laterais de aminoácidos e com as ligações peptídicas; e as interações preferenciais dos aditivos com as proteínas (Arakawa *et al.*, 2007).

A ureia e a guanidina são os desnaturantes proteicos mais utilizados e exercem o seu efeito através da rutura das interações intra e intermoleculares, conduzindo à desnaturação e solubilização das proteínas. O efeito positivo da guanidina na supressão da agregação durante o *refolding* da proteína é devido à solubilização das frações hidrofóbicas que são expostas ao solvente no *folding* dos intermediários e nas espécies enroladas incorretamente (Hamada *et al.*, 2009).

O SDS (*sodium dodecyl sulfate*) é um detergente aniónico que confere carga negativa às proteínas e as desnatura, ligando-se a regiões hidrofóbicas do polipéptido. Contudo, o SDS pode ligar-se à proteína muito fortemente, sendo que a diluição ou a diálise não dissociam completamente as moléculas de SDS. Ciclodextrinas podem ser usadas para remover o SDS de proteínas. Esta combinação, detergente de solubilização e ciclodextrinas (açúcares cíclicos hidrofóbicos), é designada como chaperone artificial. Estes chaperones previnem a agregação proteica através da formação de um complexo detergente-proteína, no qual o detergente protege as regiões hidrofóbicas do polipéptido não enrolado, sendo o detergente depois removido pela adição de agentes de extração. No entanto, este método não é muito versátil devido a ser um processo complicado e devido à toxicidade do detergente (Hamada *et al.*, 2009).

Para além dos detergentes são também utilizados surfactantes, que não se ligam tão fortemente à proteína como os detergentes sendo assim mais favoráveis para a supressão dos agregados (Hamada *et al.*, 2009).

Existem ainda aditivos tais como aminoácidos (por exemplo, a arginina), determinados sais de catiões divalentes (por exemplo, $MgCl_2$) e certos álcoois polihídricos que, para além de estabilizarem ou destabilizarem a proteína, parecem restringir a formação de agregados proteicos (Hamada *et al.*, 2009).

Tanto as células procariotas como eucariotas, quando submetidas a condições ambientais adversas, como *stress* em extremos de temperatura e pH, desidratação celular e altas concentrações de sal extracelular, adotam uma estratégia comum na proteção das suas proteínas, produzindo substâncias orgânicas de baixo peso molecular designadas osmólitos (Jamal *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2011).

Os osmólitos são portanto pequenas moléculas orgânicas que aumentam a capacidade das células para reagirem ao *stress*, nomeadamente osmótico, e que, apesar de se acumularem na célula em elevadas concentrações, são compatíveis com o metabolismo celular. Ao contrário dos iões inorgânicos, que também podem ser utilizados para adaptação ao *stress* extracelular, os osmólitos não interferem negativamente com a estrutura ou com a função das macromoléculas biológicas (Macchi *et al.*, 2012).

Os osmólitos podem ser divididos em 3 classes químicas: polióis, aminoácidos e seus derivados e metilaminas (figura 1.5) (Jamal *et al.*, 2009; Singh *et al.* 2011). Estes osmólitos são estabilizadores de proteínas e podem ter um efeito indutor do *refolding* de proteínas enroladas incorretamente. Parecem também ser capazes de suprimir as agregações proteicas (Jamal *et al.*, 2009).

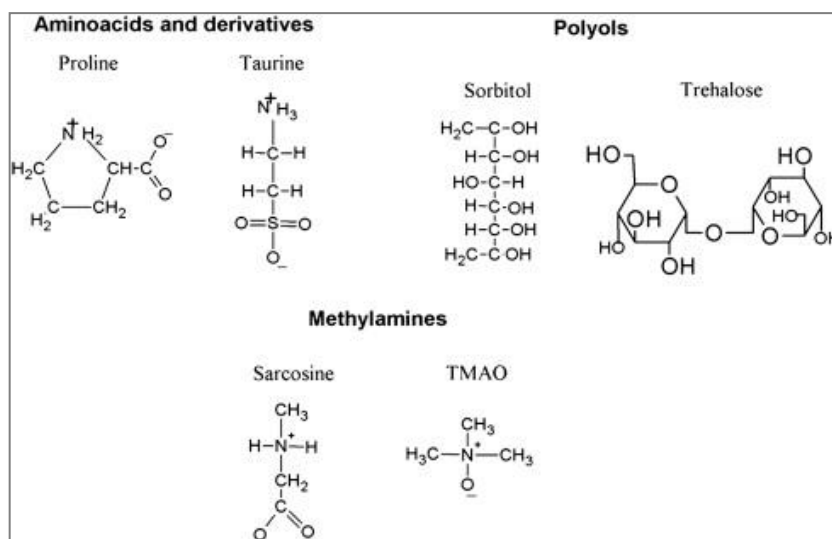


Figura 1.5 – Estrutura química representativa dos compostos osmólitos dentro de cada classe: aminoácidos e derivados, polióis e metilaminas. Para cada classe são apresentados dois exemplos (Singh *et al.* 2011).

Apesar dos diversos estudos que têm investigado o efeito dos osmólitos no *folding* de proteínas, poucas investigações foram realizadas sobre o efeito dos osmólitos na fibrilhação das proteínas. Em geral, é difícil prever como é que os osmólitos afetam a agregação proteica. Por exemplo, alguns osmólitos tais como aminoácidos e metilaminas podem ligar-se de forma relativamente forte a proteínas ou podem alterar os seus padrões de hidratação, podendo assim influenciar as interações proteína-proteína – interações intermoleculares – e a estrutura do agregado resultante (Macchi *et al.*, 2012). A influência dos osmólitos na agregação proteica é de grande importância, visto que muitas doenças, como a doença de *Huntington*, *Alzheimer* e *Parkinson* são etiológicamente correlacionadas com a deposição de agregados proteicos (Ignatova & Gierasch, 2006).

1.4.1 Arginina

A arginina é um aminoácido com um ponto isoelétrico de 10,8 e apresenta uma cadeia lateral básica, semelhante ao agente desnaturante guanidina (Quintas *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010). Este aminoácido tem 3 grupos metílenos hidrófobos e um grupo δ-guanidino com características fortemente básicas na sua cadeia lateral (figura 1.6). Em animais, a arginina é um produto do ciclo da ureia sintetizado a partir da ornitina. Apesar de ser sintetizada em mamíferos, é considerada um aminoácido essencial pois é necessária em maior quantidade que a produzida por esta via (Quintas *et al.*, 2008).

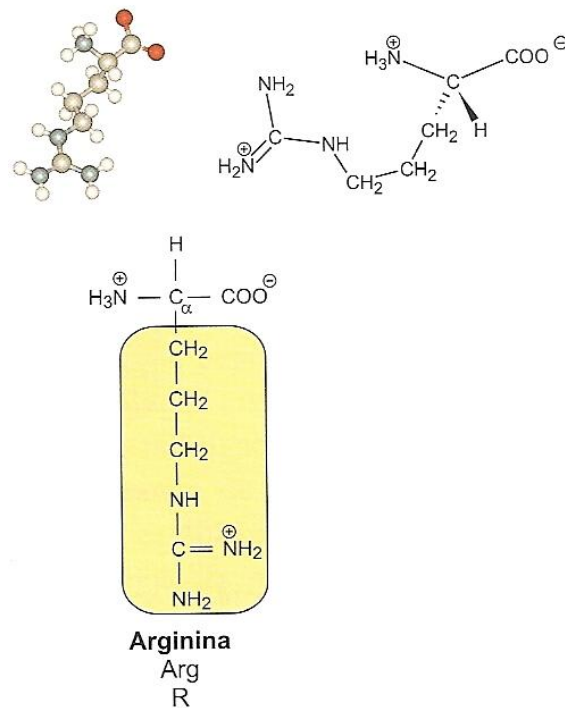


Figura 1. 6 – Estrutura do aminoácido arginina (Quintas et al., 2008).

A arginina é um dos reagentes mais úteis para o auxílio do *refolding* de proteínas recombinantes (Arakawa *et al.*, 2007; Alibolandi & Mirzahoseini, 2011). É também considerada muito útil na prevenção de agregados proteicos, formados devido a diluições, aquecimento ou a enrolamentos parciais da proteína. A arginina não altera o equilíbrio do processo de *fold*ing, apenas previne a associação de proteínas desnaturadas ou parcialmente enroladas. Além disso, a supressão da agregação de proteínas pela arginina pode ser atribuída à desaceleração de reações de associação proteína-proteína (Das *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010; Alibolandi & Mirzahoseini, 2011). Entre os

aminoácidos, a arginina é o supressor mais eficaz da agregação de várias proteínas, induzidas pelo calor (Hamada *et al.*, 2009).

Foi proposto por Traube em 1918, que os sais que aumentam a tensão superficial da água mais fortemente são mais eficientes na diminuição da solubilidade de gases inertes. Mais tarde, foram correlacionados os efeitos dos sais na tensão superficial da água com os seus efeitos na solubilidade das proteínas, sendo que, o aumento da tensão superficial da água através de sais irá diminuir a solubilidade das proteínas. Arakawa *et al.* (2007) comprovou que a arginina aumenta a tensão superficial da água. Então é evidente que a tensão superficial da água não pode explicar o efeito da arginina como supressor da agregação.

Por outro lado, observou-se que a arginina apresenta uma interação favorável com a cadeia lateral dos aminoácidos (tanto hidrofóbico como hidrofílicos) e com as ligações peptídicas, ou seja, ocorre ligação do aditivo à proteína, o que leva conseqüentemente a um aumento da solubilidade da proteína. Estas interações podem reduzir as interações eletrostáticas (ligações de hidrogénio e interações iónicas) e hidrofóbicas, sendo que superam o efeito de tensão superficial da água, permitindo assim a ligação da arginina à proteína (Arakawa *et al.*, 2007).

Assim, apesar da sua ligação limitada à proteína, a arginina é realmente uma forte supressora das agregações proteicas, sendo no entanto necessária uma concentração elevada devido à sua interação com as proteínas ser muito fraca (Arakawa *et al.*, 2007).

1.4.2 Glicerol

O glicerol é um poliol de baixo peso molecular, que apresenta três grupos hidroxilo (-OH) na sua estrutura (Mishra *et al.*, 2005).

O glicerol é conhecido por alterar o conjunto de proteínas nativas para estados mais compactos, reduzir a flexibilidade das proteínas, estabilizar intermediários parcialmente enrolados e inibir a agregação proteica tanto de proteínas no estado nativo como em estados não nativos, incluindo a amiloidogénese proteica. No entanto, uma visão mecanicista na estabilização de proteínas e prevenção da agregação de proteínas através do glicerol ainda não é totalmente clara (Vagenende *et al.*, 2009).

O glicerol tem sido descrito como um estabilizador de proteínas e o seu mecanismo de estabilização foi elucidado por Gekko e Timasheff, que propõem que o

seu efeito hidrofóbico é o responsável pela estabilização (Mishra *et al.*, 2005). O glicerol conduz ao aumento das interações hidrofóbicas, como consequência de um aumento da ordem de solvente em torno das proteínas. Comparando com os outros polióis, o glicerol é um estabilizador da conformação das proteínas e tem propriedades invulgares que diminuem a tensão superficial da água e aumentam a sua viscosidade. O glicerol, em qualquer concentração, aumenta a estabilidade de proteínas. Porém, em concentrações muito elevadas (por exemplo, 9 M) diminui a velocidade de *refolding*, possivelmente devido ao aumento da viscosidade. Este efeito cinético pode resultar numa agregação através de mecanismos que conduzem à formação de amilóides alternativos à via de *refolding*. Uma concentração de glicerol ótima parece ser crítica para alcançar um equilíbrio entre o seu efeito estabilizador baseado em princípios termodinâmicos e o seu efeito na cinética do *fold*ing (Mishra *et al.*, 2005; Alibolandi & Mirzahoseini, 2011).

Estudos feitos com uma proteína dimérica, citrato sintase (CS), propensa à formação de agregados durante o *refolding in vitro*, demonstraram que o glicerol melhora o rendimento do *refolding*, a temperaturas elevadas (30-35°C), evitando assim a agregação desta proteína (Mishra *et al.*, 2005). É também demonstrado que em determinadas concentrações, o glicerol ajuda na estabilidade da proteína contra a desnaturação induzida pelo cloreto de guanidina (GdnHCl) e pela ureia. Pode-se concluir que o melhoramento do rendimento de *refolding* está correlacionado com a supressão da agregação proteica.

Tatzelt *et al.* (1996) demonstraram que o glicerol previne a conversão da PrP^C em PrP^{Sc}, reduzindo a extensão da conversão da PrP^C numa forma insolúvel semelhante à PrP^{Sc}. Estes efeitos do glicerol são dependentes da sua concentração e do tempo que estão em contacto com a proteína.

1.5 Proteínas usadas neste trabalho

Foram utilizadas duas proteínas recombinantes neste trabalho. Sendo uma delas a proteína priônica de ratinho (PrP) e outra a proteína ribossomal S6 do *Thermus thermophilus*.

1.5.1 Proteína priônica de ratinho

Como já foi referido, a proteína priônica celular é uma glicoproteína e apresenta na sua estrutura duas sequências sinal: uma no terminal-N, para o direcionamento da proteína para o retículo endoplasmático (RE), onde a proteína sofre modificações pós-traducionais, e outra na extremidade C-terminal, onde está presente uma cauda glicosilfosfatidilinositol (GPI), a qual se irá ligar à superfície da membrana celular. O domínio C-terminal é a região globular estruturada da proteína (figura 1.7).

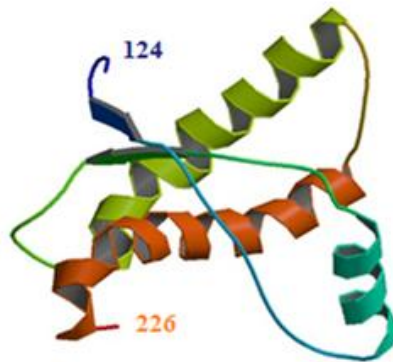


Figura 1.7 – Representação da estrutura secundária do C-terminal da proteína priônica de rato (resíduos 124-226) (Protein Data Bank, código: 1AG2).

Como esta proteína está associada a diversas doenças neurodegenerativas, é importante estudar a formação de fibrilhas amilóides *in vitro* e a sua toxicidade nas células neuronais. Neste trabalho é então utilizada a proteína priônica de ratinho com 211 aminoácidos e um peso molecular de 23163 Da. Esta apresenta uma ligação dissulfureto ligando as hélices α 2 e 3, porém não apresenta modificações pós-traducionais, como glicosilações e a cauda GPI, já que a *Escherichia coli* não possui mecanismos para as efetuar. É também utilizada uma versão curta da proteína priônica onde se eliminaram os aminoácidos 23 ao 128, designada como PrP $_{\Delta 23-128}$, para verificar se a região não estruturada também está associada à formação de fibrilhas e à morte celular.

As sequências da PrP₂₃₋₂₃₁ e PrP_{Δ23-128} estão apresentadas no anexo 1.1.

1.5.2 Proteína S6 de *Thermus thermophilus*

A proteína ribossomal S6 da subunidade pequena do ribossoma de *Thermus thermophilus* tem 101 aminoácidos e a sua estrutura consiste em 4 cadeias antiparalelas β e 2 hélices α num dos lados da estrutura (figura 1.8). Apresenta um ponto isoelétrico de 6,6, não tem pontes dissulfureto e tem apenas um resíduo de triptofano, característica adequada para estudos de fluorescência (Lindahl *et al.*, 1994). É uma proteína bem caracterizada e com capacidade para formar agregados fibrilares, após um longo período de incubação a pH baixo e com elevadas concentrações de sal (Otzen *et al.*, 2008).

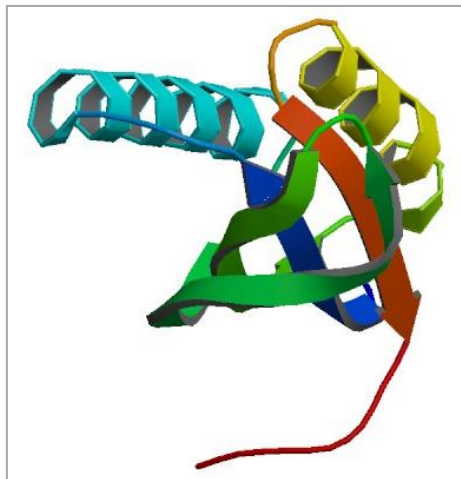


Figura 1. 8 – Representação da proteína ribossomal S6 do *Thermus thermophilus*. As 2 hélices α estão representadas a azul claro e amarelo (Protein Data Bank, código: 1CQM)

Esta proteína não está associada com qualquer patologia resultante de *misfolding* proteico e é utilizada neste trabalho com uma proteína modelo com o objetivo de observar se todas as proteínas que formam agregados são ou não são tóxicas para as células neuronais.

2. METODOLOGIA

2.1 Materiais e reagentes

A lista de reagentes e equipamentos mais relevantes utilizados neste trabalho está apresentada no anexo 2.4.

2.2 Produção e purificação da proteína priónica

A proteína priónica recombinante de ratinho foi expressa no citoplasma de células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) e purificada através de cromatografia de afinidade, utilizando uma matriz de níquel.

A *E. coli* é um dos sistemas de expressão mais usado na produção de proteínas recombinantes. Porém, muitas destas proteínas, nomeadamente a proteína priónica, acumulam-se em agregados insolúveis, designados corpos de inclusão. Para obtenção da proteína ativa é necessário efetuar o *refolding* destas proteínas a partir dos corpos de inclusão. Os corpos de inclusão são então isolados por centrifugação, solubilizados numa solução contendo ureia e de seguida efetua-se o *refolding* e purificação da proteína (Gerami *et al.*, 2011). Outra informação relevante é a cauda de histidinas presente na proteína. Esta proteína foi expressa com uma cauda de histidinas, composta por 17 aminoácidos (MRGSHHHHHHGLVPRGS), ligada ao N-terminal e com um local de clivagem específico para a trombina (entre os resíduos Arg-15 e Gly-16). O passo crítico na produção da proteína é a renaturação da proteína para a sua estrutura nativa. O *refolding* da proteína é efetuado com a proteína ligada à coluna de níquel, através da cauda de histidinas, prevenindo a agregação da proteína e favorecendo a formação de pontes intramoleculares de dissulfureto. Com o uso da trombina, é possível clivar a cauda de histidinas no N-terminal sem hidrolisar a cadeia polipeptídica da PrP que não tem nenhum local de reconhecimento para a trombina (Zahn *et al.*, 1997).

As proteínas recombinantes utilizadas neste estudo foram a proteína de ratinho completa, designada por PrP₂₃₋₂₃₁ e uma versão curta, onde foram eliminados os aminoácidos do 23 ao 128, designada como PrP_{Δ23-128} (figura 2.1).

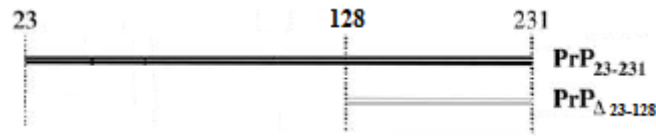


Figura 2. 1 – Esquema representativo de ambos os *constructs* da proteína priónica utilizados (PrP_{23-231} e $\text{PrP}_{\Delta 23-128}$). Os números em cima indicam os resíduos de aminoácidos e as linhas verticais tracejadas delimitam a região em falta no mutante da PrP em comparação com a versão completa da PrP (linha preta em cima) (adaptado de Cordeiro *et al.*, 2005).

A composição dos meios e soluções preparados para este procedimento é apresentada no anexo 2.2.

2.2.1 Processo de produção e purificação da proteína

2.2.1.1 Produção da PrP

O processo de produção foi iniciado com a transformação das células competentes (ver protocolos da preparação de células competentes e extração de DNA plasmídeo no anexo 2.1).

A uma alíquota com 100 μl de células competentes BL21 (DE3) foram adicionados 2 μl de DNA plasmídico (gene da PrP clonado no vetor pRSET-A, ver vetor no anexo 2.5); após permanecer em gelo durante 30 minutos, a solução foi submetida a um choque térmico durante 50 segundos, numa placa de aquecimento (Biosan TS-100, Grant) previamente aquecida a 42°C. As células foram colocadas novamente em gelo durante 5 minutos. Posteriormente foram adicionados 250 μl de meio LB (*Luria Broth medium*) e as células foram incubadas durante 1 hora, a 37°C. De seguida, plaquearam-se as células, em placas de Petri com LB, agar e 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina e foram incubadas a 37°C *overnight*, numa estufa de esterilização e secagem (modelo EN 400). No dia seguinte, foi repicada uma colónia isolada para cada um dos balões de *Erlenmeyer* (250 ml) com 50 ml de meio, onde foram previamente adicionados 50 μl de ampicilina (100 mg/ml). As células ficaram a crescer na orbital (*Agitorb 200IC*) durante 16h, a 37°C com agitação de 180 rpm.

A fermentação é iniciada com uma $\text{DO}_{600\text{ nm}}$ de 0,1. Para tal, é necessário medir as densidades óticas dos pré-inóculos num espectrofotómetro UV/visível (*Shymadzu UV-1700, PharmaSpec*), para calcular a quantidade adequada a adicionar a 500 ml de meio nos *Erlenmeyer* de 2 L, os quais foram previamente suplementados com 500 μl de

ampicilina (100 mg/ml). Foram monitorizadas as densidades óticas ao longo do tempo de fermentação e quando esta atingiu a sua fase exponencial ($DO_{600\text{ nm}}$ entre 0,6-0,8) induziu-se a expressão da proteína com 500 μl de uma solução de IPTG 1M (*Isopropyl- β -D-Thiogalactopyraosid*). A fermentação durou, aproximadamente, 4-5 horas a 37°C, com agitação de 180 rpm. Para se poder comprovar a expressão da proteína foi recolhida uma alíquota de 1 ml da cultura antes da adição do IPTG e no final da fermentação, que foi centrifugada (Biosan[®] TS-100, Grant) a 13000 rpm durante 5 minutos e analisada num gel de SDS-PAGE (ver subcapítulo 2.1.1.3).

Terminada a fermentação, os meios são centrifugados (5810R, *epENDORF*) durante 30 minutos, a 4000 rpm, 4°C; o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 20 ml do tampão B, pH 7.0, (ver composição no anexo 2.2) ao qual são adicionados 20 μl de uma solução de PMSF 100 mM (*phenylmethanesulfonyl fluoride*), para inibição de proteases. Segue-se a lise celular através de sonicação, 5 ciclos x 2 minutos a p=9 (os ciclos utilizados dependem do equipamento utilizado).

