



**Pedro Miguel Francisco Fernandes**

Licenciatura

**Aspectos moleculares da  
neurodegeneração na Esclerose Lateral  
Amiotrófica**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Doutor Cláudio Gomes, ITQB-UNL  
Co-orientador: Doutora Sónia Leal, ITQB-UNL

Júri:

Presidente: Doutora Isabel Maria Godinho de Sá Nogueira  
Arguente: Doutora Ana Isabel Abrantes Coutinho  
Vogal: Doutor Cláudio Emanuel Moreira Gomes



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2011

LOMBADA



Aspectos moleculares da neurodegeneração na Esclerose Lateral Amiotrófica  
Pedro Fernandes

2011



**Pedro Miguel Francisco Fernandes**

Licenciatura

**Aspectos moleculares da  
neurodegeneração na Esclerose Lateral  
Amiotrófica**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Doutor Cláudio Gomes, ITQB-UNL  
Co-orientador: Doutora Sónia Leal, ITQB-UNL

Júri:

Presidente: Doutora Isabel Maria Godinho de Sá Nogueira  
Arguente: Doutora Ana Isabel Abrantes Coutinho  
Vogal: Doutor Cláudio Emanuel Moreira Gomes



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2011



Aspectos moleculares da neurodegeneração na Esclerose Lateral Amiotrófica

Copyright Pedro Miguel Francisco Fernandes, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## **Agradecimentos**

Gostaria de expressar aqui, com grande prazer e satisfação, o meu agradecimento a todos aqueles que tornaram possível a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar, ao Doutor Cláudio Gomes e à Doutora Sónia Leal, orientadores da presente investigação, pelo empenho e disponibilidade demonstrados durante todo o projecto e pelo estímulo e dedicação à ciência que sempre me inculcaram.

À Sofia Carvalho, Tânia Lucas, Bárbara Henriques, Hugo Botelho e João Rodrigues, colegas do grupo *Protein Biochemistry Folding and Stability*, pelos comentários e sugestões dadas durante o desenvolvimento deste projecto e pelo apoio demonstrado ao longo da dissertação.

Aos meus pais e restante família, que tanto apoio e compreensão demonstraram durante todos os altos e baixos deste processo.

À Alice Rodrigues, por toda a ajuda, amizade e companhia.

A todos os meus amigos que me acompanharam durante este ano e, estou certo, irão acompanhar para o resto da vida.

Por fim, mas não menos importante, à Sara, pelo apoio incondicional, motivação e compreensão.

Sem eles não teria sido possível estar a escrever estas linhas.



## Sumário

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa fatal que envolve a morte selectiva dos neurónios motores superiores e inferiores, levando à atrofia muscular, paralisia e morte. Cerca de 90% dos casos de ELA são esporádicos, sem causa conhecida, mas os restantes 10% têm componente genética e são denominados casos familiares. Destes últimos, cerca de 25% são causados por mutações no gene que codifica para a Superóxido dismutase Cu-Zn (SOD1).

A estabilidade conformacional da SOD1 parece estar fortemente associada à coordenação com os iões  $Zn^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ , que leva à formação da ligação per-sulfureto intramolecular, resultando numa temperatura de desnaturação ( $T_m$ ) bastante elevada ( $\approx 90^\circ C$ ). A variante da SOD1 sem iões metálicos mas com a ligação per-sulfureto intacta (Apo-SOD1 S-S) tem uma  $T_m$  de, cerca de,  $52,8^\circ C$ .

Recentemente, tem sido proposto que a Apo-SOD1, sob condições fisiológicas, i.e.  $37^\circ C$ , pH 7 e  $100 \mu M$  de concentração, forma oligómeros proteicos estáveis, solúveis e de grandes dimensões.

Utilizando uma grande variedade de espectroscopias biomoleculares, estudou-se a interacção *in vitro* entre a Apo-SOD1 e o ião  $Ca^{2+}$ , que está presente, em níveis elevados, no espaço sináptico. Observou-se que este ião provoca alterações estruturais na Apo-SOD1, nos diferentes níveis de estrutura, sem, no entanto, afectar a estabilidade conformacional. Este efeito é ainda mais vincado, quando a proteína é submetida a um ambiente redutor, mais concretamente, quando é incubada com TCEP. Nesse contexto, o ião  $Ca^{2+}$  promove o aumento das zonas hidrofóbicas da proteína expostas ao solvente, bem como, fenómenos de agregação e formação de fibrilas amilóides pela Apo-SOD1.

Os resultados obtidos estão em sintonia com as informações recentes da literatura, que indicam que os pacientes com ELA têm problemas ao nível da regulação dos níveis de  $Ca^{2+}$  e que, consequentemente, este ião poderá ter uma grande influência na ELA.

Palavras-chave: Esclerose Lateral Amiotrófica, Superóxido Dismutase 1, *Folding* de proteínas, Agregação, Iões metálicos, Espectroscopias biomoleculares.



## Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease that involves selective death of the upper and lower motor neurons, leading to muscle atrophy, paralysis and death. Nearly 90% of ALS cases are sporadic, without a known cause, but the remaining 10% have a genetic link and are called familial cases. Of these familial cases, about 25% are caused by mutations in the gene encoding CuZn Superoxide dismutase (SOD1).

The conformational stability of SOD1 appears to be tightly linked to  $Zn^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  ion coordination, which drives the formation of an intramolecular disulfide bond, resulting in a very high  $T_m$  ( $\approx 90^\circ C$ ). The metal-free, disulfide-intact protein (Apo-SOD1 S-S) has a  $T_m$  value of  $\approx 52,8^\circ C$ .

Recently, it has been proposed that Apo-SOD1 under physiological conditions, i.e.,  $37^\circ C$ , pH 7, and  $100 \mu M$  protein concentration forms large, stable and soluble protein oligomers.

Using a wide variety of biomolecular spectroscopies we studied the *in vitro* interaction between Apo-SOD1 and  $Ca^{2+}$  ion, which is present in the synaptic space at high levels. It was observed that this ion causes structural changes in Apo-SOD1, at different structural levels, without, affecting, however, the conformational stability. This effect is even more pronounced when the protein is subjected to a reducing environment, more specifically, when incubated with TCEP. In this context, the  $Ca^{2+}$  ion promotes the increase of hydrophobic areas of the protein exposed to solvent, as well as phenomena of aggregation and amyloid fibril formation by Apo-SOD1.

The results are in line with the recent data indicating that ALS patients have problems in  $Ca^{2+}$  levels' regulation and, consequently, this ion may have a major influence in ALS.

Keywords: Amyotrophic Lateral Sclerosis, Superoxide Dismutase 1, Protein Folding, Aggregation, Metal ions, Biomolecular spectroscopy.

## Lista de abreviaturas

- AMS – Ácido 4,4'-diaminoestilbeno-2,2'-dissulfónico
- ANS – Ácido 8-anilinaftaleno-1-sulfónico
- CD – Dicroísmo Circular
- DLS – Dispersão Dinâmica de Luz
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
- eELA – Esclerose Lateral Amiotrófica esporádica
- ELA – Esclerose Lateral Amiotrófica
- EPR - Ressonância Paramagnética Electrónica
- fELA – Esclerose Lateral Amiotrófica familiar
- FTIR – Infravermelho por Transformada de Fourier
- hSOD1/SOD1 – Superóxido dismutase 1 humana
- NMR – Ressonância Magnética Nuclear
- PCR – Reacção em Cadeia da Polimerase
- PSA – Persulfato de amónio
- rpm – Rotações por minuto
- SDS-PAGE - *SodiumDodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
- TCEP – tris-[2-carboxietil]-fosfina
- ThT - Tioflavina T (3,6 – dimetilbenzotiazol-2-yl)-N,N dimetilanilina)
- T<sub>m</sub> – Temperatura de desnaturação
- TMED – Tetrametiletilenodiamina UV – Ultravioleta
- u.a. – Unidades arbitrárias
- yCCS – Chaperão de Cobre de levedura para a Superóxido Dismutase 1.

## Índice geral

Agradecimentos.....	i
Sumário.....	iii
Abstract.....	v
Lista de abreviaturas.....	vi
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Folding</i> e <i>Misfolding</i> de proteínas.....	1
1.1.1. O processo de <i>folding</i> proteico.....	1
1.1.2. <i>Misfolding</i> e agregação – implicações em diferentes patologias.....	3
1.1.3. Iões metálicos e proteínas: o papel dos metais no <i>folding</i> e <i>misfolding</i> .....	3
1.2. Superóxido dismutase 1 e Esclerose Lateral Amiotrófica.....	5
1.2.1. Esclerose Lateral Amiotrófica: aspectos gerais.....	5
1.2.2. SOD1: função e estrutura.....	7
1.2.3. Associação entre a SOD1 e a ELA.....	10
1.3. Métodos de análise estrutural de proteínas.....	11
1.3.1. Espectroscopia de Dicroísmo Circular.....	11
1.3.2. Espectroscopia de Fluorescência.....	13
1.3.3. Differential Scanning Fluorimetry (DSF).....	14
1.3.4. Dispersão Dinâmica de Luz (DLS).....	15
1.4. Objectivos do trabalho realizado e plano de dissertação.....	16
<b>2. Materiais e Métodos.....</b>	<b>19</b>
2.1. Entidades.....	19
2.2. Expressão e Purificação da SOD1.....	19
2.3. Avaliação da pureza e integridade da SOD1.....	20
2.4. Obtenção do estado Apo da SOD1.....	21
2.5. Titulação da Apo-SOD1 com ião $\text{Ca}^{2+}$ no equilíbrio.....	22
2.5.1. Efeitos ao nível da estrutura secundária.....	22
2.5.2. Efeitos ao nível da estrutura terciária e centro hidrofóbico.....	23
2.5.3. Efeitos ao nível da estrutura quaternária e agregação.....	24
2.6. A influência do Ião $\text{Ca}^{2+}$ na estabilidade térmica e química da Apo-SOD1.....	25