A suspensão celular (detritos celulares e corpos de inclusão contendo a PrP) foi centrifugada (*Beckman J14-MC*) durante 45 minutos, a 18000 rpm, 4°C (para deposição dos corpos de inclusão no *pellet*). O sobrenadante é descartado e o *pellet* solubilizado em 20 ml de tampão G (ver composição no anexo 2.2) para desnaturação da proteína através da ureia, permanecendo 1 hora a 4°C, sob agitação. Para remoção dos detritos celulares é realizada nova centrifugação (*Beckman J14-MC*) durante 45 minutos, a 18000 rpm, 4°C; sendo o *pellet* descartado e o sobrenadante armazenado para purificação.

2.2.1.2 Purificação da PrP

A purificação da proteína é realizada através de um processo cromatográfico de afinidade por metais, utilizando uma matriz de Ni-NTA (QIAGEN) empacotada numa coluna XK16 (*GE Healthcare Life Sciences*). Este processo decorre num sistema de purificação AKTA FPLC 900 (*GE Healthcare Life Sciences*), controlado pelo *software Unicorn*.

Após lavagem (ver protocolo da lavagem da matriz em anexo 2.3), a matriz foi equilibrada no tampão G, pH 7.0 (tampão onde está equilibrada a proteína) e colocada

em contacto com a solução proteica; permaneceu no agitador orbital vertical (Duomax 1030, Heidolph®), *overnight*.

No dia seguinte, a matriz foi empacotada na coluna XK16, com o auxílio de uma vareta e com cuidado para não deixar bolhas de ar. Antes de colocar a coluna no AKTA, procedeu-se à sua lavagem e equilíbrio, com água destilada e tampões cromatográficos. A coluna foi conectada no AKTA e equilibrada no tampão G, pH 7.0, com um fluxo de 1 ml/min, até a absorvância a 280 nm se apresentar estável.

Para eliminar a ureia e fazer o *refolding* da proteína, foi iniciado um gradiente de 0 a 100% com o tampão B, pH 7.0, durante 6-8 volumes de coluna, a um caudal de 1 ml/min; o gradiente termina quando se verificar um valor de condutividade e absorvância estável.

A eluição da proteína dá-se com a injeção do tampão C, pH 7.0, (ver composição no anexo 2.2) no sistema. Este tampão contém imidazole, que interage com a matriz, libertando a proteína. A recolha da amostra foi iniciada quando a absorvância a 280 nm começou a aumentar, formando um pico indicativo de que a proteína está a sair da coluna. Quando a absorvância estabilizou, terminou-se a recolha.

Substituiu-se o tampão C pelo tampão B, para eliminar o imidazole e de seguida reequilibrou-se novamente a coluna com tampão G. Depois de utilizada, a matriz é lavada com etanol 20% e armazenada a 4°C para posterior utilização.

Após a eluição da proteína prosseguiu-se então para a eliminação da cauda de histidinas da proteína que era essencial para a ligação da proteína à matriz de níquel. Foi adicionada uma solução de trombina numa concentração de 0,1 U/ml. Como o pH ótimo para a trombina atuar é de 8.0-8.5, o pH da proteína eluída foi previamente ajustado de 7.0 para 8.0, com uma solução de NaOH concentrada. A trombina ficou a atuar durante 6h, com agitação magnética, à temperatura ambiente.

Para remoção da trombina adicionou-se 100 µl de p-aminobenzamidina-agarose (em excesso) durante 1 hora, a 4°C. A solução foi depois filtrada, com um papel de filtro Whatman nº1 e de seguida dialisada contra água destilada durante 24 horas (a água foi trocada pelo menos 3 vezes); foram utilizadas mangas de diálise com um *cut-off* de 12 kDa, permitindo conservar a proteína dentro da manga e deixando sair a cauda de histidinas e o imidazole. Por fim, a solução proteica foi liofilizada (*Modulyo D-230, Thermo Scientific*) e armazenada a -80°C, para posterior utilização.

Ambas as versões da PrP (23-231 e Δ 23-128) seguem a mesma metodologia de produção e purificação.

2.2.1.3 SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida, utilizando o detergente SDS (*sodium dodecyl sulfate*) para desnaturar a proteína e conferir carga negativa uniforme, é uma técnica usada para separação proteínas de acordo com a sua mobilidade eletroforética.

Os géis de poliacrilamida são polimerizados em duas camadas para que as misturas proteicas possam ser concentradas antes da corrida no gel, o que permite um aumento da resolução. A mistura reacional que ocorre na formação dos géis inclui, para além da acrilamida e do SDS, bis-acrilamida (*N,N'*-metilenebisacrilamida) que funciona como *cross-linker*, um tampão de pH adequado, persulfato de amónio (APS – *ammonium persulfate*) usado como peróxido iniciador (a reação de polimerização da acrilamida é catalisada pela presença de radicais livres) e TEMED (*N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine) que atua como catalisador da reação.

Para este trabalho foi usado um sistema *Mini Protean* da BIORAD[®], o qual permite correr 2 géis simultaneamente, com as dimensões 83 mm (largura) x 70 mm (altura) x 1 mm (espessura). Os géis foram preparados com duas camadas – *stacking* (camada de concentração) e *resolving* (camada de resolução) – com concentrações distintas, a tabela 2.1 apresenta a composição das camadas, indicada para dois géis.

Tabela 2. 1 – Reagentes e quantidades utilizadas para a preparação de 2 géis SDS-PAGE.

	<i>Resolving Gel</i> (12%)	<i>Stacking Gel</i> (5%)
Água MiliQ (ml)	4,3	2,9
1,5M Tris HCl pH8.8 (ml)	2,5	-
1M Tris HCl pH 6.8 (ml)	-	0,5
Acrilamida/Bis 40% (ml)	3,0	0,5
10% SDS (µl)	100,0	40,0
10% APS (µl)	100,0	40,0
TEMED (µl)	10,0	4,0
Total (ml):	10,0	4,0

Após a polimerização dos géis, estes são colocados num suporte dentro de uma tina, a qual foi preenchida com tampão de corrida. Este tampão foi preparado a partir de uma solução 10 vezes mais concentrada (ver composição no anexo 2.2).

O procedimento para a preparação das amostras a correr nos géis, decorreu do seguinte modo: as amostras foram fervidas (100°C) durante 5 minutos, na presença de um tampão contendo um agente redutor diluído de 1:4 – *loading dye* (ver composição em anexo 2.2) – que ajuda a desnaturar a estrutura tridimensional das proteínas. As amostras foram então carregadas nos poços do gel (geralmente são carregados 10-20 µl de amostra); foi também carregado no gel o marcador *Precision Plus™ Protein Standards All Blue* da Biorad®, como referência para ser possível analisar, posteriormente, o peso molecular das proteínas. Foi aplicada uma corrente elétrica sob os géis; inicialmente de 50/60 V e passados uns 15/20 minutos aumentou-se a corrente para 100 V.

No final da corrida, os géis foram corados com o corante Azul de *Coomassie* (ver composição em anexo 2.2), durante aproximadamente 1 hora com agitação suave. Quando corados, foram transferidos para uma solução descolorante (10% de ácido acético e 30% de etanol) o tempo necessário para ser possível visualizar as bandas das proteínas. Foram tiradas fotografias aos géis num sistema de documentação de géis (*Alpha Imager*), para posterior análise.

2.3 Formação de agregados fibrilares

A proteína liofilizada foi posteriormente usada para a formação de agregados fibrilares, a fim de estudar a toxicidade que estes provocam em células neuronais. Durante este processo foi avaliado o desenvolvimento das fibrilhas em situações padrão (tampão acetato de sódio 20 mM) com diferentes concentrações de osmólitos: glicerol a 0,9 e 1,8 M e a arginina a 0,2 e 0,3 M.

Este procedimento foi feito para ambas as versões da PrP (23-231 e Δ 23-128).

As soluções preparadas para este processo estão descritas no anexo 2.2.

Solubilizou-se 130 μ M da proteína liofilizada numa solução de GdnHCl 6M, pH 5.5 (ver composição no anexo 2.2). A concentração desejada foi obtida monitorizando a absorvância numa gama entre 260 e 340 nm e empregando a Lei de *Lambert-Beer* com o valor da $Ab_{S_{280nm}}$ e o coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{PrP_{23-231}} = 63495 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{PrP_{\Delta 23-128}} = 20525 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

Foram preparados 5 ensaios, para cada uma das condições a testar, com uma concentração de proteína final de 22 μ M, num volume final de 1 ml; são também preparados brancos (sem a proteína), para verificar se existem interferências de algum dos componentes na fluorescência da tioflavina T (ThT), usada para seguir o processo de fibrilhação. A fibrilhação decorre em *ependorfs* numa placa de aquecimento (TS-100 Biosan[®]) a 37°C com agitação de 800 rpm.

A formação de fibrilhas foi monitorizada utilizando uma solução de tioflavina T 25 μ M (ver composição no anexo 2.2), sendo as fibrilhas diluídas de 1:10. A ThT tem sido amplamente utilizada na deteção de amilóides porque aumenta a sua fluorescência quando se liga a estes agregados (Liu *et al.*, 2010). A ThT insere-se nos espaços formados entre as cadeias laterais dos aminoácidos que formam as folhas β (Sulatskaya *et al.*, 2011), aumentando a sua emissão de fluorescência a 485 nm, após excitação a 444 nm. Inicialmente, a intensidade de fluorescência (IF) foi monitorizada de 4 em 4 horas para observar o início do desenvolvimento fibrilhar, passando depois a ser monitorizada de 8 em 8 horas ou de 12 em 12 horas.

No final da fibrilhação (quando obtido um patamar na intensidade de fluorescência da ThT) as fibrilhas foram centrifugadas (VWR, modelo 2416) a 7100g durante 10 minutos. Para esterilizar as fibrilhas antes de as incubar com as células, estas

foram colocadas sob luz ultravioleta durante 1 hora. Por fim, foram preparados os meios para o crescimento das células animais contendo as fibrilhas obtidas nas diversas condições. Para que todos os meios tivessem uma quantidade de fibrilhas semelhante, foi feita a média dos 4 valores de intensidade de fluorescência da ThT superiores. Às fibrilhas que apresentavam o menor valor de intensidade de fluorescência adicionou-se 5 ml de meio OPTI-MEM (suplementado com 10% de FBS – *Fetal Bovine Serum* – e 1% de *Penicillin Streptomycin*). Nas restantes condições adicionou-se um volume de meio superior, de modo a obter um valor igual de intensidade de fluorescência da ThT (i.e., a mesma quantidade de fibrilhas).

Foram também preparadas fibrilhas da proteína S6. Para tal, solubilizou-se a proteína numa concentração de 22 μM , numa solução de NaCl 0,4 M, pH 2. A fibrilhação e a sua monitorização decorreram do modo já descrito anteriormente. Esta proteína já se encontrava produzida e purificada, pelo que não foi referida no capítulo 2.2.

2.4 Cultura de células N2a do neuroblastoma de ratinho

Foi utilizada uma linha celular derivada de células de um neuroblastoma de ratinho (*N2a cells*) porque são um modelo muito utilizado para estudar a expressão da PrP^C e a sua conversão em PrP^{Sc}.

A cultura de células foi iniciada utilizando células congeladas em *cryovials* (a -80°C), contendo 1 ml de 10% DMSO (*dimethylsulfoxide*) e 90% FBS. As células foram descongeladas num banho a 37°C, centrifugadas em meio OPTI-MEM (suplementado com 10% de FBS – *Fetal Bovine Serum* – e 1% de *Penicillin Streptomycin*) com uma diluição de 1:10, durante 5 minutos a 1000 rpm, para retirar o DMSO; o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em meio; as células foram então expandidas em *T-Flasks 75 cm²* em meio OPTI-MEM, até uma confluência de 80-90%.

Após obtida a confluência adequada, o meio foi aspirado e fez-se a lavagem com tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline*). As células foram depois tripsinizadas durante 2 minutos, diluídas de 1:5 em PBS e centrifugadas, durante 5 minutos a 1000 rpm; o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 5 ml de meio OPTI-MEM.

Após a ressuspensão das células, pode ser feita nova expansão, para posterior congelação, ou podem então ser iniciados os ensaios de neurotoxicidade e viabilidade celular.

2.5 Neurotoxicidade das fibrilhas em células N2a avaliada com o fluoróforo Hoechst 33342

O objetivo deste ensaio é avaliar a toxicidade das fibrilhas formadas nas diferentes condições sobre a linha celular N2a de neuroblastoma de ratinho. As células são coradas com *Hoechst 33342* que é um corante fluorescente que ao entrar dentro das células se liga ao DNA e emite fluorescência, permitindo distinguir o núcleo condensado característico das células apoptóticas.

Este ensaio foi iniciado com uma densidade celular de aproximadamente 10000 células/cm² em placas de 12 poços, com uma área de 3,8 cm², nas quais se depositaram previamente lamelas esterilizadas em etanol a 70%, permitindo posteriormente a sua análise no microscópio. As células ficaram a incubar 16 horas, a 37°C numa incubadora com 5% CO₂ (*Heracell 150, Heraeus*).

Após as 16 horas de incubação, para aderência das células à superfície, o meio foi substituído pelo meio com fibrilhas. Foi preparado um poço controlo – células N2a + meio OPTI-MEM sem fibrilhas – e 5 poços com fibrilhas produzidas nas diferentes condições – células N2a + meio com fibrilhas.

As células permaneceram em cultura durante aproximadamente 4 dias, permitindo assim obter uma confluência de 80-90% no controlo (sem fibrilhas). Findo este tempo foi adicionado a cada poço 1 µl de uma solução de *Hoechst 33342* 0,1 mg/ml por ml de meio e agitou-se levemente a placa. Após 15 minutos de incubação (a 37°C), para internalização do corante, o meio foi retirado e as células lavadas, cuidadosamente, com meio fresco para retirar o corante não internalizado, adicionou-se meio fresco e foram novamente a incubar durante 1 hora, para adequada incorporação do *Hoechst*. Após esse tempo, as lamelas, contendo as células coradas, foram colocadas (invertidas) em lâminas com 10 µl de *Mowiol* e celadas com verniz, para prevenir possíveis contaminações. O meio retirado inicialmente, ou seja, o meio contendo células que se libertaram da superfície de cultura, nomeadamente células mortas e detritos que se

acumulam em suspensão, foram centrifugadas durante 5 minutos a 1000 rpm e depois de ressuspendidas foram também colocadas em lâminas para posterior análise.

Foram obtidas imagens das células através do microscópio *Zeiss Axioimager Z2* utilizando a objetiva de 63x. O *software* utilizado é o *AxioVision*, versão 4.8.2.0. Para o processamento e análise das imagens foi utilizado o *software ImageJ*, versão 1.6.0.

2.6 Viabilidade celular avaliada por atividade das desidrogenases

O ensaio de viabilidade celular é um ensaio complementar ao da neurotoxicidade, avaliado através do fluoróforo *Hoechst*, que permite determinar o número de células viáveis durante a proliferação celular. O *Cell Counting Kit-8* (CCK-8, Sigma[®]) utiliza um sal de tetrazólio (WST-8) que produz o corante *formazan* solúvel em água, após redução na presença de um transportador de elétrons. O CCK-8 é uma solução que não necessita de uma pré-mistura de componentes e não sendo radioativo permite ensaios colorimétricos para determinação do número de células viáveis durante a proliferação celular e em ensaios de citotoxicidade. O WST-8 é reduzido por desidrogenases presentes nas células, formando um produto de cor amarela solúvel no meio de cultura, o *formazan* (figura 2.2). A quantidade de *formazan* formado, pela atividade das desidrogenases nas células, é diretamente proporcional ao número de células vivas. Foi utilizado este *kit* porque não é tóxico para as células, é de fácil aplicação e a sensibilidade de detecção é muito superior a outros sais de tetrazólio, como o MTT, XTT, MTS ou WST-1.

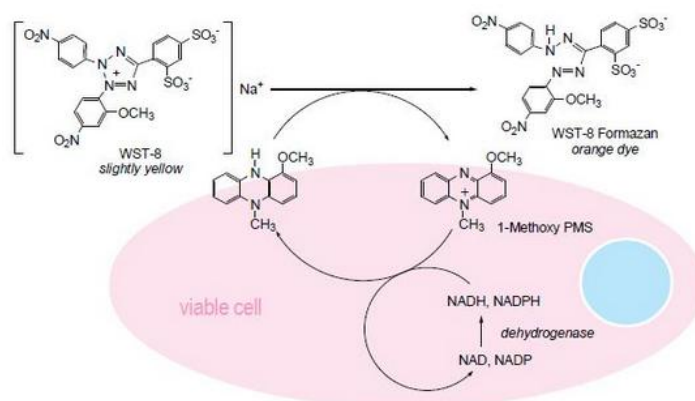


Figura 2.2 – Mecanismo de detecção da viabilidade celular com o CCK-8.

Inicialmente prepararam-se poços com diferentes concentrações celulares, permitindo criar uma reta padrão, cuja equação permite estimar o número de células viáveis ao longo do tempo.

Para iniciar o ensaio foi utilizada uma densidade celular de 10000 células/cm², numa placa de 96 poços (área = 0,3 cm²). Neste ensaio existiam poços com as células N2a e meio sem fibrilhas e poços com células N2a e meio com fibrilhas nas várias condições a testar. Foram feitos duplicados para cada condição e repetidos os ensaios, para ser possível seguir a proliferação celular para vários tempos – t₀ (0h), t₁ (24h), t₂ (48h) e t₃ (72h).

Inicialmente as células foram inoculadas a 37°C (Heracell 150, Heraeus) durante 16 horas em meio OPTI-MEM (sem fibrilhas) e só depois se substituiu este meio pelo meio contendo as fibrilhas. O reagente do kit CCK-8 foi descongelado durante 5 minutos, num banho a 37°C, e foram adicionados 10 µl aos poços da curva padrão e ao t₀; os poços com o reagente ficaram a incubar 3 horas e de seguida mediu-se a sua absorvância a 450 nm num leitor de placas (*Tecan Infinite M200*). Esta absorvância é diretamente proporcional com o número de células viáveis. Para as amostras do t₁, t₂ e t₃ o CCK-8 foi adicionado passado 24h, 48h e 72h, respetivamente; e procedeu-se do mesmo modo.

2.7 Derivatização da proteína priónica com o fluoróforo Alexa 568

Com o objetivo de se averiguar a interação das fibrilhas da PrP com as células e eventualmente o contributo da PrP celular para a internalização das fibrilhas ou apenas com a sua ligação à membrana, derivatizou-se a PrP com o fluoróforo *Alexa 568* (*Invitrogen*) antes de formar as fibrilhas.

O fluoróforo *Alexa 568* emite fluorescência a 603 nm, após excitação a 578 nm. Este fluoróforo reage com as amins primárias da proteína, através do derivado *succinimidyl ester* o qual proporciona uma ligação covalente entre o fluoróforo e a proteína. O *Alexa 568* liga-se então às lisinas da proteína priónica, assim como à amina primária presente no N-terminal.

Foram solubilizados 10 mg da proteína liofilizada (PrP₂₃₋₂₃₁) em 1 ml de uma solução de bicarbonato de sódio 0,2 M e GdnHCl 6 M, a pH 8.3. A concentração desejada foi obtida monitorizando a absorvância numa gama entre 260 e 340 nm e usando a Lei de *Lambert-Beer* com o valor da $Ab_{S_{280nm}}$, o coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{PrP_{23-231}} = 63495 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e o peso molecular da proteína ($PM_{PrP_{23-231}} = 23163 \text{ Da}$).

O fluoróforo *Alexa 568* foi dissolvido em 100 μl de DMSO e desta solução foram adicionados 50 μl à solução de 10 mg/ml de proteína, ficando sob agitação durante 1 hora (sem luz), no agitador orbital vertical.

O fluoróforo que não reagiu foi removido por filtração gel usando uma coluna PD MinitrapTM G-25 (*GE Healthcare Life Sciences*). A coluna foi equilibrada em bicarbonato de sódio 0,2 M e GdnHCl 6 M. Foram depois adicionados 0,5 ml da solução proteica com o fluoróforo incorporado deixando-se entrar completamente na matriz (*flow-through* descartado). De seguida, adicionaram-se 0,8 ml de tampão (solução de bicarbonato de sódio 0,2 M e GdnHCl 6 M) na coluna e recolheu-se a primeira amostra – 1^a eluição. Estes passos foram repetidos e recolhida a 2^a eluição. De modo a poder reutilizar a coluna, esta deve ser lavada com tampão, água miliQ e por fim guardada em etanol a 20%.

No final, a proteína (derivatizada com o fluoróforo) foi quantificada por absorção entre 260 e 340 nm, recorrendo à lei de *Lambert-Beer* e foi medido o espectro de emissão e excitação do fluoróforo numa gama entre 500 a 603 nm. Foram feitas alíquotas e armazenadas a -80°C.

A preparação de agregados fibrilares decorre do mesmo modo já descrito anteriormente no ponto 2.3. Porém, só foi estudada a fibrilhação no tampão acetato de sódio 20 mM e não nos osmólitos utilizados anteriormente.

Iniciou-se uma cultura celular com 10000 células/cm², onde após 16 horas de incubação foi adicionado o meio com os agregados fibrilares derivatizados com o fluoróforo. Foram tiradas fotografias passados 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 1 dia, 2 dias e 3 dias de cultura, para seguir a eventual internalização das fibrilhas com base na fluorescência do *Alexa 568*.

As imagens foram obtidas usando um microscópio confocal *Zeiss LSM 710*, com uma objetiva de 63x. O *software* utilizado foi o *AxioVision*, versão 4.8.2.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção da proteína priónica

As células de *E. coli* BL21 (DE3) foram transformadas com o plasmídeo pRSET-A, resistente à ampicilina e contendo o gene da PrP de rato. A expressão da proteína deu-se com o IPTG como indutor, o qual é um análogo sintético da lactose que induz a transcrição genética sob controlo do promotor *lac*. Recolhendo uma alíquota antes da indução e no final da fermentação foi possível verificar a expressão da proteína através de um gel de SDS-PAGE (figura 3.1).