2.7. Avaliação da interferência do íon $\text{Ca}^{2+}$ na afinidade entre a Apo-SOD1 e o íon $\text{Zn}^{2+}$ .....	28
2.8. O papel do TCEP na monomerização e consequente agregação da Apo-SOD1 .....	29
2.9. Íon $\text{Ca}^{2+}$ como potenciador da agregação da Apo-SOD1 .....	30
<b>3. Resultados e Discussão</b> .....	<b>33</b>
3.1. Expressão e Purificação da SOD1 .....	33
3.2. Comparação estrutural entre as formas Holo e Apo-SOD1 .....	38
3.3. Efeito do Íon $\text{Ca}^{2+}$ na estrutura da Apo-SOD1 .....	40
3.3.1. Estrutura secundária .....	40
3.3.2. Estrutura terciária e centro hidrofóbico .....	41
3.3.3. Estrutura quaternária e agregação .....	44
3.4. A influência do íon $\text{Ca}^{2+}$ na estabilidade da Apo-SOD1 .....	47
3.4.1. Estabilidade térmica .....	47
3.4.2. Estabilidade química .....	48
3.5. Avaliação da interferência do íon $\text{Ca}^{2+}$ na afinidade entre a Apo-SOD1 e o $\text{Zn}^{2+}$ .....	49
3.6. Íon $\text{Ca}^{2+}$ como potenciador da agregação da Apo-SOD1 .....	53
3.6.1. O papel do TCEP na monomerização e consequente agregação da Apo-SOD1 .....	53
3.6.2. Íon $\text{Ca}^{2+}$ promove a formação de agregados amilóide da Apo-SOD1 após 24h de incubação .....	56
3.6.3. Cinética de agregação monitorizada através da sonda ThT .....	58
<b>4. Conclusões</b> .....	<b>61</b>
<b>5. Bibliografia</b> .....	<b>63</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.1</b>	<b>pág. 1</b>	Ilustração da transformação de uma proteína, desde o estado em cadeia linear até ao estado nativo.
<b>Figura 1.2</b>	<b>pág. 2</b>	Ilustração referente aos diferentes níveis de estrutura de uma proteína.
<b>Figura 1.3</b>	<b>pág. 6</b>	Comparação entre a comunicação neurónio motor - músculo em funcionamento normal e num caso de ELA.
<b>Figura 1.4</b>	<b>pág. 7</b>	Esquema representativo dos neurónios motores afectados pela ELA e respectivos músculos associados.
<b>Figura 1.5</b>	<b>pág. 9</b>	Estrutura tridimensional da SOD1 humana.
<b>Figura 1.6</b>	<b>pág. 9</b>	Elementos da estrutura secundária da hSOD1.
<b>Figura 1.7</b>	<b>pág. 11</b>	Esquema de funcionamento da espectroscopia de Dicroísmo Circular.
<b>Figura 1.8</b>	<b>pág. 12</b>	Espectros representativos das diferentes estruturas secundárias detectadas por Dicroísmo Circular de UV-longínquo.
<b>Figura 1.9</b>	<b>pág. 13</b>	Exemplos de espectros de emissão de fluorescência de resíduos de triptofano localizados em diferentes ambientes da molécula de proteína.
<b>Figura 1.10</b>	<b>pág. 14</b>	Estrutura química do ANS e da ThT.
<b>Figura 1.11</b>	<b>pág. 15</b>	Esquema representativo da técnica de <i>Differential Scanning Fluorimetry</i> .
<b>Figura 1.12</b>	<b>pág. 16</b>	Esquema ilustrativo do funcionamento do DLS.
<b>Figura 2.1</b>	<b>pág. 23</b>	Esquema representativo dos ensaios realizados utilizando espectroscopia de fluorescência.
<b>Figura 3.1</b>	<b>pág. 34</b>	Cromatograma referente à cromatografia de exclusão molecular (Coluna Sephacryl S-200 HR) e respectivo gel SDS-PAGE.
<b>Figura 3.2</b>	<b>pág. 34</b>	Cromatograma referente à cromatografia de troca iónica (Coluna Q-Sepharose <i>Fast-Flow</i> ) e respectivo gel SDS-PAGE.
<b>Figura 3.3</b>	<b>pág. 35</b>	Gel SDS-PAGE referente ao processo de purificação da SOD1.
<b>Figura 3.4</b>	<b>pág. 36</b>	Espectro UV-Visível da SOD1 obtida após purificação.
<b>Figura 3.5</b>	<b>pág. 37</b>	Espectro de Dicroísmo Circular da SOD1 obtida após purificação.
<b>Figura 3.6</b>	<b>pág. 37</b>	Rampa de temperatura referente à SOD1 obtida após purificação.
<b>Figura 3.7</b>	<b>pág. 38</b>	Esquema representativo do ensaio de actividade enzimática realizado com a SOD1 após purificação.
<b>Figura 3.8</b>	<b>pág. 39</b>	Espectros de Dicroísmo Circular da Holo-SOD1, obtida após purificação, e da respectiva Apo-SOD1, após o processo de remoção dos iões metálicos.
<b>Figura 3.9</b>	<b>pág. 39</b>	Rampa de temperatura referente à Apo-SOD1 obtida após remoção dos iões metálicos da Holo-SOD1 purificada.
<b>Figura 3.10</b>	<b>pág. 40</b>	Influência do ião $\text{Ca}^{2+}$ na estrutura secundária da Apo-SOD1.
<b>Figura 3.11</b>	<b>pág. 41</b>	Resultados de espectroscopia de fluorescência do resíduo de triptofano

referentes às amostras de Apo-SOD1 incubada, durante a noite, com diferentes concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ .

- Figura 3.12**    **pág. 42**    Resultados de espectroscopia de fluorescência do ANS referentes às amostras de Apo-SOD1 incubada, durante a noite, com diferentes concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Figura 3.13**    **pág. 43**    Resultados de *Differential Scanning Fluorimetry* referentes às amostras de Apo-SOD1 incubada, durante a noite, com diferentes concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Figura 3.14**    **pág. 44**    Gel Native-PAGE referente ao estudo da influência do íon  $\text{Ca}^{2+}$  na estrutura quaternária da Apo-SOD1.
- Figura 3.15**    **pág. 45**    Resultados de espectroscopia de fluorescência da ThT referentes às amostras de Apo-SOD1 incubada, durante a noite, com diferentes concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Figura 3.16**    **pág. 46**    Monitorização da formação de agregados de Apo-SOD1, através da técnica de DLS.
- Figura 3.17**    **pág. 47**    Rampas de temperatura referentes às amostras de Apo-SOD1 incubada durante a noite com diferentes concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  (Espectroscopia de Dicroísmo Circular).
- Figura 3.18**    **pág. 48**    Rampas de temperatura referentes às amostras de Apo-SOD1 incubada, durante a noite, com diferentes concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  (*Differential Scanning Fluorimetry*).
- Figura 3.19**    **pág. 49**    Estudo da estabilidade química da Apo-SOD1 incubada, durante a noite, com e sem  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Figura 3.20**    **pág. 50**    Rampas de temperatura referentes às amostras de Apo-SOD1 incubada durante a noite com diferentes concentrações de  $\text{Zn}^{2+}$ .
- Figura 3.21**    **pág. 51**    Influência do íon  $\text{Ca}^{2+}$  na afinidade entre a Apo-SOD1 e o íon  $\text{Zn}^{2+}$  (230nm).
- Figura 3.22**    **pág. 52**    Influência do íon  $\text{Ca}^{2+}$  na afinidade entre a Apo-SOD1 e o íon  $\text{Zn}^{2+}$  (218nm).
- Figura 3.23**    **pág. 53**    Rampa de temperatura referente à amostra de Apo-SOD1 incubada com  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  (razão Íon:Proteína = 3).
- Figura 3.24**    **pág. 54**    Resultados de espectroscopia de fluorescência, baseados na sonda ThT, referentes às amostras de Apo-SOD1 incubada, durante 24h, com diferentes concentrações TCEP.
- Figura 3.25**    **pág. 55**    Gel SDS-PAGE referente ao estudo da influência do TCEP na monomerização e agregação da proteína Apo-SOD1.
- Figura 3.26**    **pág. 57**    Resultados de espectroscopia de fluorescência do ANS referentes às amostras de Apo-SOD1 incubada, durante 24h, com diferentes concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Figura 3.27**    **pág. 57**    Resultados de espectroscopia de fluorescência da ThT referentes às amostras de Apo-SOD1 incubada, durante 24h, com diferentes concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Figura 3.28**    **pág. 58**    Cinética de ligação da ThT referente às amostras de Apo-SOD1 incubada com (razão 2) e sem  $\text{Ca}^{2+}$  e com uma concentração de 2mM de TCEP.