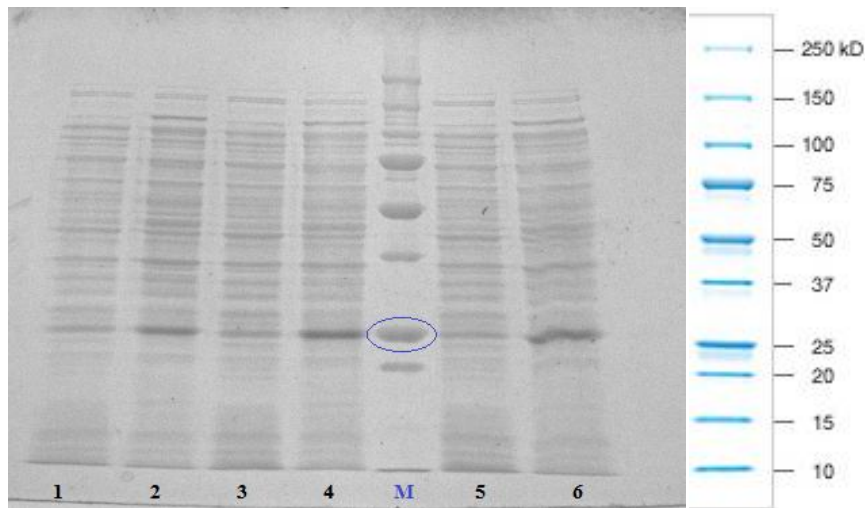


Figura 3. 1 – Gel de SDS-PAGE indicativo da expressão da proteína priónica em células de *E. coli* BL21 (DE3). **1,3 e 5** – alíquotas recolhidas antes da indução com IPTG; **2, 4 e 6** – alíquotas recolhidas no final da fermentação; **M** – marcador *Precision Plus™ Protein Standards All Blue*, com peso molecular em kDa. A banda com um círculo azul corresponde a 25 kDa.

As bandas de interesse neste gel são as bandas na região dos 23-25 kDa, sendo que o peso molecular da PrP₂₃₋₂₃₁ é de 23163 Da. É então possível verificar nesta figura que as bandas referentes às alíquotas recolhidas após a indução (2, 4 e 6) têm uma banda mais intensa, com um peso molecular próximo dos 25 kDa, do que as alíquotas recolhidas antes da indução (1, 3 e 5), o que indica que de facto houve sobre-expressão da proteína.

Ao longo da fermentação foram recolhidas alíquotas, permitindo assim apresentar um gráfico representativo da curva de crescimento das células de *E. coli* para produção da proteína priónica, através do $\ln(DO_{600\text{ nm}})$ ao longo do tempo (figura 3.2). Esta figura

permite então verificar que o IPTG foi adicionado na fase exponencial do crescimento celular.

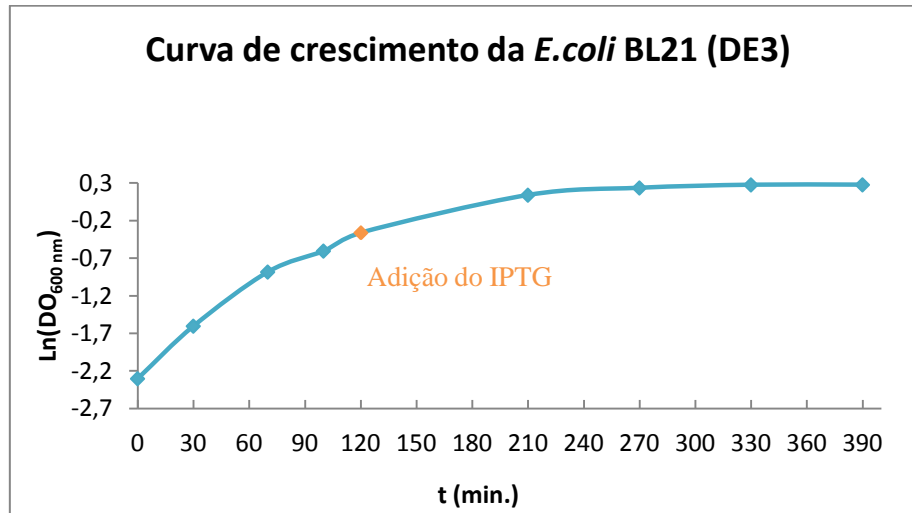


Figura 3. 2 – Representação gráfica da curva de crescimento das células de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o gene da PrP₂₃₋₂₃₁. O ponto a laranja indica o momento em que se adicionou o IPTG.

3.2 Purificação da proteína priónica

A purificação da proteína foi feita através de IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*) e foi possível obter um cromatograma que ilustra o processo de purificação (figura 3.3). Neste cromatograma é possível identificar a fase de equilíbrio da coluna com o tampão G, o gradiente com o tampão B para o *refolding* da proteína e eluição com o tampão C, contendo imidazole. O imidazole como está em concentração superior liga-se ao níquel da matriz cromatográfica e liberta a proteína, eluindo-a (o cromatograma mais completo encontra-se no anexo 3.2).

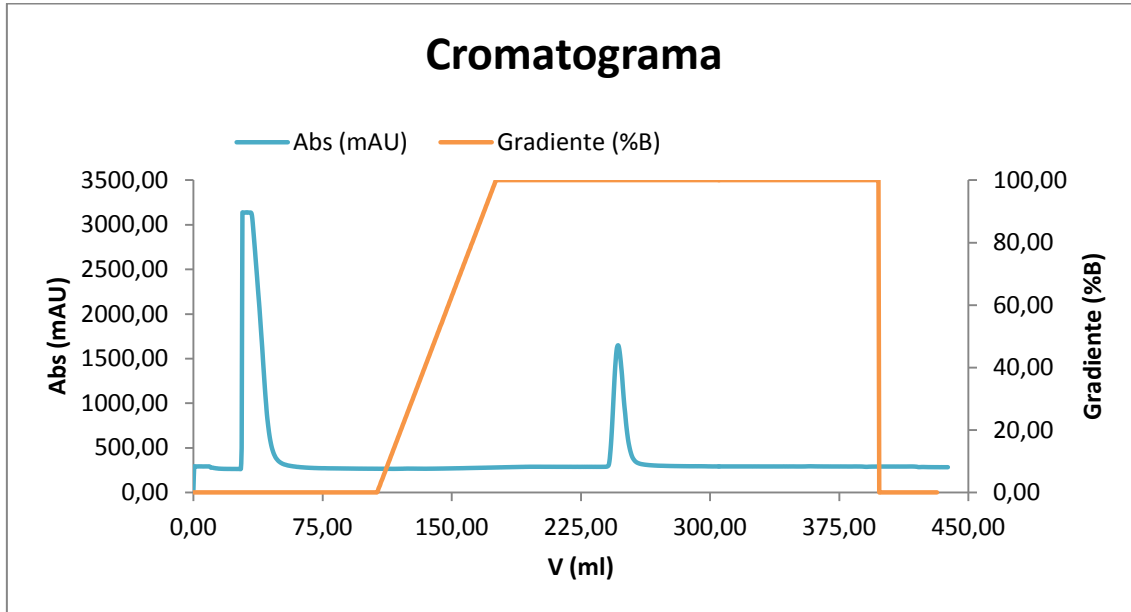


Figura 3.3 – Representação gráfica do cromatograma obtido no processo de cromatografia para eluição da proteína priónica (o segundo pico a azul corresponde à eluição da proteína).

Após extração da proteína procedeu-se ao corte da cauda de histidinas. Esta apresenta uma sequência de aminoácidos com um local de clivagem específico para a trombina (ver sequência da proteína no anexo 1.1), a qual é uma protease que cliva, seletivamente, a ligação peptídica entre a arginina e a glicina.

A trombina ficou então a atuar durante 6 horas à temperatura ambiente. Para remoção da trombina foi adicionada a p-aminobenzamidina-agarose, a qual é utilizada como um ligando de afinidade que se liga e remove proteases serínicas, sendo a solução de seguida filtrada. Para remover a cauda de histidinas da solução, realizou-se então uma diálise, utilizando mangas de diálise com um *cut-off* de 12 kDa, permitindo conservar a proteína dentro das mangas e removendo as histidinas e o imidazole da eluição. É esperado que após a remoção da cauda de histidinas, o peso molecular da proteína diminua, sendo possível avaliar num gel de SDS-PAGE a eficiência do corte (figura 3.4). Depois da diálise, prosseguiu-se para a liofilização, um processo que permite a sublimação da água.

De modo a ser possível verificar se o corte da cauda de histidinas foi eficaz e se a diálise e liofilização não degradaram a proteína, foram recolhidas alíquotas antes e depois do corte com a trombina e no final da diálise, recolheu-se também uma pequena porção da proteína liofilizada. Estas amostras foram depois corridas num gel de SDS-PAGE (figura 3.4).

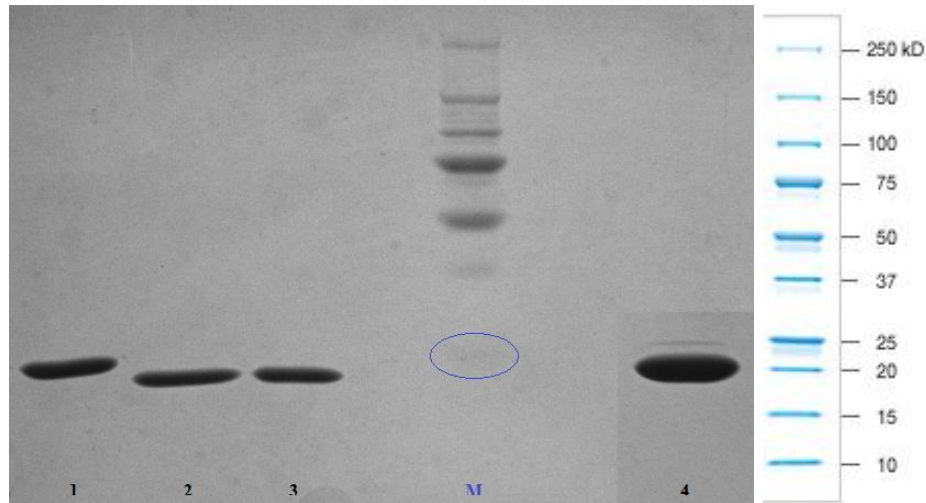


Figura 3. 4 – Gel de SDS-PAGE indicativo do corte com a trombina, diálise e liofilização. **1** – Alíquota antes do corte com a trombina; **2** – alíquota após o corte com a trombina; **3** – alíquota após a diálise; **4** – proteína liofilizada; **M** – marcador *Precision Plus™ Protein Standards All Blue*, com peso molecular em kDa. A banda com um círculo azul corresponde a 25 kDa.

Pode ver-se neste gel a existência de uma única banda correspondente à PrP₂₃₋₂₃₁ (poço 2), o que indica que o corte foi efetuado eficientemente, caso contrário existiria uma pequena porção de proteína não cortada. Em relação à diálise e liofilização pode-se concluir que a proteína não é degradada durante estes processos (poço 3 e 4).

A quantificação da proteína recombinante final, ou seja, da proteína dialisada, foi feita recorrendo à lei de *Lambert-Beer* (equação 3.1) numa gama entre 260 e 340 nm. A tabela 3.1 indica os valores utilizados para esta quantificação.

$$Abs_{280nm} = \epsilon_{280nm} \cdot l \cdot c \quad \text{(equação 3.1)}$$

Sendo $\epsilon_{280nm} = 63495 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $l = 1 \text{ cm}$.

Tabela 3. 1 – Absorvância a 280 e 340 nm, coeficiente de extinção molar (ϵ) e peso molecular (PM) da PrP₂₃₋₂₃₁, concentração, em molaridade (M) e em mg/ml, da proteína priónica produzida após a diálise.

	$\epsilon_{280nm} (\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$	PM (g/mol)	$A_{280 \text{ nm}}$	$A_{340 \text{ nm}}$	c (M)	c (mg/ml)
PrP ₂₃₋₂₃₁	63495	23163,4	0,013	0,001	$9,45 \cdot 10^{-6}$	0,217

Sendo que o volume de solução proteica era de 120 ml, então no total obteve-se aproximadamente 26 mg de proteína.

3.3 Formação das fibrilhas na ausência e presença de osmólitos

A deposição de fibrilhas amilóides no cérebro tem sido associada a diversas doenças neurodegenerativas e até agora não foram desenvolvidas terapêuticas eficazes para curar este tipo de doenças. Contudo, tem sido sugerido que a inibição ou mesmo a redução desse tipo de agregados possa ser uma possível estratégia preventiva contra essas doenças. Neste trabalho foram analisados os efeitos do glicerol e da arginina como supressores da formação de fibrilhas *in vitro*.

A proteína priônica foi solubilizada numa solução de GdnHCl 6 M, à qual se adicionou depois uma solução tampão de acetato de sódio 20 mM. Nas condições com osmólitos, para além das soluções já referidas, apresentavam também glicerol 0,9 M e 1,8 M e arginina 0,2 M e 0,3 M. A proteína foi a incubar a 37°C durante aproximadamente 92 horas.

A formação de fibrilhas foi monitorizada utilizando o corante fluorescente tioflavina T (ThT). Este corante apresenta uma propriedade única para formar complexos altamente fluorescentes com as fibrilhas, inserindo-se nos espaços formadas pelas cadeias laterais dos aminoácidos, que formam as folhas β . De acordo com Sulatskaya *et al.* (2011), o aumento do rendimento de fluorescência quando a ThT é incorporada nas fibrilhas é causado por uma restrição do movimento de rotação de parte da molécula de ThT relativamente ao resto da molécula. Esta restrição aumenta o tempo de vida do estado excitado e a emissão de fluorescência (Sulatskaya *et al.*, 2011) (figura 3.5).

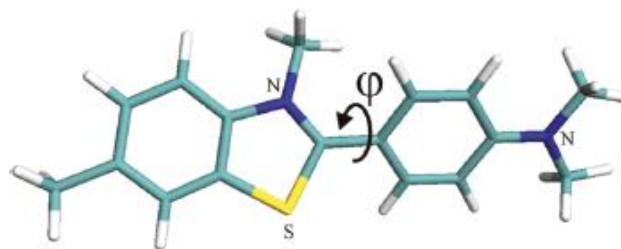


Figura 3. 5 – Molécula de tioflavina T mostrando o eixo de rotação da molécula que é restringido quando esta se incorpora nas fibrilhas proteicas (Sulatskaya et al., 2011).

Para controlar o perfil de fibrilhação nas várias condições testadas, foram recolhidas alíquotas ao longo do tempo e medida a intensidade de fluorescência da ThT a 485 nm. Foram realizados dois ensaios para cada versão da proteína priónica (23-231 e Δ 23-128) e um ensaio para a proteína S6.

As figuras 3.6 e 3.7 representam os perfis de fibrilhação da PrP nas várias condições testadas. Assumiu-se 100% de fibrilhação quando a intensidade de fluorescência da ThT atingiu um patamar para a fibrilhação da PrP em tampão acetato 20 mM, sem osmólitos.

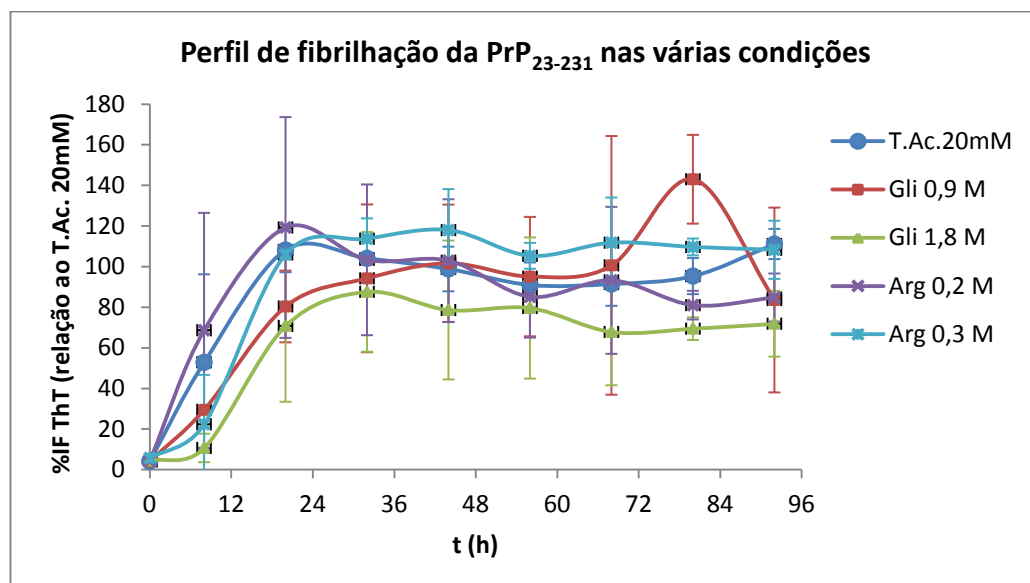


Figura 3.6 – Representação gráfica do desenvolvimento das fibrilhas da PrP₂₃₋₂₃₁ em tampão acetato de sódio 20 mM sem osmólitos (linha azul-escura), com glicerol 0,9 M e 1,8 M (linha vermelha e linha verde, respetivamente) e com arginina 0,2 M e 0,3 M (linha roxa e linha azul-clara, respetivamente).

A figura 3.6 mostra, como já foi referido, o perfil de fibrilhação da PrP₂₃₋₂₃₁ nas várias condições testadas, sendo possível constatar que o glicerol, em ambas as concentrações e em comparação com o tampão acetato 20 mM, atrasa o processo de fibrilhação numa fase inicial. Contudo, em concentrações superiores deste osmólito, este atraso é mais acentuado. Tal como já foi referido, o aumento da concentração deste osmólito estabiliza as proteínas através dos seus efeitos hidrofóbicos e da diminuição da tensão superficial da água. Este osmólito é então capaz de inibir a agregação das proteínas numa fase inicial. Contudo, é crucial encontrar uma concentração ótima e um tempo de incubação adequado para este efeito ser mais eficiente (Mishra *et al.*, 2005; Alibolandi & Mirzahoseini, 2011).

Em relação ao efeito da arginina, pode ver-se que apenas com uma concentração de 0,3 M é que existe um atraso no processo, novamente isto só se verifica no início do processo. O facto de a 0,2 M não se verificar um atraso pode ter a ver com a fraca interação deste osmólito com as proteínas, sendo que é necessário concentrações mais elevadas para se obter algum efeito sobre a proteína (Arakawa *et al.*, 2007).

Apesar dos atrasos que se verificaram inicialmente, a quantidade de fibrilhas que se observa no final do processo é semelhante para todas as condições estudadas (com e sem osmólitos), o que indica que apesar dos osmólitos serem aparentemente capazes de atrasar a cinética de agregação proteica não alteram o equilíbrio final da fibrilhação. Esta observação está de acordo com os resultados obtidos por Ignatova & Gierasch (2006) que analisaram o efeito da prolina na agregação de uma proteína globular e verificaram que esta apenas inibe os passos iniciais do processo de agregação. Após formação de agregados maiores, a prolina deixa de suprimir as interações intermoleculares. Os autores assumem que os agregados formados tardiamente apresentam uma superfície de exposição aos osmólitos significativamente mais pequena do que os agregados iniciais, e daí a interação dos osmólitos não ser tão favorável. No início do processo, como os agregados são pequenos, os sítios de ligação para os osmólitos estão menos impedidos e o seu efeito é mais significativo.

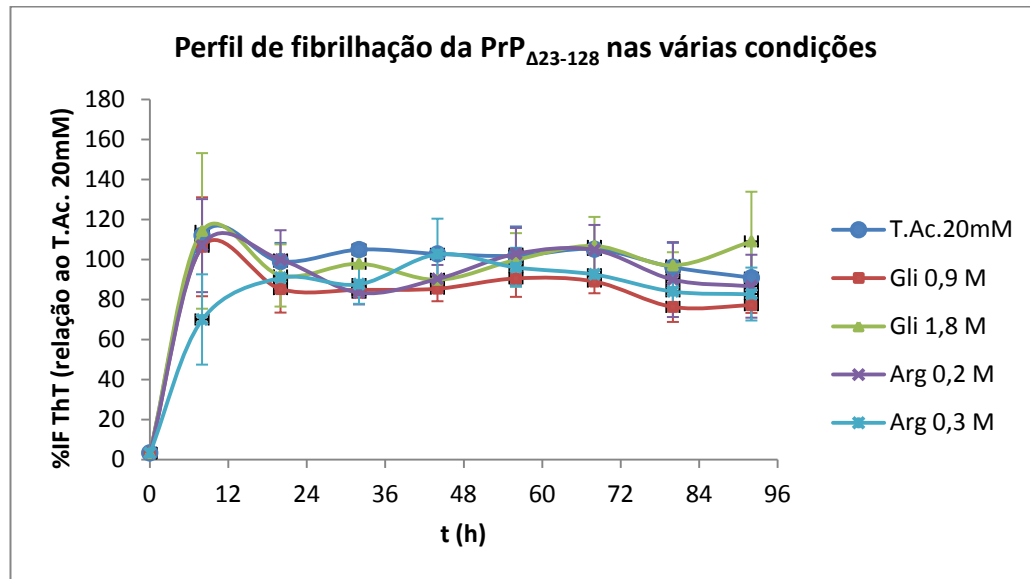


Figura 3.7 – Representação gráfica do desenvolvimento das fibrilhas da PrP $_{\Delta 23-128}$ em tampão acetato de sódio 20 mM sem osmólitos (linha azul-escura), com glicerol 0,9 M e 1,8 M (linha vermelha e linha verde, respectivamente) e com arginina 0,2 M e 0,3 M (linha roxa e linha azul-clara, respectivamente).

Em relação ao perfil de fibrilhação da PrP $_{\Delta 23-128}$ nas várias condições testadas (figura 3.7) não se verificam diferenças significativas entre o tampão acetato 20 mM sem osmólitos e com osmólitos (glicerol e arginina), exceto para a arginina a 0,3 M, onde se verifica um atraso no processo de fibrilhação após 8 horas de incubação. Contudo, após 20 horas basicamente acumula-se a mesma quantidade de fibrilhas do que nas restantes condições.

Sendo a PrP $_{\Delta 23-128}$ uma versão curta da proteína priônica, à qual se eliminaram os aminoácidos 23 a 128, ou seja, a região N-terminal da proteína, e não existindo diferenças no perfil de fibrilhação com e sem osmólitos, isto poderá significar que a região N-terminal pode realmente apresentar alguma importância na agregação das proteínas, pois foi visto que na PrP $_{23-231}$ os osmólitos atrasavam o perfil de fibrilhação.

Também se pode observar nas duas figuras anteriores que após 8 horas de incubação a PrP $_{\Delta 23-128}$ apresenta percentagens de intensidade de fluorescência da ThT entre 70 a 115%, enquanto na PrP $_{23-231}$ estas percentagens estão entre 10 a 70%. A agregação na PrP $_{\Delta 23-128}$ ocorre mais rapidamente do que na PrP $_{23-231}$. Esta observação está de acordo com estudos feitos com a proteína priônica, onde o objetivo era compreender como é que a região amino-terminal afetava a estabilidade e, consequentemente, o comportamento de agregação da proteína (Cordeiro *et al.*, 2005).