## Índice de tabelas

<b>Tabela 2.1</b>	<b>pág. 22</b>	Conteúdo das amostras utilizadas para estudar a influência do íon $\text{Ca}^{2+}$ na estrutura secundária da Apo-SOD1, através de Espectroscopia de Dicroísmo Circular.
<b>Tabela 2.2</b>	<b>pág. 23</b>	Fluoróforos utilizados e respectivos comprimentos de onda de excitação e emissão.
<b>Tabela 2.3</b>	<b>pág. 24</b>	Conteúdo das amostras utilizadas para estudar a influência do íon $\text{Ca}^{2+}$ na estrutura terciária da Apo-SOD1, através de <i>Differential Scanning Fluorimetry</i> .
<b>Tabela 2.4</b>	<b>pág. 25</b>	Conteúdo das amostras utilizadas para estudar a influência do íon $\text{Ca}^{2+}$ na estrutura quaternária da Apo-SOD1 através de um gel Native-PAGE.
<b>Tabela 2.5</b>	<b>pág. 26</b>	Conteúdo das amostras utilizadas para estudar a influência do íon $\text{Ca}^{2+}$ na estabilidade térmica da Apo-SOD1, através de <i>Differential Scanning Fluorimetry</i> .
<b>Tabela 2.6</b>	<b>pág. 27</b>	Conteúdo das amostras utilizadas para estudar a influência do íon $\text{Ca}^{2+}$ na estabilidade química da Apo-SOD1, através de Espectroscopia de Fluorescência.
<b>Tabela 2.7</b>	<b>pág. 28</b>	Conteúdo das amostras utilizadas para estudar a interferência do íon $\text{Ca}^{2+}$ na afinidade entre a Apo-SOD1 e íon $\text{Zn}^{2+}$ , através de Espectroscopia de Dicroísmo Circular.
<b>Tabela 2.8</b>	<b>pág. 29</b>	Conteúdo das amostras utilizadas para estudar a influência do agente redutor TCEP na estrutura quaternária da Apo-SOD1.
<b>Tabela 2.9</b>	<b>pág. 30</b>	Conteúdo das amostras utilizadas para estudar a influência do agente redutor TCEP na estrutura terciária da Apo-SOD1.
<b>Tabela 2.10</b>	<b>pág. 30</b>	Conteúdo das amostras utilizadas para estudar a influência do íon $\text{Ca}^{2+}$ na estrutura terciária da Apo-SOD1, através de Espectroscopia de Fluorescência.
<b>Tabela 2.11</b>	<b>pág. 31</b>	Conteúdo das amostras utilizadas para estudar a influência de do íon $\text{Ca}^{2+}$ na estrutura terciária da Apo-SOD1, através de Espectroscopia de Fluorescência (Estudo da cinética de ligação da ThT).