Este grupo comprovou que a agregação proteica ocorria mais rápido nos mutantes onde se tinha eliminado um maior número de aminoácidos.

Relativamente ao perfil de fibrilhação da proteína S6 já foram feitos estudos anteriores (Infante, 2011) que permitem afirmar que esta proteína apresenta um comportamento na formação de fibrilhas semelhante ao da proteína priônica aqui demonstrado. Em relação à quantidade final de fibrilhas da proteína S6 calculada com base na fluorescência da tioflavina é aproximadamente 70% do observado na condição em tampão acetato 20 mM da PrP₂₃₋₂₃₁ (dados não apresentados).

Para além da agregação da PrP_{Δ23-128} ocorrer muito mais rapidamente foi também possível observar que esta exibia intensidades de fluorescência (médias dos 2 ensaios) da ThT superiores às observadas para a PrP₂₃₋₂₃₁ (figura 3.8), ou seja, no mesmo período de tempo forma-se uma maior quantidade de fibrilhas da PrP_{Δ23-128}. Isto indica que a região N-terminal da proteína contribui para a estabilidade do domínio C-terminal diminuindo as interações intermoleculares que levam à formação das folhas β. Possivelmente o N-terminal pode provocar impedimento estereoquímico nas interações intermoleculares que conduzem à agregação.

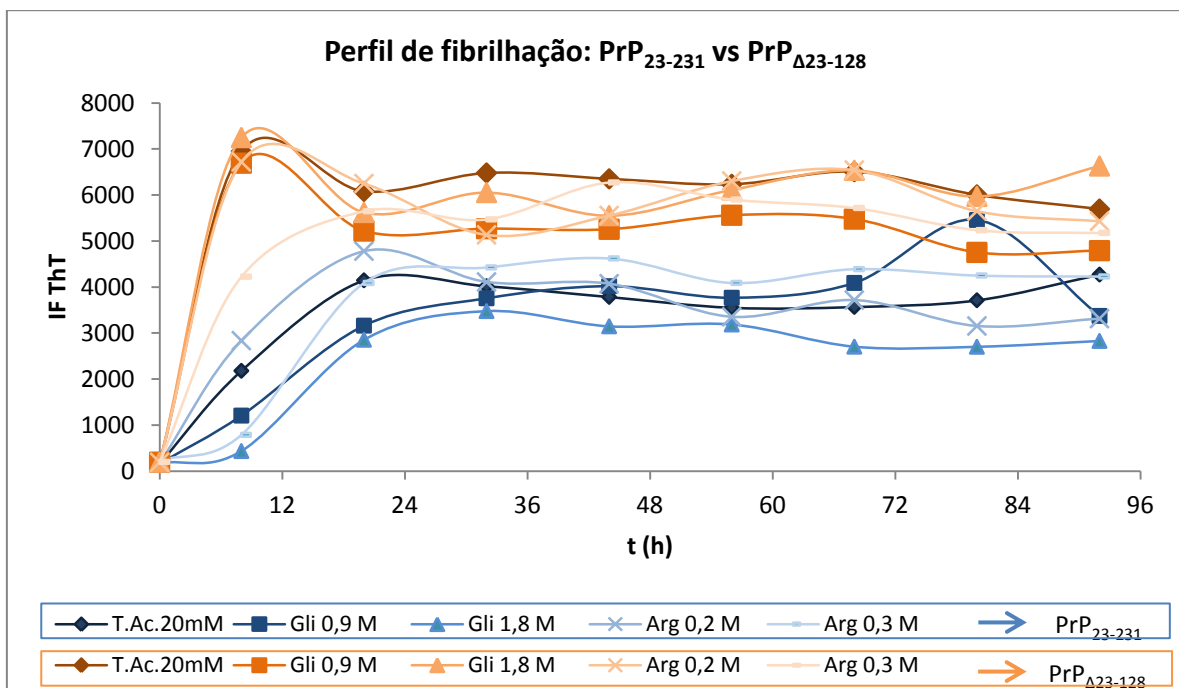


Figura 3. 8 – Representação gráfica do perfil de fibrilhação da PrP₂₃₋₂₃₁ (linhas azuis) e da PrP_{Δ23-128} (linhas laranja).

Alguns estudos sobre a quantificação de fibrilhas com a ThT na presença de compostos supressores da agregação, referem que existe uma inibição da ligação da ThT às fibrilhas amilóides causada por reagentes comuns, como o glicerol, o PEG (*polyethylene glycol*) e a arginina. A diminuição da ligação da ThT na presença destes compostos pode ser devido à competição direta para os locais de ligação comuns na superfície das fibrilhas, e não à dissociação das fibrilhas propriamente ditas (Liu *et al.*, 2010; Biancalana & Koide, 2010). Os resultados obtidos neste trabalho não suportam este ponto de vista na medida em que os patamares de fluorescência da ThT não dependem da presença de osmólitos. Apesar do enorme sucesso da tioflavina como um corante de amilóides, devido à sua fácil utilização, à grande capacidade de coloração e à sua elevada sensibilidade, são necessárias pesquisas mais detalhadas sobre o mecanismo molecular das interações da tioflavina para uma compreensão mais clara da formação, cinética, estrutura e patogénese das fibrilhas.

3.4 Neurotoxicidade das fibrilhas em células N2a de rato

3.4.1 Células em apoptose

Para investigar a toxicidade das fibrilhas *in vitro* foram utilizadas células N2a, suscetíveis à propagação da PrP^{Sc}. As células N2a foram expandidas durante 72 horas na ausência e na presença das fibrilhas formadas *in vitro*, nas várias condições a testar. Quando se observou uma confluência ótima, as células foram coradas com *Hoechst 33342*, o qual se liga ao DNA das células e emite fluorescência. Através desta metodologia foi possível detetar as células em apoptose, num microscópio *Zeiss Axioimager Z2*, utilizando uma objetiva de 63x. Foram feitos dois ensaios para cada versão da proteína priónica (PrP₂₃₋₂₃₁ e PrP_{Δ23-128}) e um ensaio utilizando a proteína S6.

Para o processamento e análise das imagens foi utilizado o *software ImageJ*, onde se identificaram as células mortas. Na figura 3.9 são apresentadas células N2a, coradas com *Hoechst 33342*, onde se pode observar a cromatina condensada (A) e fragmentada (B), característica de células em apoptose.

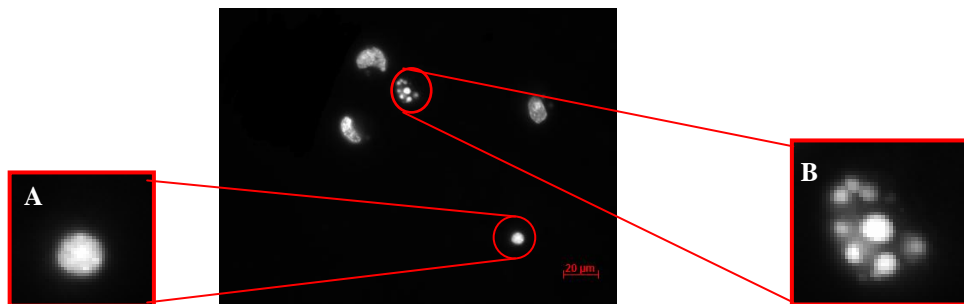


Figura 3. 9 – Células N2a expostas às fibrilhas durante 72 h, coradas com *Hoechst 33342*. As duas ampliações (A e B) ilustram células em apoptose. Em **A** está ilustrada a apoptose celular num estado inicial, isto é, a cromatina está condensada, em **B** vê-se a fragmentação do núcleo e célula.

Foi com base nas figuras anteriores que se diferenciaram as células mortas das células vivas. Nas figuras 3.10 e 3.11 estão representadas as células N2a, coradas com *Hoechst 33342*, que foram expostas às fibrilhas da PrP₂₃₋₂₃₁ e da PrP_{Δ23-128}, respetivamente, nas várias condições testadas. As setas a vermelho indicam as células em apoptose. Estas figuras não indicam em que condições existem mais células mortas, pois só é apresentada uma fotografia por condição, o que não representa a globalidade dos ensaios. Apenas se pretende observar que no controlo existem muito mais células

vivas e em divisão mitótica (círculos brancos apresentados nas figuras), enquanto nas condições com fibrilhas há menos células vivas e uma grande parte delas estão mortas.

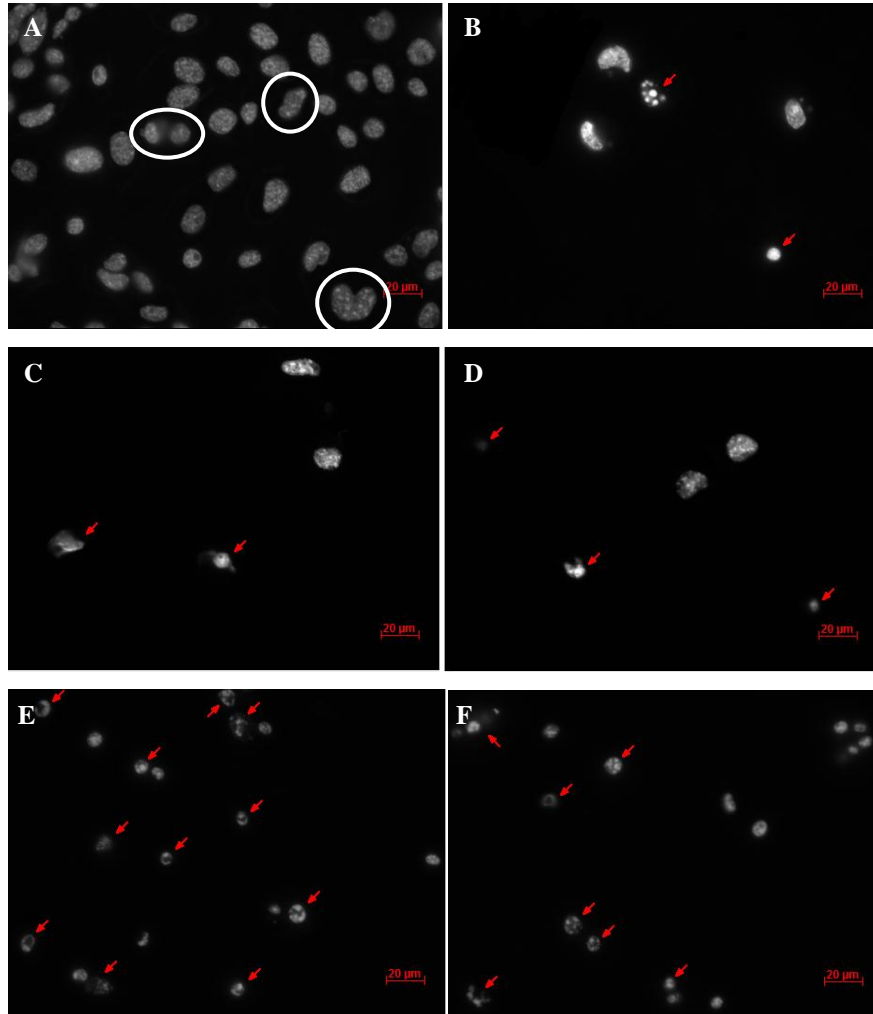


Figura 3. 10 – Células N2a na presença de fibrilhas da PrP₂₃₋₂₃₁ nas várias condições testadas. As células foram expostas às fibrilhas da PrP₂₃₋₂₃₁ durante 72 h e coradas com *Hoechst* 33342. **A** – células sem fibrilhas (controle); **B** – células expostas a fibrilhas formadas em tampão acetato de sódio 20mM, sem osmólitos; **C e D** – células expostas a fibrilhas formadas na presença de glicerol, 0,9 M e 1,8 M, respectivamente; **E e F** – células expostas a fibrilhas formadas na presença de arginina, 0,2 M e 0,3 M, respectivamente. As setas a vermelho indicam as células em apoptose. Os círculos brancos são as células em divisão mitótica. Barra de escala, 20 µm.

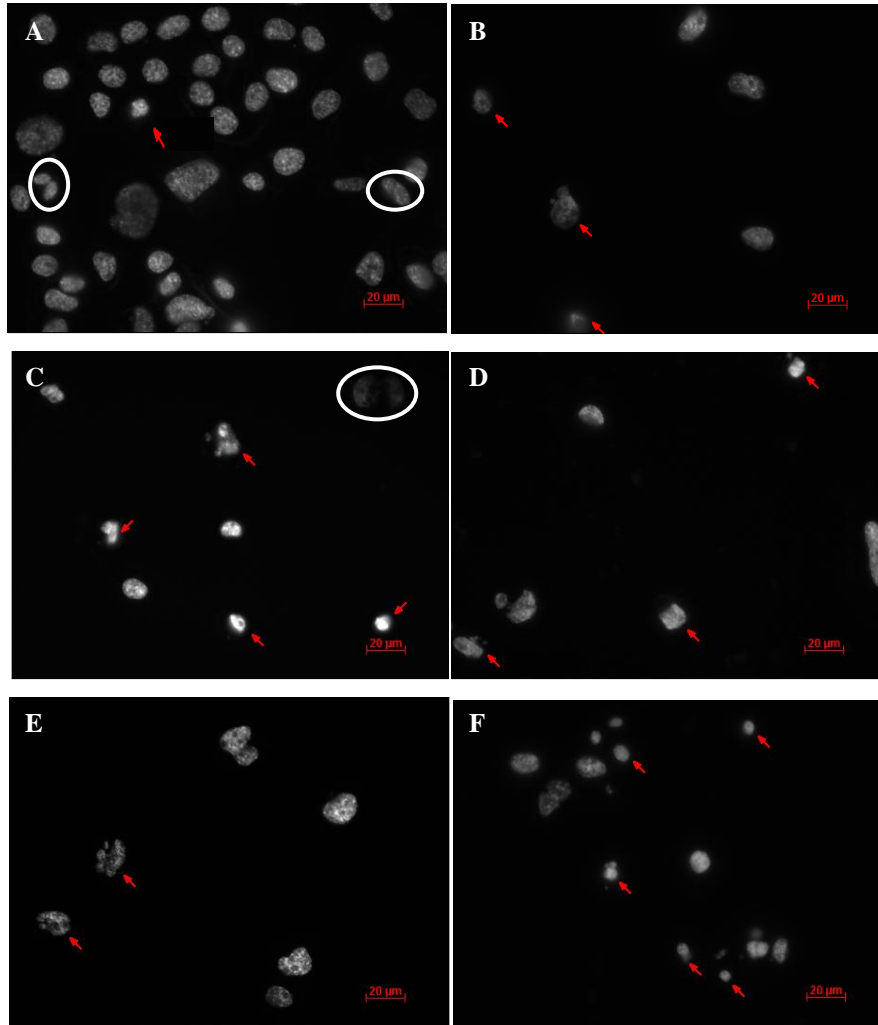


Figura 3.11 - Células N2a na presença de fibrilhas da PrP $_{\Delta 23-128}$ nas várias condições testadas. As células foram expostas às fibrilhas da PrP $_{23-231}$ durante 72 h e coradas com *Hoechst* 33342. **A** – células sem fibrilhas (controle); **B** – células expostas a fibrilhas formadas em tampão acetato de sódio 20mM, sem osmólitos; **C e D** – células expostas a fibrilhas formadas na presença de glicerol, 0,9 M e 1,8 M, respectivamente; **E e F** – células expostas a fibrilhas formadas na presença de arginina, 0,2 M e 0,3 M, respectivamente. As setas a vermelho indicam as células em apoptose. Os círculos brancos são as células em divisão mitótica. Barra de escala, 20 μ m.

Pode observar-se que tanto na presença de fibrilhas da PrP $_{23-231}$ como na presença de fibrilhas da PrP $_{\Delta 23-128}$, há uma elevada quantidade de células em apoptose (figuras 3.10 e 3.11, B-F) e que entre os dois ensaios (fibrilhas da PrP $_{23-231}$ e fibrilhas da PrP $_{\Delta 23-128}$) não são visíveis diferenças, isto é, ambas as proteínas quando agregadas, apresentam um nível de toxicidade semelhante. Em relação às fibrilhas com e sem osmólitos, também não se notam diferenças significativas entre as suas toxicidades. Nos controlos as células continuam em proliferação, enquanto que na presença de fibrilhas isso não se verifica com tanta frequência, indicando que as fibrilhas impedem o crescimento celular.

Foram também tiradas fotografias às células na presença de fibrilhas da proteína S6 (figura 3.12), que foi utilizada com uma proteína modelo com o objetivo de observar se, para além da proteína priónica, também esta seria tóxica para as células neuronais, depois de agregada. Pode então verificar-se que há muitas células vivas e em divisão mitótica (tal como acontecia nos controlos) e para além disso não se verificam muitas células em apoptose. A proteína S6, apesar de ter a capacidade de formar fibrilhas, não é tóxica para as células neuronais.

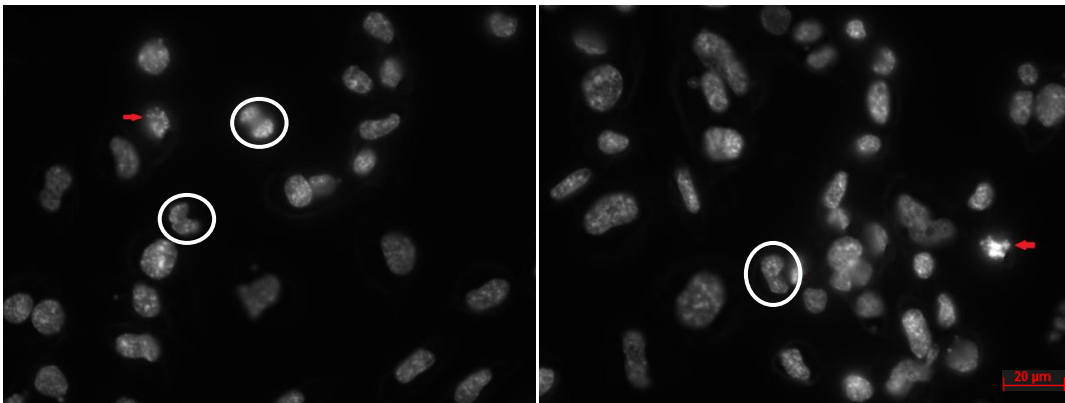


Figura 3. 12 – Células N2a na presença de fibrilhas da proteína S6 formadas na presença de NaCl, pH 2. As setas a vermelho indicam as células em apoptose. Os círculos brancos são as células em divisão mitótica. Barra de escala, 20 μm .

3.4.2 Percentagem de células mortas na presença de fibrilhas obtidas na ausência e presença de osmólitos

Para cada ensaio realizado foram tiradas entre 5 a 10 fotografias para cada condição testada. Foi feita a contagem das células, identificando as células vivas e mortas, e determinada a percentagem de células mortas através da equação 3.2. Fez-se a média e desvio padrão dessas percentagens para os dois ensaios de cada versão da proteína priónica. Estes resultados estão apresentados nas tabelas 3.2 e 3.3, para as duas versões da PrP e para a proteína S6, respetivamente.

$$\% \text{ células mortas (para cada condição)} = \frac{n^{\circ} \text{ células mortas}}{n^{\circ} \text{ células total}} \times 100\% \quad (\text{equação 3.2})$$

Tabela 3. 2 – Percentagem de células mortas (e respetivo desvio padrão) para cada condição testada. São apresentados os resultados para as fibrilhas da PrP₂₃₋₂₃₁ e da PrP_{Δ23-128}.

	PrP ₂₃₋₂₃₁		PrP _{Δ23-128}	
	% cél. mortas	DP	% cél. mortas	DP
Controlo	6,18	2,42	8,24	1,91
Fib. T.Ac. 20 mM	57,42	8,40	41,35	23,91
Fib. Glicerol 0,9 M	40,29	20,53	40,74	27,61
Fib. Glicerol 1,8 M	55,84	4,03	53,99	22,60
Fib. Arginina 0,2 M	45,36	16,07	41,23	16,94
Fib. Arginina 0,3 M	59,76	5,21	26,25	6,96

Tabela 3. 3 – Percentagem de células mortas na presença de fibrilhas da S6.

	% cél. mortas
Fibrilhas da proteína S6	15,13

Para ser possível comparar estes resultados em conjunto foi elaborado um gráfico (figura 3.13) que representa a percentagem de células mortas em cada condição testada, para cada versão da PrP e para a proteína S6.

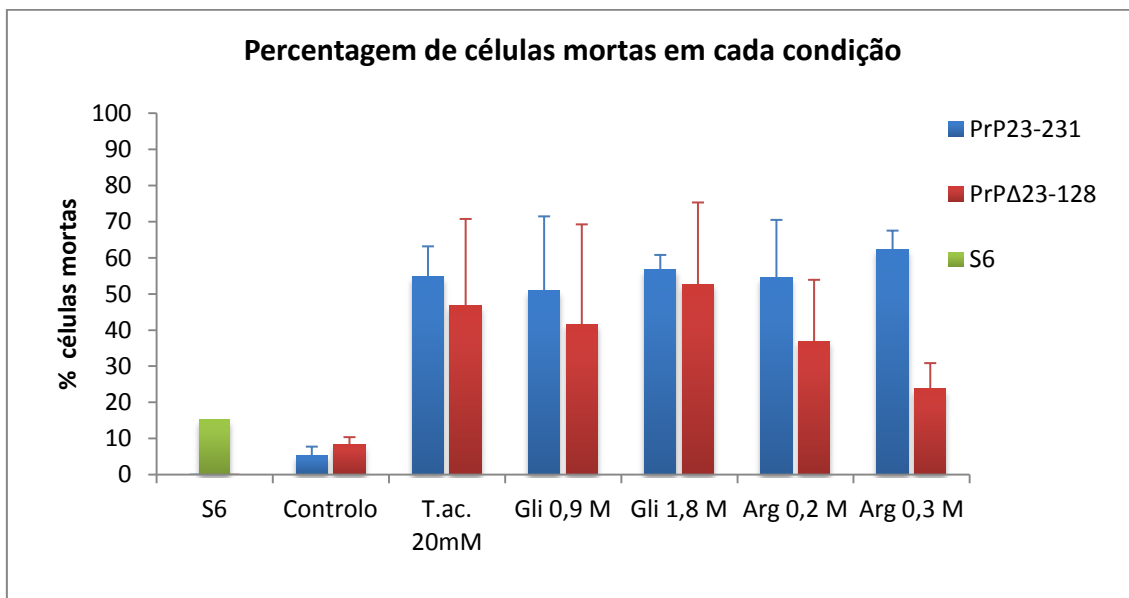


Figura 3. 13 – Representação gráfica da percentagem de células mortas expostas a fibrilhas da proteína S6 (barra verde), da PrP₂₃₋₂₃₁ (barras azuis) e da PrP_{Δ23-128} (barras vermelhas), após 72 h de cultura.