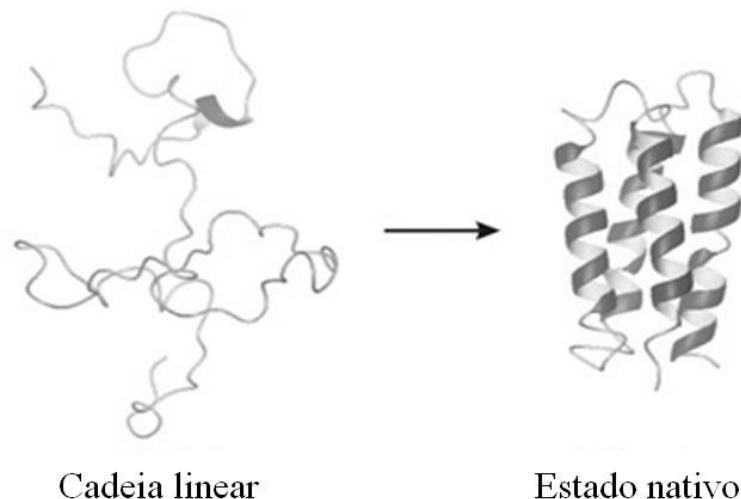


# 1. Introdução

## 1.1. *Folding* e *Misfolding* de proteínas

### 1.1.1. O processo de *folding* proteico

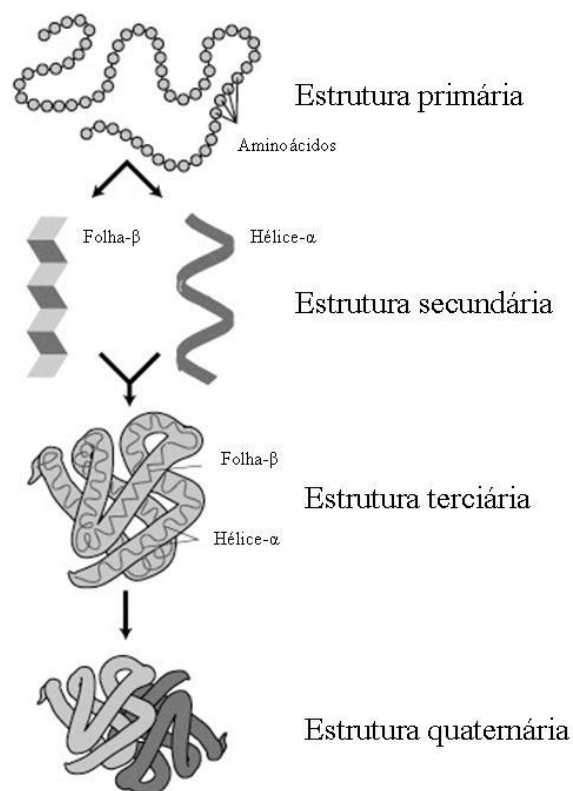
O *folding* de uma proteína é o processo físico através do qual uma cadeia polipeptídica adquire a sua estrutura tridimensional característica e funcional (Alberts et al, 2002). Após a tradução da sequência de mRNA para uma cadeia linear de aminoácidos, a proteína existe sob a forma de um polipéptido sem estrutura organizada (Figura 1.1). De seguida, os aminoácidos interagem entre si de forma a produzir uma estrutura tridimensional bem definida, designada por estado nativo de uma proteína (Figura 1.1), e que corresponde ao estado de menor energia livre.



**Figura 1.1** - Ilustração da transformação de uma proteína, desde o estado em cadeia linear (lado esquerdo) até ao estado nativo (lado direito). No estado nativo os aminoácidos hidrofóbicos estão protegidos do solvente.

Actualmente, é aceite que as proteínas apresentam vários níveis de estrutura, nomeadamente estrutura primária, secundária, terciária e, por vezes, quaternária (Murray et al, 2006). A estrutura primária é dada pela sequência de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica (Nelson et al, 2008) (Figura 1.2), sendo o nível estrutural mais simples mas, também, um dos mais importantes, pois, segundo o Dogma de Anfinsen, dele deriva todo o arranjo espacial da molécula (Anfinsen, 1973). A estrutura secundária é dada pelo arranjo espacial de aminoácidos próximos entre si na sequência primária da proteína e ocorre graças à possibilidade de rotação das ligações entre os carbonos  $\alpha$  dos aminoácidos e os seus grupos amina e carboxilo. Existem dois tipos principais de estrutura secundária, ambas estabilizadas por ligações de hidrogénio: a hélice- $\alpha$ , que consiste numa estrutura cilíndrica na qual as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos se encontram viradas para o exterior; e a folha- $\beta$ ,

que consiste numa estrutura achatada e rígida (Rose et al, 2006) (Figura 1.2). A estrutura terciária pode ser definida como a aparência global de uma molécula de proteína (Figura 1.2), sendo estabilizada por interações não-locais (ou à distância), nomeadamente interações electrostáticas e hidrofóbicas, ligações de hidrogénio, forças de van der Waals e, por vezes, ligações per-sulfureto (Alberts et al, 2002). Algumas proteínas necessitam de atingir a estrutura quaternária para serem biologicamente activas. Este nível de estrutura é formado pela associação de duas ou mais cadeias polipeptídicas, através das mesmas forças envolvidas na formação da estrutura terciária (Nelson et al, 2008) (Figura 1.2).



**Figura 1.2** - Ilustração referente aos diferentes níveis de estrutura de uma proteína. Adaptado de [http://biotech.matcmadison.edu/resources/proteins/labManual/chapter\\_2.htm](http://biotech.matcmadison.edu/resources/proteins/labManual/chapter_2.htm) (consultado em 25/7/2011)

As proteínas no seu estado nativo têm, normalmente, um núcleo hidrofóbico, no qual o empacotamento das cadeias laterais confere estabilidade, enquanto as cadeias laterais polares ou carregadas ocupam a superfície exposta ao solvente, onde interagem com a água circundante. Minimizar o número de cadeias laterais hidrofóbicas expostas ao solvente é, geralmente, uma obrigatoriedade no processo de *folding* (Pace et al, 1996).

A elucidação das vias de *folding* de proteínas e dos princípios que as governam têm sido um dos problemas mais difíceis de resolver na área da biologia estrutural. Praticamente todas as vias bioquímicas são estudadas através do isolamento dos intermediários da via e da determinação da sua estrutura. Contudo, esta abordagem não se pode aplicar às vias de *folding* de proteínas, uma vez que os

seus intermediários têm tempos de vida inferiores a um segundo e não podem ser isolados e estudados pelos métodos estruturais habituais (Englander et al, 2007). Desta forma, tem-se tentado ultrapassar este problema recorrendo a métodos biofísicos, tais como as espectroscopias de fluorescência, dicroísmo circular e infravermelho, e a ressonância magnética nuclear. Mais recentemente, estes métodos têm sido combinados com técnicas de mistura rápida e perturbação do equilíbrio, de forma a tentar estudar o processo de *folding* em tempo real (Travaglini-Allocatelli et al, 2009).