Como era esperado, a percentagem de células mortas no controlo é muito baixa relativamente à percentagem de células mortas na presença de fibrilhas. Este facto verifica-se para ambas as versões da PrP, pelo que mais uma vez se pode constatar que as fibrilhas de ambas as versões estudadas são uma espécie muito tóxica para as células neuronais.

Especificamente para a PrP₂₃₋₂₃₁, pode observar-se que a percentagem de células mortas na presença de fibrilhas com ou sem osmólitos não difere muito, o que indica que os níveis de toxicidade das fibrilhas formadas nas várias condições, não são alterados de forma significativa.

Relativamente aos níveis de toxicidade das fibrilhas formadas na ausência ou na presença dos osmólitos pode verificar-se que, tanto para as fibrilhas da PrP₂₃₋₂₃₁ como para as da PrP_{Δ23-128}, não ocorreram alterações, visto que a percentagem de células mortas entre cada condição é muito semelhante. Para além disso os desvios padrões também são um pouco elevados pelo que não seria correto assumir que, por exemplo, na presença de fibrilhas da PrP₂₃₋₂₃₁ formadas em glicerol 0,9 M há uma menor quantidade de células do que em glicerol 1,8 M. A única situação onde se poderá dizer que existe uma percentagem de células mortas inferior é na presença de fibrilhas da PrP_{Δ23-128} formadas na presença de arginina 0,3 M, única condição onde se verifica algum atraso na fibrilhação da versão curta da PrP (figura 3.7).

O facto de os osmólitos não terem efeito na neurotoxicidade das fibrilhas pode estar relacionado com a observação que após 1 dia de incubação a quantidade de fibrilhas era praticamente a mesma nas várias condições testadas, ou seja, o atraso que se verificou no início do processo não se manteve até ao final. Portanto, as fibrilhas formadas na presença de osmólitos acabaram por atingir o mesmo estado de maturação não dando origem a diferenças evidentes nos níveis de toxicidade das fibrilhas entre as várias condições de fibrilhação.

Em relação à percentagem de células mortas na presença de fibrilhas da S6 vê-se que esta é muito semelhante à observada nos controlo indicando que as fibrilhas da S6 não são tóxicas para as células neuronais.

3.5 Viabilidade celular na presença de fibrilhas obtidas na ausência e presença de osmólitos

Para complementar o ensaio da neurotoxicidade, onde se utilizou o *Hoechst 33342* para identificar as células em apoptose, foi também realizado um ensaio de viabilidade celular recorrendo a um processo enzimático.

A viabilidade celular é monitorizada pela medição da redução de um sal de tetrazólio (WST-8), na presença de desidrogenases presentes nas células, dando assim um produto de cor amarela solúvel no meio de cultura.

Para ser possível determinar a quantidade de células viáveis, foram feitas retas padrão para cada ensaio, o que permitiu obter equações lineares. Serão apresentadas apenas duas dessas retas (figura 3.14), visto serem todas muito semelhantes.

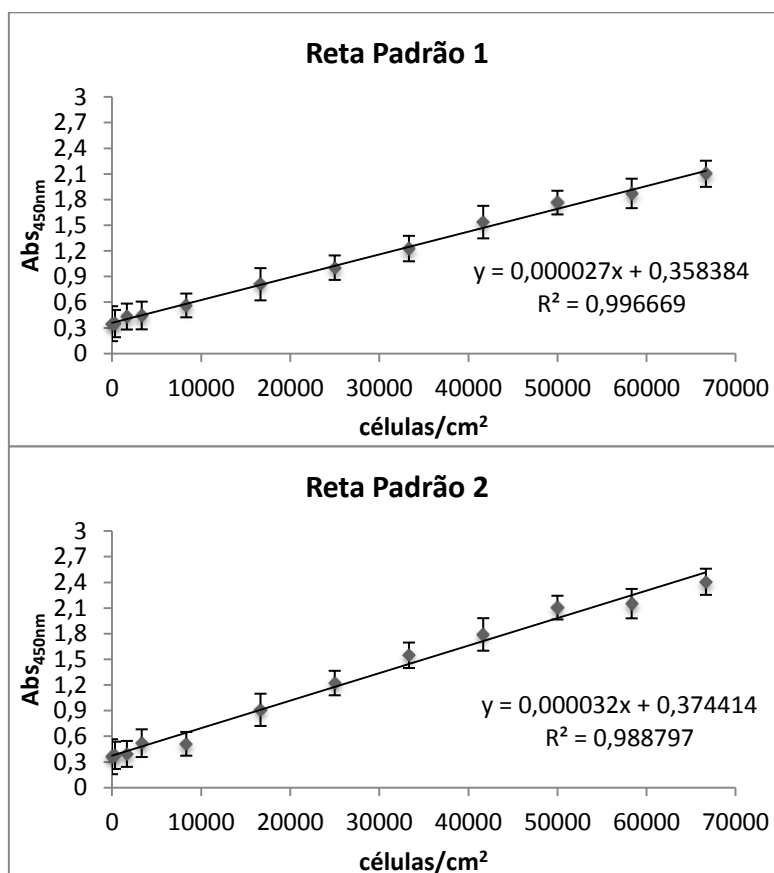


Figura 3. 14 – Representação gráfica de duas das retas padrão utilizadas para os ensaios de viabilidade celular.

Prepararam-se 5 condições a testar (tal como no ensaio de coloração do núcleo celular com o *Hoechst* 33342) e fizeram-se duplicados para cada uma delas. Foi medida a absorvância a 450 nm às 0, 24, 48 e 72 horas de incubação com as fibrilhas, com o objetivo de analisar a quantidade de células viáveis nas diversas condições, ao longo do tempo. Foram realizados dois ensaios para cada versão da proteína priónica e um ensaio para a proteína S6.

Para determinar a quantidade de células viáveis por cm^2 nas várias condições foi calculada a média dos valores de absorvância para os duplicados e aplicada a função $\bar{A}_{450\text{nm}} = m \cdot d + b$, onde $\bar{A}_{450\text{nm}}$ é a absorvância média para cada condição e d a densidade média de células por cm^2 . Os valores das densidades celulares ao longo das 72 horas na presença de fibrilhas da PrP₂₃₋₂₃₁ e da PrP_{Δ23-128} estão apresentados nas tabelas 3.4 e 3.5, respetivamente. A tabela 3.6 apresenta as densidades celulares na presença de fibrilhas da proteína S6.

Tabela 3. 4 – Densidade celular (e respetivos desvios padrões) em células por cm^2 , às 0, 24, 48 e 72 horas na presença de fibrilhas da PrP_{23,231}.

PrP ₂₃₋₂₃₁	t ₀ – 0 horas		t ₁ – 24 horas		t ₂ – 48 horas		t ₃ – 72 horas	
	d (cél/cm ²)	DP	d (cél/cm ²)	DP	d (cél/cm ²)	DP	d (cél/cm ²)	DP
Controlo	8022	2870	16550	1233	36510	5964	68649	21219
T.Ac.20 mM	7029	3530	6930	123	8922	4072	4347	3031
Gli 0,9 M	8240	1707	7103	732	6864	991	5561	3375
Gli 1,8 M	7276	2665	6358	2485	5743	1551	4424	3053
Arg 0,2 M	5860	3422	3622	2723	4770	1322	4413	3050
Arg 0,3 M	6604	2438	3892	2833	4109	2137	3082	2673

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 3. 5 – Densidade celular (e respetivos desvios padrões) em células por cm^2 , às 0, 24, 48 e 72 horas na presença de fibrilhas da PrP $_{\Delta 23-128}$.

PrP $_{\Delta 23-128}$	t ₀ – 0 horas		t ₁ – 24 horas		t ₂ – 48 horas		t ₃ – 72 horas	
	d (cél/cm ²)	DP	d (cél/cm ²)	DP	d (cél/cm ²)	DP	d (cél/cm ²)	DP
Controlo	7439	1356	12833	1524	42156	11601	57562	10592
T.Ac.20 mM	5534	2347	5660	1352	3818	437	2026	496
Gli 0,9 M	6992	1627	6509	947	6422	643	3875	911
Gli 1,8 M	6924	1429	6245	155	5077	992	3530	1294
Arg 0,2 M	4925	2005	5127	220	4149	670	1594	664
Arg 0,3 M	5523	1638	4422	250	2601	887	415	282

Tabela 3. 6 – Densidade celular em células por cm^2 , às 0, 24, 48 e 72 horas na presença de fibrilhas da proteína S6.

Proteína S6	Densidade celular (cél/cm ²)			
	t ₀ – 0 horas	t ₁ – 24 horas	t ₂ – 48 horas	t ₃ – 72 horas
	10483	20452	34195	108838

Este ensaio foi iniciado com uma densidade celular de aproximadamente 10000 células/cm². Porém, nem sempre se consegue pôr, exatamente, a mesma quantidade de células em todos os poços, o que poderá levar a variações ao longo do tempo, como se pode verificar nos controlos onde o ensaio enzimático de viabilidade não detetou 10000 células/cm².

Uma observação importante a retirar das tabelas 3.4 e 3.5 é que no tempo t₀, nas condições com fibrilhas, já se verificam menos células viáveis do que no controlo. Isto é particularmente evidente na presença de arginina, nas fibrilhas da PrP $_{\Delta 23-128}$, que é onde se verifica uma densidade de células viáveis inferior e com um desvio padrão relativamente baixo. Esta observação indica muito possivelmente que as fibrilhas quando postas em contacto com as células não necessitam de um longo período de tempo para causarem morte celular. No capítulo 3.7 (Transporte das fibrilhas nas células do neuroblastoma de ratinho), iremos discutir o que realmente acontece nas horas iniciais da cultura. Relativamente às seguintes horas de cultura, vemos que houve um aumento na quantidade de células viáveis no

controlo e uma diminuição da viabilidade celular na presença de fibrilhas (com ou sem osmólitos).

Na tabela 3.6 observa-se um aumento progressivo da viabilidade celular na presença das fibrilhas da proteína S6, o que confirma a não toxicidade das fibrilhas da S6 como referido anteriormente.

As figuras 3.15 e 3.16 representam a quantidade de células viáveis ao longo do tempo, no controlo e na presença de fibrilhas da PrP₂₃₋₂₃₁ e da PrP_{Δ23-128}, respetivamente. É também apresentada em cada uma destas figuras a viabilidade celular na presença de fibrilhas da S6.

Pode visualizar-se nas figuras seguintes que na condição sem fibrilhas e na condição com fibrilhas da proteína S6 o comportamento da viabilidade celular ao longo do tempo é muito semelhante, havendo um acréscimo progressivo da viabilidade, como referido anteriormente. Enquanto nas restantes condições as células não crescem, ou seja, a viabilidade celular é cada vez menor ao longo das 72 horas.

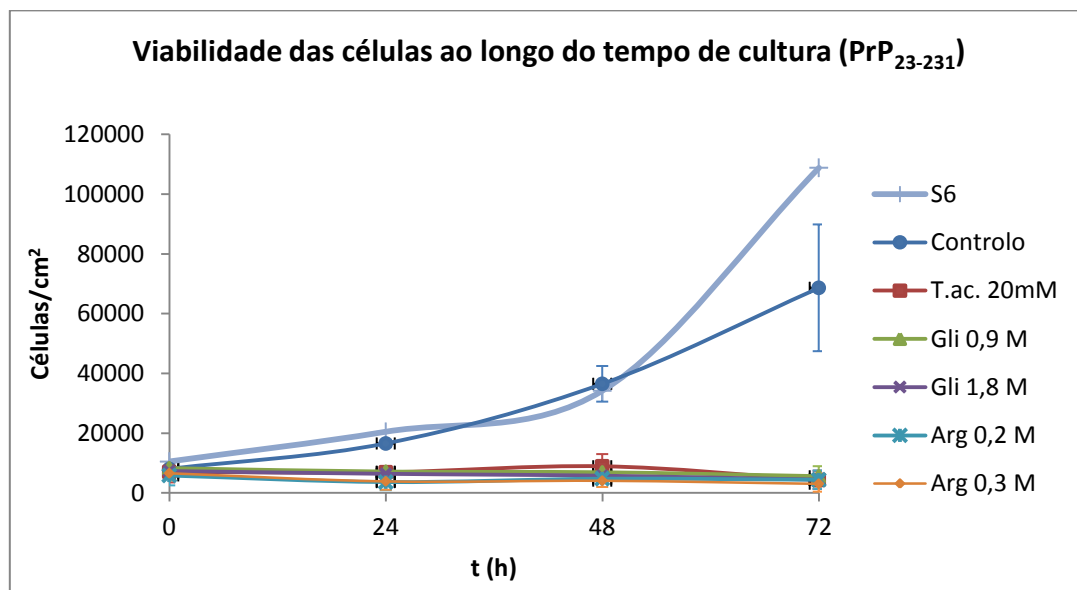


Figura 3. 15 – Representação gráfica da proliferação celular na presença de fibrilhas da PrP₂₃₋₂₃₁, ao longo do tempo, para cada condição testada. A proliferação celular na presença de fibrilhas da S6 também está representada no gráfico.

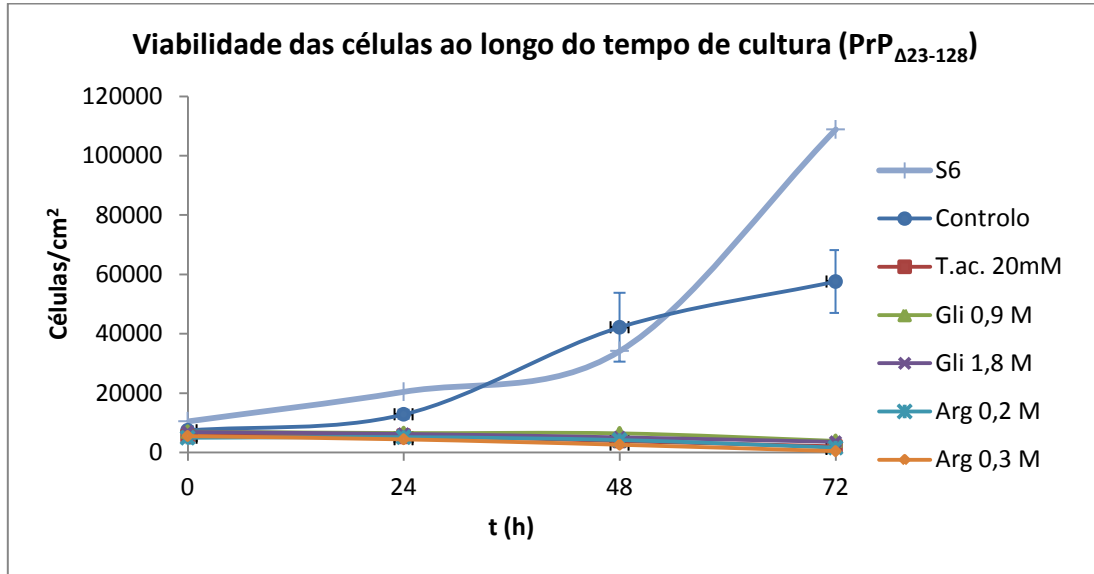


Figura 3. 16 – Representação gráfica da proliferação celular na presença de fibrilhas da PrP $_{\Delta 23-128}$, ao longo do tempo, para cada condição testada. A proliferação celular na presença de fibrilhas da S6 também está representada no gráfico.

Para uma melhor percepção da quantidade de células viáveis no tempo final da cultura celular em cada condição, foi determinada a percentagem de células viáveis após 72 horas de cultura. Assumiu-se para os controlos 100% de células viáveis e determinou-se a percentagem para as restantes condições através da equação 3.3 (resultados apresentados na tabela 3.7).

A percentagem de células viáveis na presença de fibrilhas da proteína S6 foi determinada em relação ao número de células/cm² do controlo de um dos ensaios da PrP $_{\Delta 23-128}$ (resultados apresentados na tabela 3.8). Isto porque o ensaio da S6 foi realizado em conjunto com o ensaio da versão curta da PrP, sendo as condições dos dois ensaios idênticas, a probabilidade de ocorrerem variações a nível celular e/ou ambiental é menor.

$$\% \text{ células viáveis } (t) = \frac{(n^{\circ} \text{cél.}/\text{cm}^2 \text{ com fibrilhas})_{t=t_3}}{(n^{\circ} \text{cél.}/\text{cm}^2 \text{ sem fibrilhas})_{t=t_3}} \times 100\% \quad (\text{equação 3.3})$$

Onde t_3 corresponde às 72 horas.

Tabela 3. 7 – Percentagem de células viáveis (e respectivos desvios padrão) para cada versão da proteína (PrP₂₃₋₂₃₁ e PrP_{Δ23-128}) nas várias condições testadas, após 72 horas de cultura.

	PrP ₂₃₋₂₃₁		PrP _{Δ23-128}	
	% células viáveis	DP	% células viáveis	DP
Controlo	100	0	100	0
Fib. T.Ac.20 mM	6,33	2,58	3,52	0,31
Fib. Glicerol 0,9 M	8,10	2,53	6,73	0,50
Fib. Glicerol 1,8 M	6,44	2,58	6,13	1,64
Fib. Arginina 0,2 M	6,43	2,58	2,77	0,94
Fib. Arginina 0,3 M	4,49	2,63	0,72	0,52

Tabela 3. 8 – Percentagem de células viáveis na presença de fibrilhas da proteína S6.

	% células viáveis
Fibrilhas da proteína S6	159,69

Através da tabela 3.7 pode verificar-se que a percentagem de células viáveis (em todas as condições) na presença de fibrilhas da PrP_{Δ23-128} é inferior ao número de células viáveis observado na presença de fibrilhas da PrP₂₃₋₂₃₁. A existência de menos células viáveis na presença de fibrilhas da versão curta da PrP significa que a eliminação de aminoácidos da proteína aumenta ligeiramente a toxicidade das fibrilhas. Esta observação pode estar relacionada com o que foi discutido no capítulo 3.3, onde se observou que a agregação da versão curta da PrP ocorria mais rápido do que a versão longa, assim como apresentava intensidades de fluorescência da ThT superiores, indicando que existia uma maior quantidade de folhas β.

Foi então realizado um gráfico com a percentagem de células viáveis após 72 horas de cultura (figura 3.17).

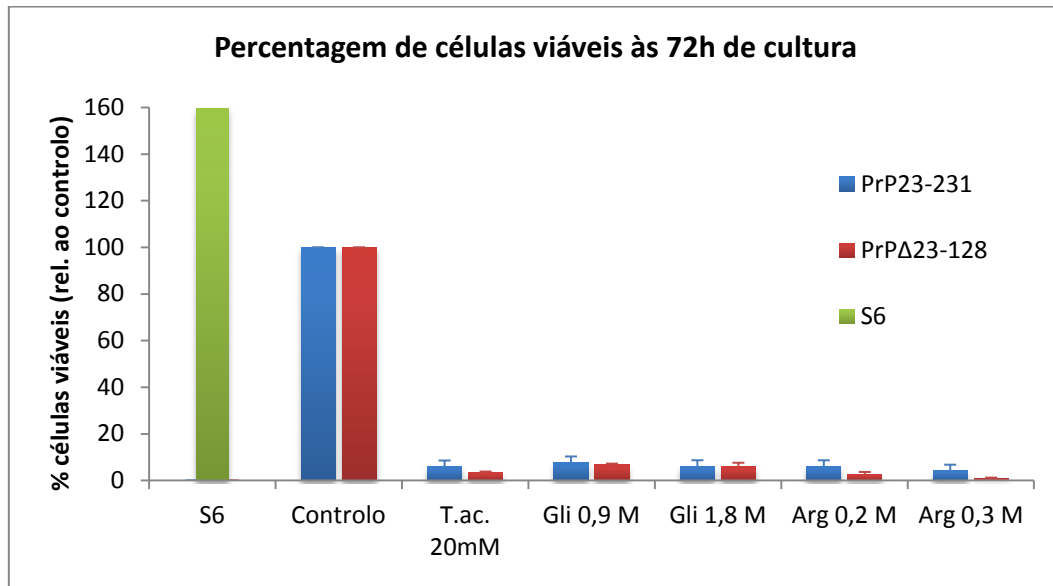


Figura 3. 17– Representação gráfica da percentagem de células viáveis expostas a fibrilhas da proteína S6 (barra verde), da PrP₂₃₋₂₃₁ (barras azuis) e da PrP Δ ₂₃₋₁₂₈ (barras vermelhas), após 72 h de cultura.

Este gráfico permite-nos afirmar que existe uma menor quantidade de células viáveis na presença de fibrilhas da PrP Δ ₂₃₋₁₂₈ formadas em arginina 0,3 M. Este resultado pode aparentemente estar em contradição com o observado no método de coloração com *Hoechst*, onde para a concentração mais elevada de arginina se observaram menos células mortas. No capítulo de comparação dos dois métodos estudados até aqui iremos discutir sobre este assunto.

Em relação à percentagem de células viáveis na presença de fibrilhas da proteína S6 verificou-se uma diferença acrescida em 60% entre esta e a percentagem de células viáveis nos controlos. Este resultado adveio, provavelmente, do facto de só ter sido realizado um ensaio para esta proteína sem duplicados, sendo que os valores diferem significativamente dos controlos. Todavia, apesar deste erro o objetivo desta proteína era apenas servir de controlo negativo, mostrando que as fibrilhas da S6 não apresentavam toxicidade.

3.6 Fluorescência do núcleo celular pelo *Hoechst 33342* comparada com a reação enzimática durante a proliferação celular

Tendo em conta que o ensaio de viabilidade celular, através de reações enzimáticas, é complementar ao ensaio de neurotoxicidade utilizando o *Hoechst 33342* para coloração do núcleo celular, permitindo identificar as células apoptóticas, foram determinadas as percentagem de proliferação celular através do CCK-8, onde se assumiu 100% de proliferação para os controlos às 72 horas, e as percentagens de células vivas através do ensaio de coloração com o *Hoechst 33342*, com as equações 3.4 e 3.5, respetivamente.

$$\% \text{ proliferação celular} = \frac{(n^{\circ} \text{cél.}/\text{cm}^2 \text{ com e sem fibrilhas})_{t=t_n}}{(n^{\circ} \text{cél.}/\text{cm}^2 \text{ sem fibrilhas})_{t=t_3}} \times 100\% \quad (\text{equação 3.4})$$

Onde t_n é $t_0 = 0\text{h}$; $t_1 = 24\text{h}$; $t_2 = 48\text{h}$; $t_3 = 72\text{h}$.

$$\% \text{ células vivas (para cada condição)} = \frac{n^{\circ} \text{ células vivas}}{n^{\circ} \text{ células total}} \times 100\% \quad (\text{equação 3.5})$$

A figura 3.18 A e B representam a percentagem de proliferação celular e a percentagem de células vivas, para a PrP₂₃₋₂₃₁ e para a PrP_{Δ23-128}, respetivamente.

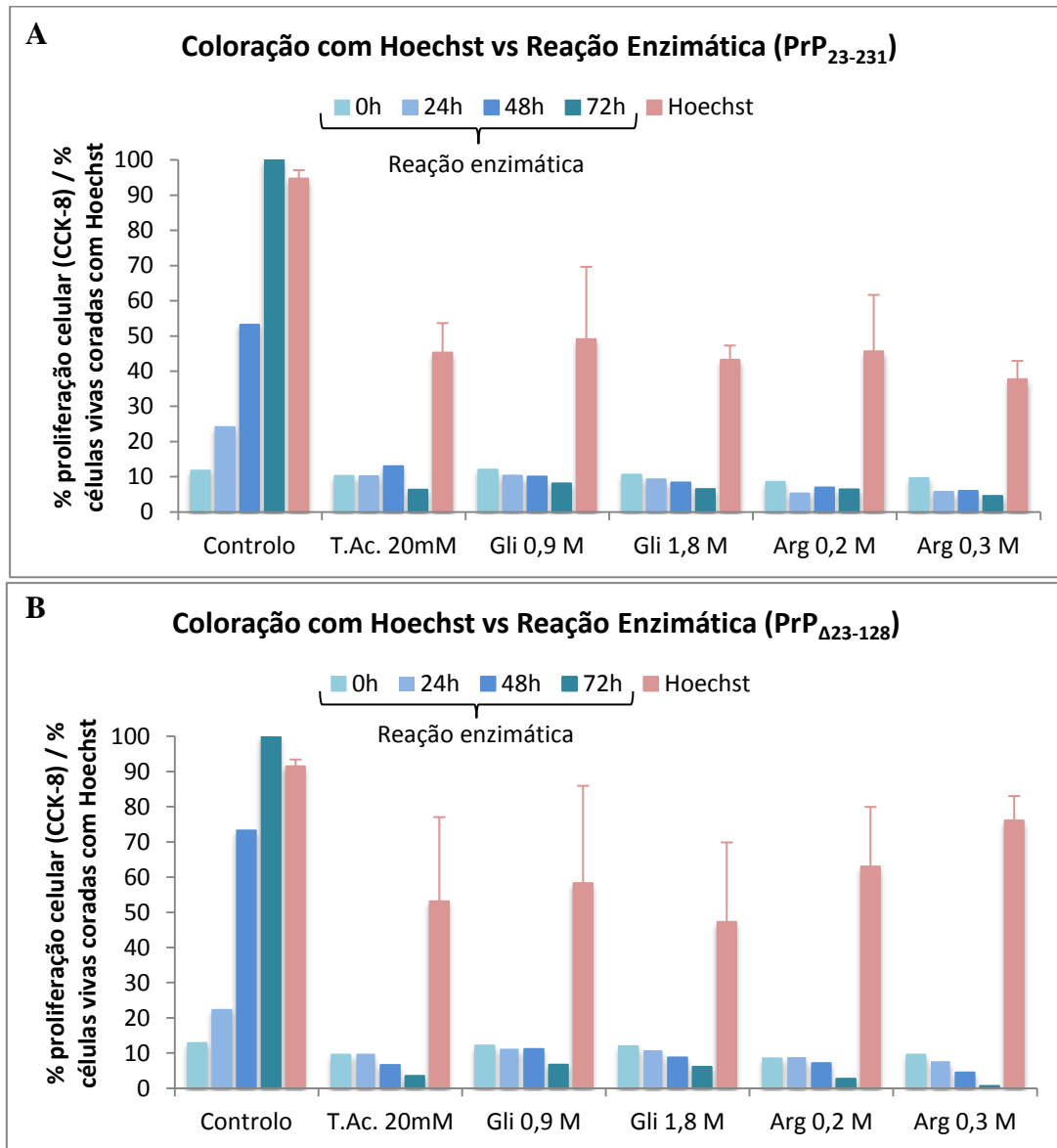


Figura 3. 18 – Representação gráfica da percentagem de proliferação celular ao longo de 72 h de cultura, no ensaio de viabilidade (barras azuis) e percentagem de células vivas após 72 h de cultura, no ensaio de coloração no núcleo celular com *Hoechst* (barras rosa), na presença de fibrilhas da PrP₂₃₋₂₃₁ (**A**) e de fibrilhas da PrP_{Δ23-128} (**B**) nas várias condições testadas.

Em relação à proliferação celular pode observar-se no controlo uma proliferação celular crescente ao longo das 72 horas de cultura, enquanto na presença de fibrilhas a proliferação tende a diminuir ao longo do tempo de cultura. No ensaio de coloração do núcleo das células pode ver-se que na presença de fibrilhas, em qualquer uma das condições, há muito menos células vivas do que no controlo, como seria de esperar.

Comparando os dois métodos, pode verificar-se que às 72 horas de cultura nos controlos a percentagem de células vivas é aproximadamente 95%, o que está de acordo

com o que se assumiu na proliferação celular. Na presença de fibrilhas os resultados dos dois métodos utilizados já são mais distintos. Por exemplo, na condição em tampão acetato 20 mM a percentagem de proliferação é aproximadamente 7%, enquanto a percentagem de células vivas é cerca de 45%. Apesar da diferença entre os valores de cada método, a situação é mesma para ambos, ou seja, tanto na percentagem de células vivas como na percentagem de proliferação celular na presença de fibrilhas existe uma diminuição drástica comparativamente com os controlos.

Relativamente às fibrilhas da PrP_{Δ23-128} (figura 3.18 B), pode mais uma vez observar-se que para a condição em arginina 0,3 M a percentagem de proliferação celular é muito inferior às restantes condições, porém no ensaio de coloração com o *Hoechst* observa-se que é nesta condição que existe uma maior quantidade de células vivas. Então, embora sejam resultados contraditórios, pois a diminuição da proliferação celular deveria levar a uma menor quantidade de células vivas, é um facto que a arginina a 0,3 M tem um efeito nas fibrilhas da PrP_{Δ23-128} que faz com que estas se comportem de um modo diferente das restantes condições. Estudos mais detalhados dos mecanismos de interação da arginina com versões da PrP na presença e na ausência da região N-terminal serão cruciais para compreender o que causa estes comportamentos.

No capítulo 3.3 verificou-se que a arginina 0,3 M causava sempre um atraso no processo de fibrilhação, mesmo na versão curta da PrP, na qual mais nenhuma condição causou um atraso. Também no capítulo 3.4.2 se observou que na presença de fibrilhas da PrP_{Δ23-128} existiam menos células mortas que nas restantes condições. Porém, o ensaio de neurotoxicidade através da coloração do núcleo com *Hoechst 33342* não é tao preciso como este, realizado através de reações enzimáticas, isto porque as contagens das células vivas/mortas realizadas por um operador podem ter muito mais erros, na medida em que as células podem parecer mortas e estarem apenas em divisão. Por esse motivo é que se utilizaram duas metodologias distintas para analisar o efeito neurotóxico das fibrilhas em células N2a.

Através destes dois métodos é então possível dizer que as fibrilhas da proteína priónica, em ambas as versões estudadas, são tóxicas para as células, causando a sua morte e impedindo a sua proliferação. E apesar de não se verificarem grandes diferenças nos níveis de toxicidade das fibrilhas com e sem osmólitos, pode dizer-se que a arginina tem um papel importante tanto no processo de fibrilhação como na toxicidade destas espécies, principalmente na versão curta da PrP.

3.7 Internalização e transporte das fibrilhas em células do neuroblastoma de ratinho

As infecções priónicas propagam-se desde os tecidos periféricos até ao sistema nervoso central, onde as patologias se desenvolvem. Para que isto aconteça a infeção deve invadir os neurónios e ser transportada desde o ponto de infeção até às extremidades celulares onde supostamente ocorre a transferência para outras células (Magalhães *et al.*, 2005). Contudo, a invasão do sistema nervoso e a propagação da infeção através da proteína priónica são processos críticos e ainda existe pouca informação sobre eles.

Na tentativa de elucidar o comportamento das fibrilhas da PrP relativamente à infeção de células N2a, a proteína priónica foi conjugada covalentemente com o fluoróforo *Alexa 568* antes de se induzir a sua fibrilhação.

Para se ter uma noção da quantidade de PrP marcada foi necessário determinar as concentrações da proteína e do *Alexa*. Para tal foram medidas as absorvâncias a 280 e 578 nm, comprimento de onda de emissão da proteína e do *Alexa*, respetivamente, e determinadas as respetivas concentrações através da lei de *Lamber-Beer* ($\epsilon_{280\text{nm}} = 63495 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $\epsilon_{578\text{nm}} = 91300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Assim, com a equação 3.6 e sendo as concentrações da proteína e do *Alexa*, 259 e 137 μM , respetivamente, foi possível prever que em cada 2 moléculas de PrP apenas uma é marcada com o fluoróforo *Alexa 568*.

$$\text{Degree of Labeling} = C_{\text{PrP}} / C_{\text{Alexa}} \quad \text{(equação 3.6)}$$

Após a derivatização da PrP com o fluoróforo foi então iniciada a fibrilhação. A figura 3.19 representa o perfil de fibrilhação da PrP₂₃₋₂₃₁ marcada com *Alexa 568* paralelamente ao perfil de fibrilhação da PrP₂₃₋₂₃₁ não marcada. A percentagem da intensidade de fluorescência foi calculada da mesma forma já descrita no capítulo 3.3.

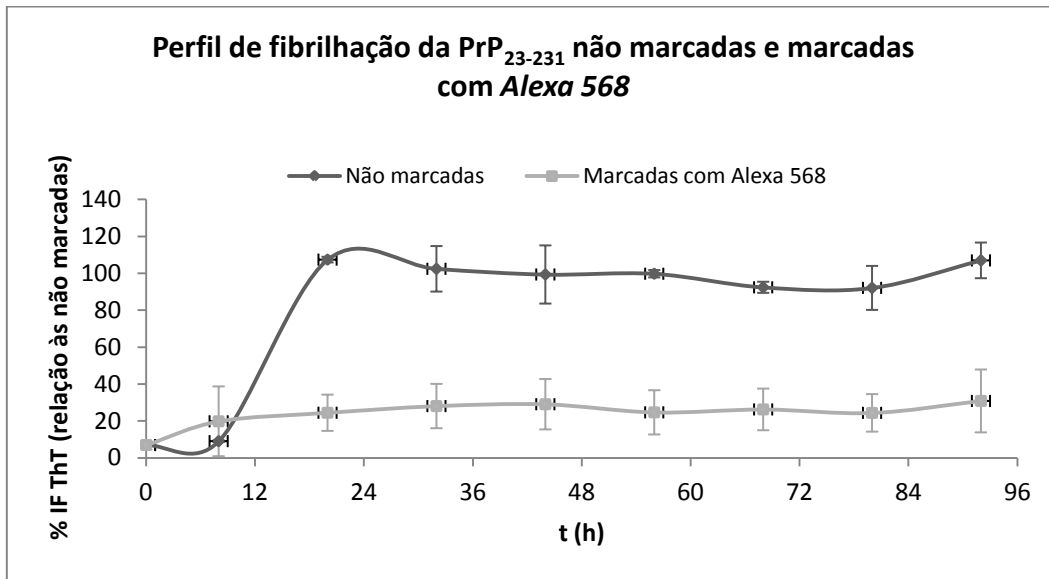


Figura 3.19 – Representação gráfica do desenvolvimento das fibrilhas da PrP₂₃₋₂₃₁ não marcada (linha cinza-escura) e marcada com *Alexa 568* (linha cinza-clara). Ambas as fibrilhas se formaram na solução tampão acetato de sódio 20 mM.

Nesta figura observa-se que a percentagem de IF da ThT nas fibrilhas marcadas com o *Alexa 568* é muito inferior à das fibrilhas não marcadas e sempre constante. Uma razão possível para esta ocorrência poderá ser a obstrução que o *Alexa* causa à tioflavina, não permitindo uma ligação tão extensiva deste corante aos agregados. Isto faria com que a intensidade de fluorescência da ThT para a proteína marcada estivesse num patamar inferior ao observado para a proteína não marcada, mas não implicaria necessariamente que a quantidade de fibrilhas não fosse semelhante. Outra razão poderia ser o impedimento estereoquímico que a molécula de *Alexa* causaria, não permitindo que ocorressem interações intermoleculares entre proteínas, provocando uma diminuição dos agregados. Contudo, estas hipóteses só poderiam ser confirmadas através da análise das fibrilhas formadas com e sem *Alexa*, com TEM ou AFM para verificar a sua estrutura ou com um ensaio mais específico que o da ThT, que permitisse quantificar os agregados nas duas condições.

Terminada a fibrilhação, colocaram-se as fibrilhas em contacto com as células N2a durante aproximadamente 72 horas e de seguida foram tiradas fotografias no microscópio *Zeiss Axioimager Z2*, onde se pode ver o núcleo das células corado com *Hoechst 33342* e as fibrilhas marcadas com o *Alexa* (figura 3.20).

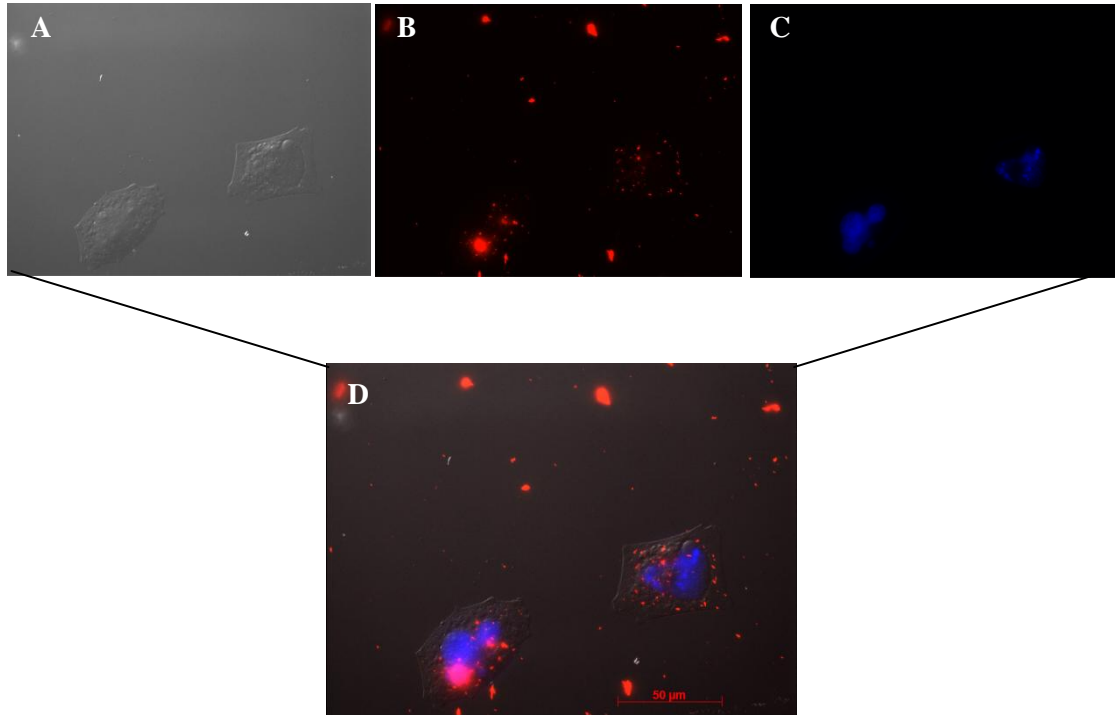
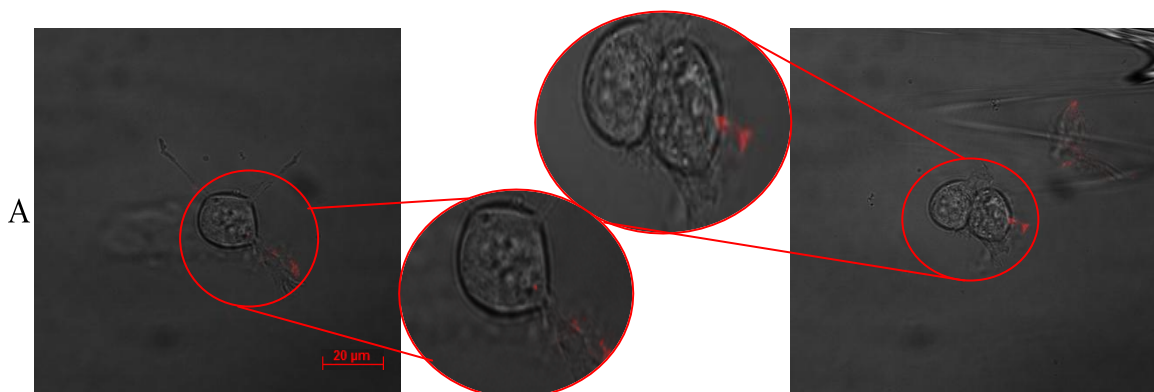
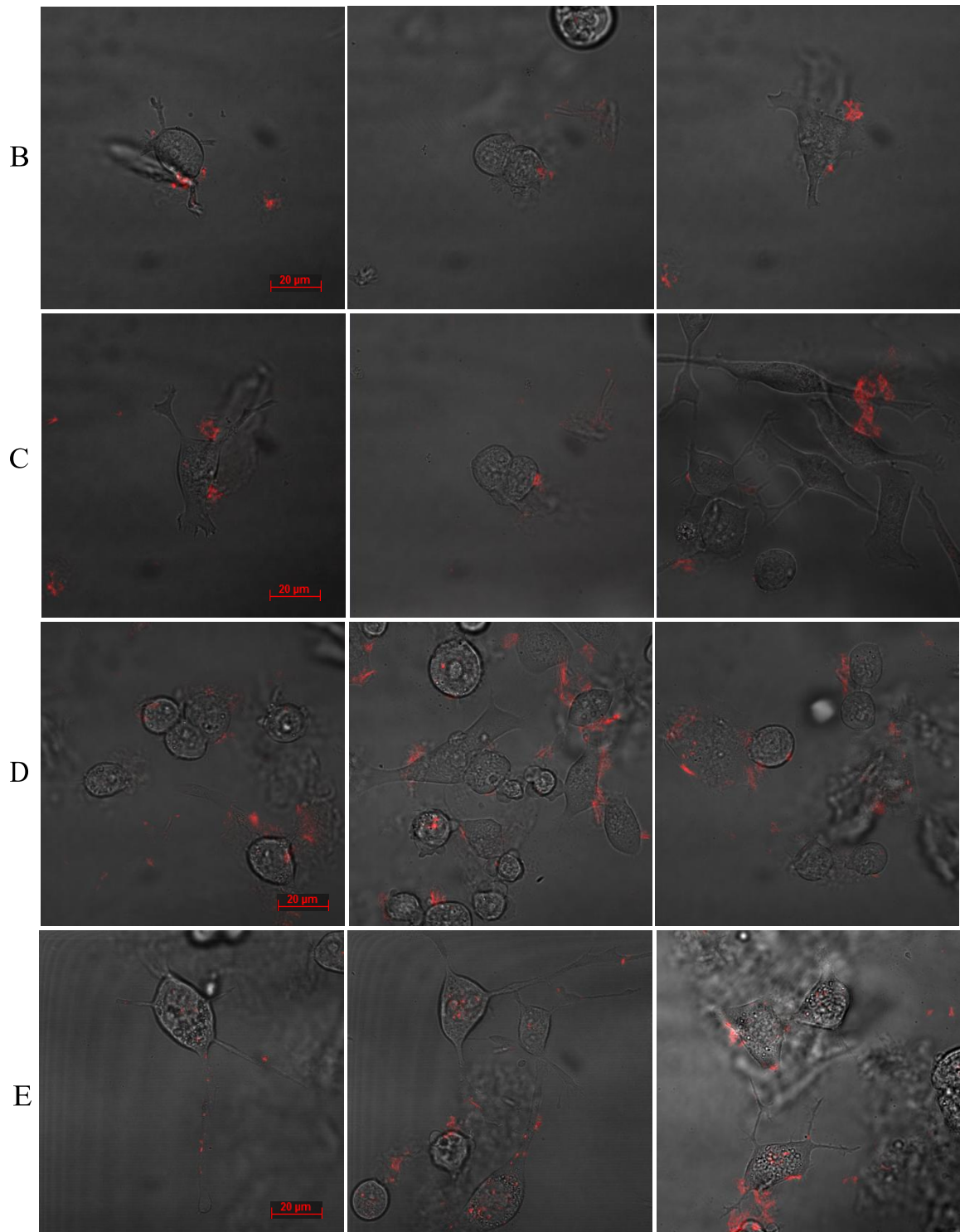


Figura 3. 20 – Fibrilhas da PrP₂₃₋₂₃₁ marcadas com o fluoróforo *Alexa 568* presentes em células N2a, após 72 h de cultura. **A** – Imagem de luz transmitida (DIC) onde se vê a membrana celular; fibrilhas marcadas com *Alexa 568* (**B**) e o núcleo das células corado com *Hoechst 33342* (**C**) e as imagens foram sobrepostas (**D**). Barra de escala, 50 µm.

Na figura 3.20 D pode ver-se que as fibrilhas coradas com *Alexa 568* se encontram muito provavelmente dentro das células neuronais. A possibilidade das fibrilhas estarem apenas associadas à membrana celular é muito menos provável como discutido em baixo.

Numa tentativa de esclarecer a interação das fibrilhas com as células, nomeadamente se estas apenas se acoplavam à superfície membranar ou se eram internalizadas pela célula foram também tiradas fotografias no microscópio confocal *Zeiss LSM 710*, durante 3 dias (figura 3.21).