### **1.1.2. *Misfolding* e agregação – implicações em diferentes patologias**

Uma proteína é designada de *misfolded* quando, devido a condições adversas ou mutações no gene que a codifica, não consegue atingir, ou perde, a sua forma tridimensional nativa, isto é, aquela que a permite ser bioquimicamente funcional. Entre as condições adversas referidas, destacam-se as elevadas concentrações de solutos, pH extremos, forças mecânicas e temperaturas acima ou abaixo do intervalo no qual as células normalmente vivem. Sob certas condições, algumas proteínas podem readquirir o estado nativo, no entanto, em vários casos o *misfolding* é irreversível (Shortle, 1996).

As proteínas no estado *misfolded*, devido ao facto de deixarem de estar activas e por isso não cumprirem a sua função na célula, estão associadas a patologias de perda de função (Winklhofer et al, 2008), como por exemplo a Hemofilia. Por outro lado, a formação de agregados proteicos, constituídos por várias moléculas de proteínas *misfolded*, está associada a patologias de ganho de função tóxica, nomeadamente (i) doenças relacionados com priões, tais como Creutzfeldt-Jakob e Encefalopatia Espongiforme Bovina (doença das vacas loucas); (ii) doenças relacionadas com amilóide, tais como Alzheimer e Cardiomiopatia Amilóide Familiar; (iii) doenças de agregação intracitoplasmática, tais como Huntington, Parkinson e Esclerose Lateral Amiotrófica (Chiti & Dobson, 2006). Estas doenças degenerativas estão associadas à multimerização de proteínas *misfolded* em agregados insolúveis extracelulares e/ou inclusões intracelulares, incluindo fibrilas amilóides de folhas- $\beta$  cruzadas. No entanto, não é claro se estes agregados são a causa ou uma consequência da perda da homeostase proteica, que consiste no balanço entre a síntese, o *folding*, a agregação e a degradação das proteínas (Winklhofer et al, 2008).

### **1.1.3. Iões metálicos e proteínas: o papel dos metais no *folding* e *misfolding***

Actualmente, são conhecidos pelo menos treze metais que são essenciais para plantas e animais (Bertini et al, 1994). Alguns deles, nomeadamente o sódio, o potássio, o magnésio e o cálcio, estão presentes em elevadas quantidades e são conhecidos como “metais em massa” (Fenton, 1995). Os restantes nove, presentes em pequenas quantidades, encontram-se no bloco d da tabela periódica: vanádio, crómio, molibdénio, manganésio, ferro, cobalto, níquel, cobre e zinco, e são conhecidos

como metais vestigiais. Os “metais em massa” conferem 1 a 2% da massa do corpo humano enquanto os metais vestigiais representam menos de 0.01% (Fenton, 1995).

A importância dos íons metálicos na biologia é enorme, o que pode ser comprovado pelo facto de que uma em cada quatro proteínas presentes na base de dados *Protein Data Bank* contém, pelo menos, um íon metálico coordenado à mesma (Shi et al, 2005). Devido às propriedades químicas específicas de cada metal, diferentes metais estão associados a diferentes tipos de funções biológicas, embora exista sobreposição na maioria dos casos (Bertini et al, 1994).

Tornou-se, assim, necessário que os diferentes organismos desenvolvessem um conjunto de sistemas para uma captação eficiente de íons metálicos, assim como transporte intracelular e armazenamento dos mesmos, de forma a que, por um lado, as necessidades das células sejam satisfeitas e, por outro lado, os efeitos tóxicos associados sejam minimizados (Bleackley & Macgillivray, 2011). Assim, a concentração de metais nas células é bastante regulada, para garantir que estes estão nos seus níveis óptimos, uma vez que o excesso ou a carência são, por vezes, perigosos, podendo mesmo ser letais para o organismo. A ausência desta regulação pode levar a toxicidade, nomeadamente através da formação de radicais de oxigénio (incluindo o radical hidroxilo) pelas reacções de Fenton (Valko et al, 2005), que levam à oxidação de uma vasta gama de biomoléculas, incluindo DNA, proteínas e lípidos.

Apesar de grande parte da biologia dos íons metálicos ter sido já estabelecida, existe, ainda, muito para desvendar sobre a forma como as células estabelecem e mantêm os níveis desses íons e de que forma os mecanismos homeostáticos de cada metal se relacionam entre si e com as vias associadas a outros processos biológicos (Bleackley & Macgillivray, 2011).