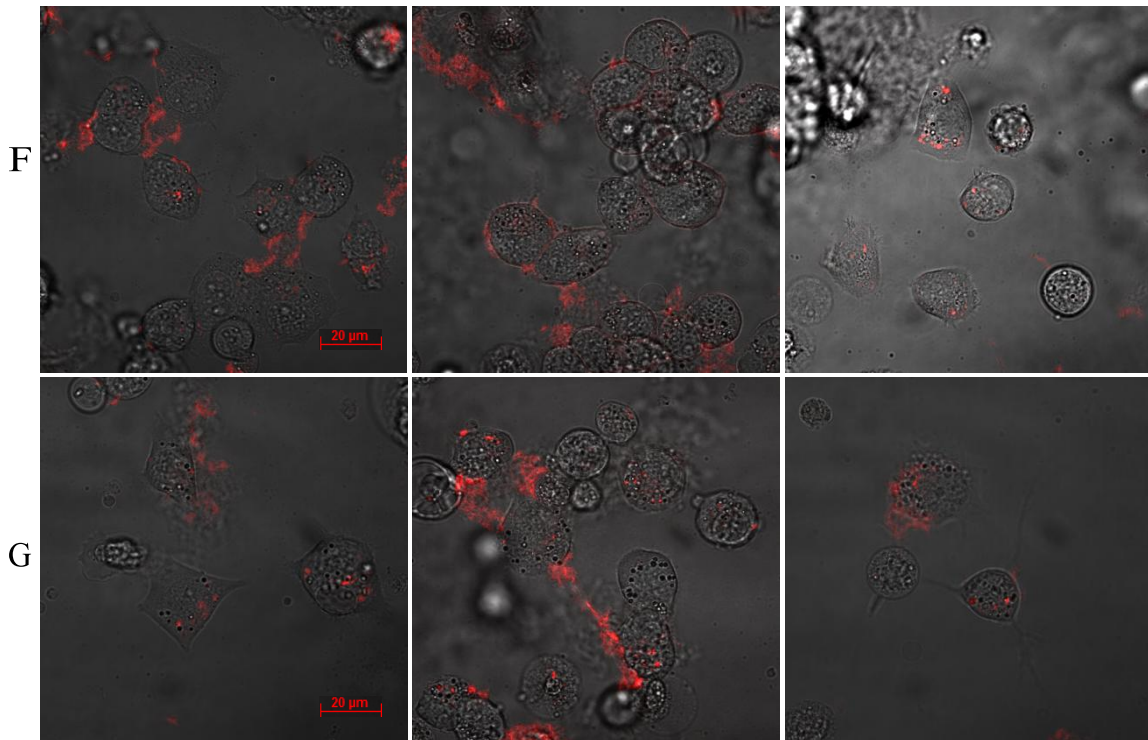


Figura 3. 21 – Fibrilhas da PrP₂₃₋₂₃₁ marcadas com o fluoróforo *Alexa 568* presentes em células N2a após 30 minutos de cultura (A), após 1h (B), 2h (C), 4h (D), 1 dia (E), 2 dias (F) e após 3 dias em cultura (G). Para cada tempo, exceto para a meia hora, são apresentados 3 planos diferentes. Barra de escala, 20 μ m.

Passada meia hora de incubação, aparentemente, as fibrilhas já estão em contacto com as células, como se pode ver nas ampliações da figura 3.21 A. Esta observação é importante, pois no ensaio da reação enzimática (capítulo 3.5) viu-se que, aparentemente, a viabilidade celular diminuía apenas com 3 horas de exposição às fibrilhas (tempo de duração da reação enzimática com o CCK-8). Esta menor viabilidade ao fim de 3 horas deverá então estar relacionada com a penetração das fibrilhas nas células neuronais, ou mesmo apenas com o seu acoplamento à membrana celular. Porém, o mecanismo pelo qual se dá a morte celular na presença de agregados proteicos ainda não é claro, pelo que são necessários mais estudos sobre este assunto.

Na figura 3.21 B, após 1 hora de cultura, as fibrilhas já começam a penetrar na membrana celular e após 4 horas de cultura (figura D) vê-se claramente que já se encontram fibrilhas dentro das células. Ao 2º e 3º dia de cultura (figura F e G) existe uma grande quantidade de fibrilhas junto às células, assim como no seu interior. Isto sugere que as fibrilhas quando são associadas à membrana celular são rapidamente captadas pelas células e distribuídas. Esta facilidade na internalização e tráfego das fibrilhas nas células deve estar envolvida na propagação celular da infeção.

Através das fotografias tiradas no microscópio confocal foi também possível observar a deslocação das fibrilhas no interior das projeções dendríticas da célula neuronal (figura 3.22). Estudos feitos neste âmbito referem que é através das dendrites que as fibrilhas se propagam de célula para célula (Magalhães *et al.*, 2005).

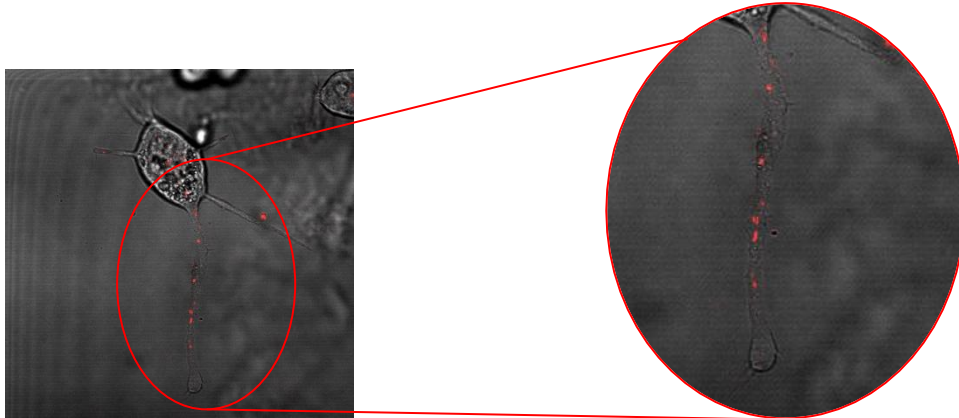


Figura 3. 22 – Fibrilhas da PrP₂₃₋₂₃₁ na dendrite da célula neuronal.

A derivatização da proteína priónica com o fluoróforo *Alexa 568* permitiu então verificar que as fibrilhas se ligam à membrana celular muito rapidamente. Após essa ligação, a internalização das fibrilhas nas células também ocorre num curto espaço de tempo. A figura 3.22 permitiu ver que uma das formas de tráfico das fibrilhas é através das dendrites, explicando o carácter progressivo das doenças neurodegenerativas. Contudo, o mecanismo de internalização das fibrilhas nas células ainda não é claro, pelo que mais estudos devem ser realizados.

4. CONCLUSÕES GERAIS

Um dos objetivos deste trabalho foi a análise do processo de fibrilhação na presença da arginina e do glicerol, em diferentes concentrações. Foram estudadas duas versões da proteína priónica, PrP₂₃₋₂₃₁ e PrP_{Δ23-128}, com o objetivo de se compreender se o domínio não estruturado da PrP (região N-terminal) apresenta alguma função na estabilização da proteína. Concluiu-se de facto que estes dois osmólitos, em concentrações mais elevadas, atrasam a agregação da PrP₂₃₋₂₃₁, numa fase inicial. Contudo, em fases posteriores as fibrilhas acabam por se formar igualmente mesmo na presença de osmólitos. Provavelmente para agregados mais pequenos (fase inicial da fibrilhação) a elevada superfície de exposição aos osmólitos permite que estes exerçam o seu efeito mas quando estes agregados começam a crescer já não é possível impedir esse processo.

Relativamente à versão curta da PrP (Δ23-128) apenas ocorreu um atraso na fibrilhação na presença de arginina 0,3 M (concentração mais elevada). A razão para mais nenhum dos osmólitos apresentar um efeito de supressão na agregação provavelmente deve-se ao facto da proteína estar mais destabilizada, devido à ausência do N-terminal da proteína. Para além disso, no final do processo de fibrilhação da versão curta da PrP, a quantidade de fibrilhas, na generalidade, é bastante superior à observada para a PrP₂₃₋₂₃₁. Esta observação indica que o domínio não estruturado estabiliza a proteína, talvez através do impedimento estereoquímico que esta região causa na proteína, impedindo assim a ocorrência de interações intermoleculares e conduzindo a uma agregação proteica mais lenta.

Outro objetivo que se desejava alcançar com o desenvolvimento deste trabalho era compreender se a inibição da formação de fibrilhas na presença destes compostos estava relacionada com os níveis de toxicidade destas espécies.

Tanto na metodologia de coloração nuclear com *Hoechst* 33342 como no ensaio de viabilidade celular através de reações enzimáticas, não se verificaram diferenças significativas nos níveis de toxicidade das fibrilhas desenvolvidas com ou sem osmólitos, exceto para as fibrilhas da PrP_{Δ23-128} formadas em arginina a 0,3 M, onde se observaram sempre percentagem diferentes das restantes condições, tanto no ensaio do CCK-8 como no do *Hoechst*. Isto indica que a arginina em concentrações mais elevadas tem algum efeito na toxicidade da proteína priónica, principalmente na ausência do N-terminal. São

assim necessários estudos mais rigorosos sobre o mecanismo de interação deste osmólito com a proteína priónica.

Comparando as duas versões da PrP estudadas observou-se que a percentagem de células viáveis na presença de fibrilhas da PrP_{Δ23-128} foi inferior à observada para as fibrilhas da PrP₂₃₋₂₃₁. Aparentemente as fibrilhas da PrP_{Δ23-128} são mais tóxicas para as células do que a versão longa da proteína. Contudo, dado que os ensaios destas duas versões não foram realizados em paralelo e que se verificou uma quantidade superior de fibrilhas na versão curta, seria fundamental que futuramente se realizasse o estudo destas duas versões (assim como de mais versões da PrP) em paralelo e assim utilizar uma quantidade de fibrilhas idênticas para os dois ensaios, permitindo confirmar com mais exatidão se realmente a versão curta da PrP é mais tóxica do que a versão longa. Para trabalhos futuros poderia ser muito vantajoso o estudo das estruturas fibrilares de cada versão da PrP através de técnicas como TEM (*transmission electron microscopy*) ou AFM (*atomic force microscopy*). Poderia analisar-se a topologia e tamanho das fibrilhas com uma resolução elevada, para verificar se os osmólitos modificam ou não a sua estrutura e poderia relacionar-se de uma forma mais rigorosa o efeito dos osmólitos com os níveis de toxicidade das fibrilhas de cada versão da proteína.

A compreensão das interações moleculares das fibrilhas da PrP com as células neuronais pode proporcionar uma base para a conceção de diagnósticos e estratégias terapêuticas para as doenças amiloidogénicas. Neste trabalho verificou-se que inicialmente as fibrilhas se ligam à membrana celular, sendo que posteriormente são internalizadas nas células. Foram também visualizadas fibrilhas nas dendrites das células neuronais, no que poderá constituir um mecanismo de propagação das fibrilhas de célula para célula. Contudo, é necessário compreender o mecanismo de internalização das fibrilhas nas células, para ser possível desenvolver estratégias capazes de impedir a morte celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ✚ Alibolandi, M. & Mirzahoseini, H. (2011), *Chemical Assistance in Refolding of Bacterial Inclusion Bodies*, Hindawi Publishing Corporation *Biochemistry Research International*, **2011**: 1-6;
- ✚ Arakawa, T., Ejima, D., Tsumoto, K., Obeyama, N., Tanaka, Y., Kita, Y., Timasheff, S. (2007), *Suppression of protein interactions by arginine: A proposed mechanism of the arginine effects*, *Biophysical Chemistry*, **127**: 1-8;
- ✚ Baskakov, I.V. & Breydo, L. (2007), *Converting the prion protein: What makes the protein infectious*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, **1772**: 692-703;
- ✚ Biancalana, M. & Koide, S. (2010), *Molecular Mechanism of Thioflavin-T Binding to Amyloid Fibrils*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, **1804**: 1405-1412;
- ✚ Bocharova, O.V., Makarava, N., Breydo, L., Anderson, M., Salnikov, V.V., Baskakov, I.V. (2006), *Annealing Prion Protein Amyloid Fibrils at High Temperature Results in Extension of a Proteinase K-resistant Core*, *The Journal of Biological Chemistry*, **281**: 2372-2379;
- ✚ Chiti, F. & Dobson, C.M. (2006), *Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease*, *Annual Review of Biochemistry*, **75**: 333-366;
- ✚ Cordeiro, Y., Kraineva, J., Gomes, M.P.B., Lopes, M.H., Martins, V.R., Lima, L.M.T.R., Foguel, D., Winter, R., Silva, J.L. (2005), *The Amino-Terminal PrP Domain Is Crucial to Modulate Prion Misfolding and Aggregation*, *Biophysical Journal*, **89**: 2667-2676;
- ✚ Corsaro, A., Thellung, S., Russo, C., Villa, V., Arena, S., D'Adamo, M.C., Paludi, D., Rossi Principe, D., Damonte, G., Benatti, U., Aceto, A., Tagliavini, F., Schettini, G., Florio, T. (2002), *Expression in E. coli and purification of recombinant fragments of wild type and mutant human prion protein*, *Neurochemistry International*, **41**: 55-63;
- ✚ Das, U., Hariprasad, G., Ethayathulla, A.S., Manral, P., Das, T.K., Pasha, S., Mann, A., Ganguli, M., Verma, A.K., Bhat, R., Chandrayan, S.K., Ahmed, S., Sharma, S., Kaur, P., Singh, T.P., Srinivasan, A. (2007), *Inhibition of Protein Aggregation: Supramolecular Assemblies of Arginine Hold the Key*, *PLoS ONE*, **2**: e1176;

- ✚ Ferreira, S.T., Vieira, M.N.N., Felice, F.G. (2007) *Soluble Protein Oligomers as Emerging Toxins in Alzheimer's and Other Amyloid Diseases*, *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, **59**: 332-345;
- ✚ Gerami, S.M.N., Farajnia, S., Mahboudi, F. (2011), *Co-solute assistance in refolding of recombinant proteins*, *African Journal of Biotechnology*, **10**: 10811-10816;
- ✚ Guest, W.C., Plotkin, S.S., Cashman, N.R. (2011), *Toward a mechanism of prion misfolding and structural models of PrPSc: Current knowledge and future directions*, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Parte A*, **74**: 154–160;
- ✚ Hamada, H., Arakawa, T., Shiraki, K. (2009), *Effect of Additives on Protein Aggregation*, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **10**: 400-407;
- ✚ Hatters, D.M. & Griffin, M.D.W. (2011), *Diagnostics for Amyloid Fibril Formation: Where to Begin?*, *Methods in molecular biology*, **752**: 121-136;
- ✚ Idicula-Thomas, S. & Balaji, P.V. (2007), *Protein aggregation: A perspective from amyloid and inclusion-body formation*, *Current Science*, **92**: 758-767;
- ✚ Ignatova, Z. & Gierasch, L.M. (2006), *Inhibition of protein aggregation in vitro and in vivo by a natural osmoprotectant*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**: 13357-13361;
- ✚ Infante, Nídia Cristina Lopes Estrela (2011), *The effect of sucrose on protein stability and fibrillation of Prion and S6 Protein*, dissertação (Doutorada em Biologia), Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade do Algarve;
- ✚ Jain, S. & Udgaonkar, J.B. (2011), *Prion protein aggregation*, *Current Science*, **101**: 1311-1327;
- ✚ Jamal, S., Poddar, N.K., Singh, L.R., Dar, T.A., Rishi, V., Ahmad, F. (2009), *Relationship between functional activity and protein stability in the presence of all classes of stabilizing osmolytes*, *FEBS Journal*, **276**: 6024-6032;
- ✚ Lansbury, P.T. Jr & Caughey, B. (1996), *The double life of the prion protein*, *Current Biology*, **6**: 914-916;
- ✚ Lindahl, M., Svensson, L.A., Liljas, A., Sedelnikova, S.E., Eliseikina, I.A., Fomenkova, N.P., Nevskaya, N., Nikonov, S.V., Garber, M.B., Muranova, T.A. (1994), *Crystal structure of the ribosomal protein S6 from *Thermus thermophilus**, *The EMBO Journal*, **13**: 1249-1254;

- ✚ Linden, R., Martins, V.R., Prado, M.A.M., Cammarota, M., Izquierdo, I., Brentani, R.R. (2008), *Physiology of the Prion Protein*, *Physiological Reviews*, **88**: 673-728;
- ✚ Liu, K., Wang, H., Chen, C., Wang S.S. (2010), *L-Arginine reduces thioflavin T fluorescence but not fibrillation of bovine serum albumin*, *Amino Acids*, **39**: 821-829;
- ✚ Macchi, F., Eisenkolb, M., Kiefer, H., Otzen D.E. (2012), *The Effect of Osmolytes on Protein Fibrillation*, *International Journal of Molecular Science*, **13**: 3801-3819;
- ✚ MacPhee, C.E. & Woolfson, D.N. (2004), *Engineered and designed peptide-based fibrous biomaterials*, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, **8**: 141-149;
- ✚ Magalhães, A.C., Baron, G.S., Lee, K.S., Steele-Mortimer, O., Dorwars, D., Prado, M.A.M., Caughey, B. (2005), *Uptake and Neuritic Transport of Scrapie Prion Protein Coincidence with Infection of Neuronal Cells*, *The Journal of Neuroscience*, **25**: 5207-5216;
- ✚ Martins, S. M., Chapeaurouge, A., Ferreira, S. T. (2003) *Folding Intermediates of the Prion Protein Stabilized by Hydrostatic Pressure and Low Temperature*, Outubro 2003, *The Journal of Biological Chemistry*, **278**: 50449-50455;
- ✚ Mishra, R., Seckler, R., Bhat, R. (2005), *Efficient Refolding of Aggregation-prone Citrate Synthase by Polyol Osmolytes: How well are protein folding and stability aspects coupled?*, *The Journal of Biological Chemistry*, **280**: 15553-15560;
- ✚ Muñoz, V. (2008) *Protein Folding, Misfolding and Aggregations: Classical Themes and Novel Approaches*, RSC Publishing, cap. 10;
- ✚ Nunnally, B.K., Krull, I.S. (2004) *Prions and Mad Cow Disease*, Taylor & Francis, 2003, capítulos 1, 6 e 11;
- ✚ Olzscha, H., Schermann, S.M., Woerner, A.C., Pinkert, S., Hecht, M.H., Tartaglia G.G., Vendruscolo, M., Hayer-Hartl, M., Hartl, F.U., Vabulas, R.M. (2011), *Amyloid-like Aggregates Sequester Numerous Metastable Proteins with Essential Cellular Functions*, *Cell*, **144**: 67-78;

- ✚ Otzen, D.E., Nesgaard, L.W., Andersen, K.K, Hansen, J.H., Christiansen, G., Doe, H., Sehgal, P. (2008), *Aggregation of S6 in a quasi-native state by submicellar SDS*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, **1784**: 400-414;
- ✚ Prusiner, S.B. (1997), *Prion diseases and the BSE crisis*, *Science*, **278**: 245–251.
- ✚ Prusiner, S.B, Scott, M.R., DeArmond, S.J, Cohen, F.E. (1998), *Prion Protein Biology*, *Cell*, **93**: 337-348;
- ✚ Quintas, A., Freire, A.P., Halpern, M.J. (2008), *Bioquímica: Organização Molecular da Vida*, LIDEL, cap. 10;
- ✚ Radford, S.E & Weissman, J.S. (2012), *Special Issue: The Molecular and Cellular Mechanisms of Amyloidosis*, *Journal of Molecular Biology*, **421**:139-141;
- ✚ Riesner, D. (2003), *Biochemistry and structure of PrP^C and PrP^{Sc}*, *British Medical Bulletin*, **66**: 21–33;
- ✚ Ross, C.A. & Poirier, M.A. (2004), *Protein aggregation and neurodegenerative disease*, *Nature medicine*, **10**: S10-S17;
- ✚ Ryou, C. (2007) *Prions and Prion Diseases: Fundamentals and Mechanistic Details*, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **17**: 1059-1070;
- ✚ Sanghera, N., Wall, M., Vénien-Bryan, C., Pinheiro, T.J.T. (2008), *Globular and pre-fibrillar prion aggregates are toxic to neuronal cells and perturb their electrophysiology*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, **1784**: 873-881;
- ✚ Simoneau, S., Rezaei, H., Salès, N., Kaiser-Schulz, G., Lefebvre-Roque, M., Vidal, C., Fournier, J.G., Comte, J., Wopfner, F., Grosclaude, J., Schätzl, H., Lasmézas, C.I. (2007), *In Vitro and In Vivo Neurotoxicity of Prion Protein Oligomers*, *PLoS Pathogens*, **3**: e125;
- ✚ Singh, L.R., Poddar, N.K., Dar, T.A., Kumar, R., Ahmad, F. (2011), *Protein and DNA destabilization by osmolytes: The other side of the coin*, *Life Science*, **88**: 117-125;
- ✚ Sulatskaya, A.I., Kuznetsova, I.M., Turoverov, K.K. (2011), *Interaction of Thioflavin T with Amyloid Fibrils: Stoichiometry and Affinity of Dye Binding, Absorption Spectra of Bound Dye*, *The Journal of Physical Chemistry B*, **112**: 11519-11524;
- ✚ Tatzelt, J., Prusiner, S.B., Welch, W.J. (1996), *Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein*, *The EMBO Journal*, **15**: 6363-6373;

- ✚ Uversky, V.N., Fernandez, A., Fink, A.L., *Structural and Conformational Prerequisites of Amyloidogenesis*. In: Uversky, V.N., Fink, A.L. (2006) **Protein Misfolding, Aggregation and Conformational Diseases**. Parte A: *Protein Aggregation and Conformational Diseases*, Springer, vol. 4, cap. 1;
- ✚ Vagenende, V., Yap, M.G., Trout, B.L. (2009) *Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol*, *Biochemistry*, **48**: 11084-11096;
- ✚ Zahn, R., von Schroetter, C., Wüthrich, K. (1997), *Human prion proteins expressed in Escherichia coli and purified by high-affinity column refolding*, *FEBS Letters*, **417**: 400-404;

ANEXOS

Os anexos serão divididos por capítulos:

Anexo 1 – anexos relativos à introdução

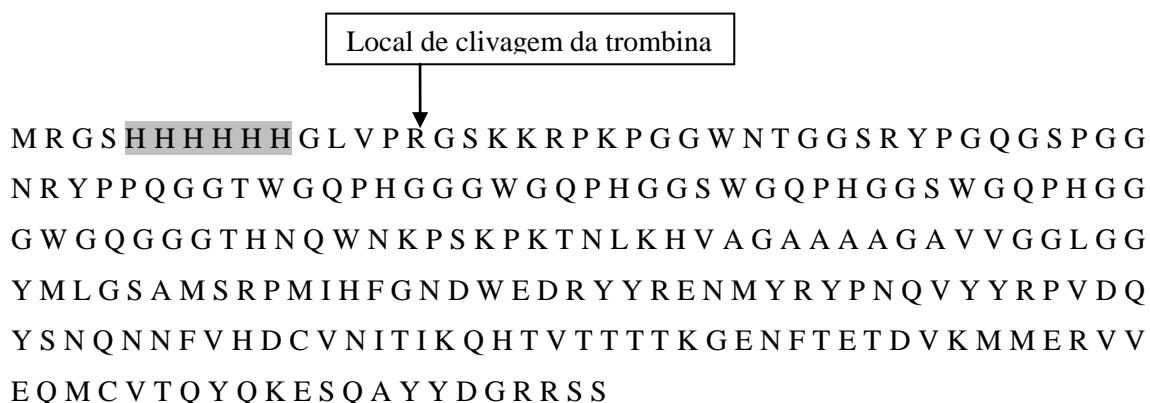
Anexo 2 – anexos relativos à metodologia

Anexo 3 – anexos relativos aos resultados e discussão

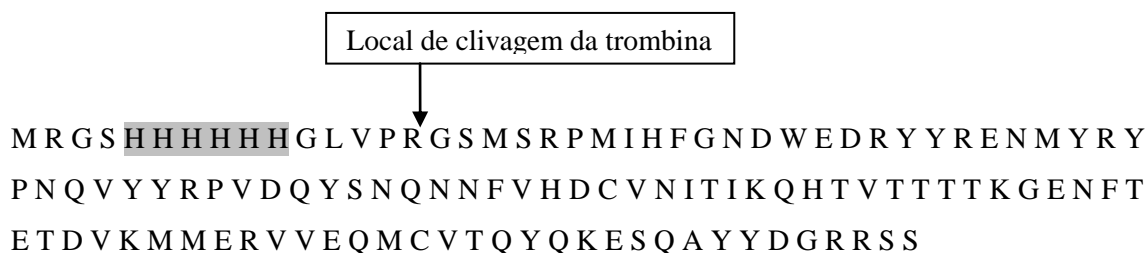
ANEXO 1

Anexo 1.1 – Sequência da proteína priônica de ratinho

PrP₂₃₋₂₃₁ – a sequência seguinte apresenta a cauda de histidinas (realçado a cinzento) e o local de clivagem da trombina que ocorre entre a arginina e a glicina. Após o corte com a trombina, a sequência apresenta 211 aminoácidos, peso molecular de 23163 Da, coeficiente de extinção molar (ϵ) de $63495 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e pI (ponto isoelétrico) teórico de 9,56.



PrP_{A23-128} – a sequência seguinte apresenta a cauda de histidinas (realçado a cinzento) e o local de clivagem da trombina que ocorre entre a arginina e a glicina. Após o corte com a trombina, a sequência apresenta 101 aminoácidos, peso molecular de 12232 Da, coeficiente de extinção molar (ϵ) de $20525 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e pI (ponto isoelétrico) teórico de 6,32.



Estes dados foram encontrados no ProtoParam em www.expasy.org.

ANEXO 2

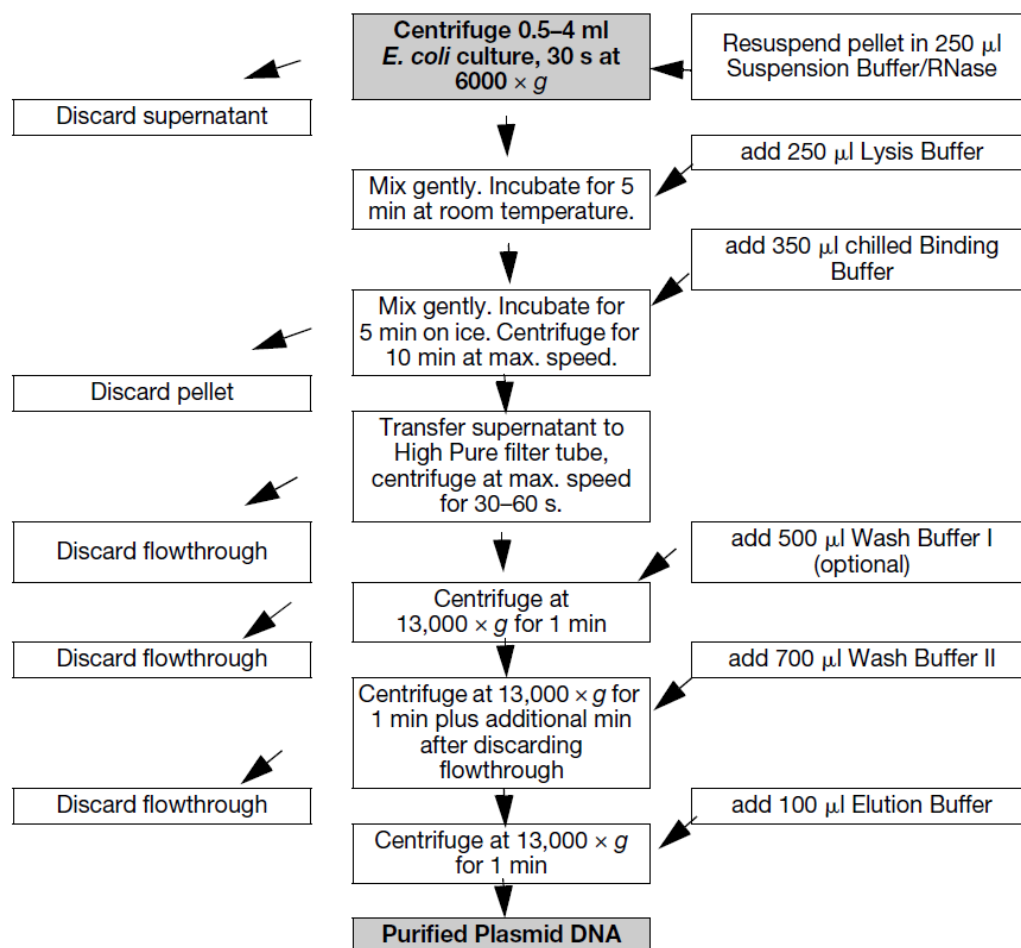
Anexo 2.1 – Células competentes e DNA plasmídico

A. Preparação de células competentes

As células são colocadas em 5 ml de meio LB (40 g/L) a crescer *overnight*, a 37°C. Posteriormente são inoculados 100 µl da solução anterior, em 50 ml de meio LB, deixando a crescer até uma D.O._{600 nm} de 0,5. A solução é colocada em gelo durante 3 a 5 minutos, sob agitação constante; é centrifugada durante 8 minutos a 6000 rpm, 4°C, numa centrífuga 5810R (*eppendorf*); o sobrenadante é descartado e o *pellet* é ressuscitado em 10 ml de 0,1M CaCl₂ e colocado em gelo, de 5 a 10 minutos. É novamente centrifugado e o *pellet* ressuscitado em 10 ml de 0,1M CaCl₂, repousando em gelo durante 20 minutos. Após nova centrifugação, o *pellet* é ressuscitado em 1800 µl de 0,1M CaCl₂ e 300 µl de glicerol 80%. São feitas alíquotas de 100 µl e armazenadas a -80°C.

B. Extração do DNA plasmídico

A extracção de DNA plasmídeo foi feita recorrendo a um *high pure plasmid isolation Kit* (version Dez 2004) da Roche®. A metodologia seguida está descrita no diagrama que se segue:



Anexo 2.2 – Meios e soluções

A. Composição do meio para a produção da PrP

A composição do pré-inóculo e inóculo é a seguinte:

- *Luria Broth medium* 20 g/L;
- 4mM KH_2PO_4 ;
- 36mM K_2HPO_4 ;
- 4mM glucose.

A composição do meio utilizado para as placas de Petri é *Luria Broth medium* 20 g/L e Agar 15 g/L.

A esterilização do meio e materiais foi realizada a 121°C durante 20 minutos, numa autoclave da Raypa.

Após esterilização o meio é suplementado com 100 µg/ml de ampicilina.

B. Soluções utilizadas na produção

Solução de IPTG 1M: é pesado e solubilizado, sendo posteriormente esterilizado utilizando um filtro de 0,22 µm, à chama. São feitas alíquotas de 1 ml e armazenadas a -20°C.

A preparação da solução de ampicilina 100 mg/ml é idêntica à preparação descrita anteriormente.

C. Tampões cromatográficos

- Tampão fosfato de sódio 0,5 M, pH 7.0 (solução *stock*): preparada a partir da base fosfato dissódico (Na_2HPO_4) e do ácido fosfato monossódico (NaH_2PO_4), os quais foram pesados e solubilizados em água destilada, perfazendo um volume final de 500 e 100 ml, respetivamente. Foram misturados até se obter o pH desejado. Armazenamento a 4°C.
- Tampão B – constituído por tampão fosfato de sódio 0,1 M, a pH 7.0, $V_{\text{final}} = 1000$ ml;
- Tampão G – constituído por tampão fosfato de sódio 0,1 M e Ureia 8 M, a pH 7.0, $V_{\text{final}} = 1000$ ml;

- Tampão C – constituído por tampão fosfato de sódio 0,1 M e imidazol 1 M, a pH 7.0, $V_{\text{final}} = 500$ ml.

Todas as soluções utilizadas no processo de purificação foram previamente filtradas com um filtro de 0,4 μm .

D. Soluções utilizadas no SDS-PAGE

- Tampão de corrida 10x concentrado – constituído por 30g de TRIS, 144g de Glicina, 10g de SDS e perfaz-se com água destilada para um volume final de 1 L.
- *Protein loading dye with Orange G* (4x) – é constituído por 0,02 g Orange G, 0,8 g de SDS (cf = 2%), 4 ml de glicerol (cf = 10%), 2,5 ml Tris-HCl 1M pH 6.8 (cf = 62,5 mM) e 3,5 ml água destilada, para um volume final de 10 ml. São feitas alíquotas de 900 μl e armazenadas a -20 °C. Antes de usar esta solução, adicionar 100 μl de b-mercaptoetanol (a cada alíquota);
- Solução azul de *Coomassie* – constituída por 2g de azul de *Coomassie* R, 250 ml de água destilada, 500 ml de etanol, 75 ml de ácido acético e perfaz-se com água destilada para um volume final de 1 L.

E. Soluções utilizadas na fibrilhação

As soluções necessárias para o processo de fibrilhação são as seguintes:

- Tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5.5 (solução *stock*) – sendo este um tampão ácido-base, é necessário ter uma base (acetato de sódio trihidratado, CH_3COONa) e um ácido (ácido acético, 100%, CH_3COOH);
- 50 ml de solução acetato de sódio 20 mM – constituída por tampão acetato sódio 20 mM + ureia 3M + NaCl 150 mM, pH 5.5;
- 50 ml de solução glicerol 10% – constituída por tampão acetato sódio 20 mM + ureia 3M + NaCl 150 mM + glicerol 1,1 M, pH 5.5;
- 50 ml de solução glicerol 20% – constituída por tampão acetato sódio 20 mM + ureia 3M + NaCl 150 mM + glicerol 2,2 M, pH 5.5;
- 50 ml de solução arginina 250 mM – constituída por tampão acetato sódio 20 mM + ureia 3M + NaCl 150 mM + Arginina 0,25 M, pH 5.5;

- 50 ml de solução arginina 400 mM – constituída por tampão acetato sódio 20 mM + ureia 3M + NaCl 150 mM + Arginina 0,3 M, pH 5.5;
- 50 ml de solução cloreto de guanidina 6M (GdnHCl) – constituída por tampão acetato de sódio 20 mM + GdnHCl 6M, pH 5.5;
- 10 ml de ThT 25 mM (solução *stock*) – a tioflavina T é sensível à luz, logo tem que ser armazenada num frasco escuro, para não perder intensidade;
- 100 ml de solução de ThT 25 μ M – constituída por tampão acetato de sódio 5 mM + ThT 25 μ M.

Anexo 2.3 – Protocolo de lavagem da matriz de níquel

O protocolo para tratamento da matriz entre utilizações, assim como o procedimento de regeneração caso a matriz apresente uma cor acinzentada em vez de azul-esverdeado são facultados pela QIAGEN e estão descritos na figura seguinte.

Handling

Ni-NTA matrices are stable under a wide variety of conditions and need not be refrigerated, except to inhibit growth of microorganisms for long-term storage. After use they should be washed for 30 minutes with 0.5M NaOH. Ni-NTA matrices should be stored in 30% ethanol to inhibit microbial growth. The matrix can be stored for up to one week in any of the denaturing buffers.

Reuse of Ni-NTA Resin

The reuse of Ni-NTA resin depends on the nature of the sample and should only be performed with identical recombinant proteins. Based on the experience of Hoffmann-La Roche Ltd. (Basel, Switzerland), who have purified more than 100 different proteins on Ni-NTA resin, we recommend a maximum of 5 runs per column.

If the Ni-NTA Agarose changes from light blue to brownish-gray, the following regeneration procedure is recommended.

Procedure:

1. Wash the column with 2 volumes of Regeneration Buffer (6 M GuHCl, 0.2 M acetic acid).
2. Wash the column with 5 volumes of H₂O.
3. Wash the column with 3 volumes of 2% SDS.
4. Wash the column with 1 volume of 25% EtOH.
5. Wash the column with 1 volume of 50% EtOH.
6. Wash the column with 1 volume of 75% EtOH.
7. Wash the column with 5 volumes of 100% EtOH.
8. Wash the column with 1 volume of 75% EtOH.
9. Wash the column with 1 volume of 50% EtOH.
10. Wash the column with 1 volume of 25% EtOH.
11. Wash the column with 1 volume of H₂O.
12. Wash the column with 5 volumes of 100 mM EDTA, pH 8.0.
13. Wash the column with H₂O.
14. Recharge the column with 2 volumes of 100 mM NiSO₄.
15. Wash the column with 2 volumes of H₂O.
16. Wash the column with 2 volumes of Regeneration Buffer.
17. Equilibrate with 2 volumes of a suitable buffer (e.g., Buffer A or B).

Anexo 2.4 – Equipamentos e Reagentes

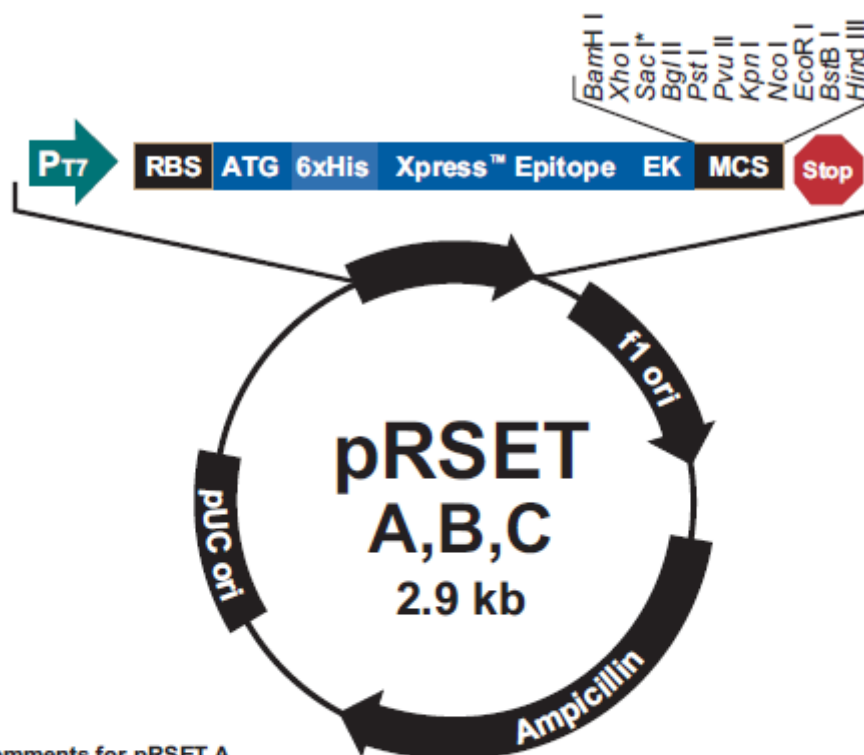
A. Tabela de reagentes

Reagentes	Fórmula Química	Peso Molecular (g/mol)	Fornecedor
Acetato de sódio trihidratado	CH ₃ COONa.3H ₂ O	136,08	Prolabo TM
Ácido acético	CH ₃ COOH	60,05	Prolabo TM
Ácido Clorídrico	HCl	36,46	Prolabo TM
Acrilamida	C ₃ H ₅ NO	71,07	Sigma [®]
Agar	-	-	NZY tech TM
Ampicilina	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	349,41	NZYtech TM
APS	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	228,18	Aplichem
Arginina	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174,19	Sigma Aldrich [®]
Azul de Bromofenol	C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S	669,96	Sigma [®]
Bicarbonato de sódio	NaHCO ₃	84,01	Riedel de Häen
Cloreto de cálcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	147,02	Prolabo TM
Cloreto de guanidina	CH ₅ N ₃	59,07	Ultra-Pure TM
Cloreto de sódio	NaCl	58,44	Merck [®]
<i>Coomassie R</i>	C ₄₅ H ₄₄ N ₃ NaO ₇ S ₂	825,97	Sigma [®]
DMSO	C ₂ H ₆ OS	78,13	Sigma [®]
EDTA	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	292,20	Prolabo TM
Etanol	C ₂ H ₆ O	46,06	Aga
FBS	-	-	Sigma [®]
Fosfato dipotássico	K ₂ HPO ₄	174,17	Merck [®]
Fosfato disódico	Na ₂ HPO ₄	141,96	Merck [®]
Fosfato monopotássico	KH ₂ PO ₄	136,09	Prolabo TM
Fosfato monossódico	NaH ₂ PO ₄	137,99	Merck [®]
Glicerol	C ₃ H ₈ O ₃	92,08	Sigma [®]
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	75,06	Eurobio
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,16	Merck [®]
Hidróxido de sódio	NaOH	40,00	Prolabo TM
<i>Hoechst 33342</i>	-	-	GIBCO
IPTG	C ₉ H ₁₈ O ₅ S	238,30	NZY tech TM
Imidazol	C ₃ H ₄ N ₂	68,08	Merck [®]
LB	-	-	Sigma [®]
<i>Mowiol</i>	-	-	Sigma [®]
OPTI-MEM	-	-	GIBCO
p-aminobenzamidina-agarose	-	-	Sigma [®]
PBS	-	-	GIBCO
<i>Pen-Strep</i>	-	-	GIBCO
PMSF	C ₇ H ₇ FO ₂ S	174,19	Fluka
SDS	NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄	288,37	NZY tech TM
Sulfato de níquel	NiSO ₄ .7H ₂ O	280,86	Sigma [®]
Trombina	-	-	Sigma [®]
TEMED	C ₆ H ₁₆ N ₂	116,20	NZY Tech TM
Tris	C ₄ H ₁₁ NO ₃	121,12	Sigma [®]
ThT	C ₁₇ H ₁₉ ClN ₂ S	318,86	Sigma [®]
Tripsina	-	-	Sigma [®]
Ureia	(NH ₂) ₂ CO	60,07	Sigma [®]

B. Tabela de equipamentos

Equipamentos	Modelo	Marca
Autoclave	<i>AES</i>	<i>Raypa</i>
Agitador Orbital Vertical	<i>Duomax 1030</i>	<i>Heidolph</i>
<i>ÄKTA purifier</i>	<i>ÄKTA purifier</i>	<i>GE HealthCare</i>
Centrífuga	<i>J14-MC</i>	<i>Beckman</i>
Centrífuga	<i>5810R</i>	<i>Eppendorf®</i>
Espectrofotômetro	<i>Shimadzu UV-1700</i>	<i>Pharma-Spec</i>
Estufa	<i>EN-400</i>	<i>Nüve</i>
Incubador CO2	<i>Heracell 150</i>	<i>Heraeus</i>
Liofilizador	<i>Modulyo D-230</i>	<i>Thermo Scientific</i>
Microcentrífuga digital	<i>2416</i>	<i>VWR™</i>
Microscópio	<i>Axioimager Z2</i>	<i>Zeiss</i>
Microscópio confocal	<i>LSM 710</i>	<i>Zeiss</i>
Orbital	<i>Agitorb 200IC</i>	<i>Aralab</i>
Placa de aquecimento	<i>Biosan TS-100</i>	<i>Grant</i>
Sistema de documentação de géis	<i>Alpha Imager</i>	<i>ProteinSimple</i>
Sonicador	<i>VCX 130</i>	<i>Vibra cell™</i>

Anexo 2.5 – Mapa e *multiple cloning site* do vetor de expressão pRSET-A



Comments for pRSET A
2897 nucleotides

*Version C does not contain Sac I

T7 promoter: bases 20-39
 6xHis tag: bases 112-129
 T7 gene 10 leader: bases 133-162
 Xpress™ epitope: bases 169-192
 Multiple cloning site: bases 202-248
 T7 reverse priming site: bases 295-314
 T7 transcription terminator: bases 256-385
 f1 origin: bases 456-911
bla promoter: bases 943-1047
 Ampicillin (*bla*) resistance gene (ORF): bases 1042-1902
 pUC origin: bases 2047-2720 (C)

pRSET A Multiple Cloning Site

21 T7 promoter
 AATACGACTC ACTATAGGGA GACCACAACG GTTCCCTCT AGAAATAATT TTGTTTAACT TTAAGAAGGA RBS

91 Polyhistidine (6xHis) region
 GATATACAT **ATG** CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT
Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr

148 T7 gene 10 leader Xpress™ Epitope BamH I
 GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT C GA TGG GGA
 Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp Arg Trp Gly
EK recognition site E K cleavage site

205 Xho I Sac I Bgl II Pst I Pvu II Kpn I Nco I EcoR I BstB I Hind III
TCC GAG CTC GAG ATC TGC AGC TGG TAC CAT GGA ATT CGA AGC TTG ATC CGG CTG CTA
 Ser Glu Leu Glu Ile Cys Ser Trp Tyr His Gly ile Arg Ser Leu Ile Arg Leu Leu

262 T7 reverse priming site
 ACA AAG CCC GAA AGG AAG CTG AGT TGG CTG CTG CCA CCG CTG AGC AAT AAC TAG CAT
 Thr Lys Pro Glu Arg Lys Leu Ser Trp Leu Leu Pro Pro Leu Ser Asn Asn *** His

ANEXO 3

Anexo 3.2 – Cromatograma do processo de purificação da PrP₂₃₋₂₃₁