Tem sido proposto que as proteínas adquirem estrutura e dinâmica durante o processo de tradução (Ellis et al, 2008). Actualmente, é aceite que os metais têm a capacidade de estabilizar a estrutura das proteínas, mas pouco é sabido em relação à forma como os metais podem modular as vias de *folding*, a rapidez e os estados de transição de *folding* (Gomes & Wittung-Stafshede, 2010).

Os metais podem ser considerados uma faca de dois gumes, visto que, por um lado, têm um papel essencial como cofactores em proteínas, mas, por outro lado, são tóxicos quando em quantidades elevadas e/ou quando estão livres em fluidos biológicos. Várias patologias, entre as quais a síndrome de Menke, a doença de Wilson, doenças neurodegenerativas e síndromes de deposição de amiloide, estão associadas a alterações na interacção metal-proteína (Gomes & Wittung-Stafshede, 2010). Em vários casos já descritos, a ligação de metais a proteínas com propensão para oligomerizar modula as vias de agregação e fibrilação. Por exemplo, os íons  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  induzem a agregação do péptido amiloidogénico  $\beta$ -microglobulina, possivelmente através de um mecanismo que envolve um aumento local da flexibilidade conformacional (Villanueva et al, 2004).

A importância da homeostase dos metais está a tornar-se cada vez mais evidente nas doenças neurodegenerativas, nomeadamente Alzheimer e Parkinson, que são caracterizadas por níveis elevados e má compartimentação de ferro, cobre e zinco (Zatta et al, 2009). No caso da doença de Alzheimer, a

deposição da proteína  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) é fortemente influenciada por iões metálicos, uma vez que a ligação dos metais parece ter um papel preponderante na formação das estruturas folha- $\beta$  cruzada das fibrilas amilóides. Assim, pulsos de zinco, em concentrações micromolares, resultam em interacções proteína-metal que estabilizam de forma específica os agregados patogénicos não-fibrilares, que, pensa-se, são mais tóxicos do que as próprias fibrilas (Noy et al, 2008). Este fenómeno deve ser visto num contexto fisiológico, uma vez que o zinco e o cobre, em concentrações elevadas transientes, estão presentes na sinapse glutamatérgica (Crouch et al, 2009).

Recentemente, tem sido proposto que a perda da homeostase intracelular do ião  $Ca^{2+}$  é um processo bastante relevante para a ELA, podendo mesmo ter um papel crucial nos vários mecanismos de disfunção dos neurónios motores (Tradewell et al, 2011).

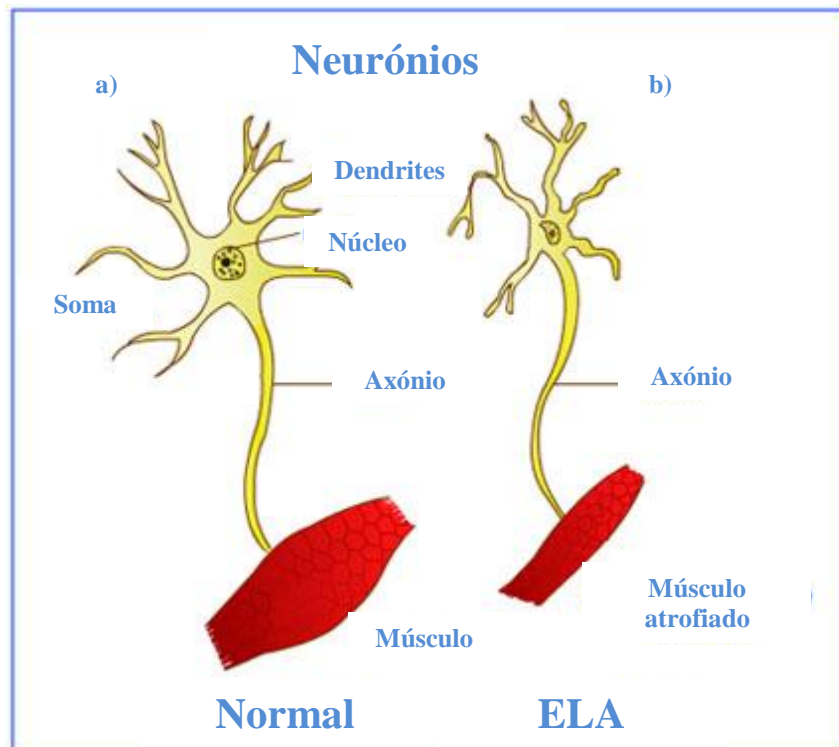
Estes exemplos demonstram a elevada importância de se compreender os mecanismos por detrás das interacções entre os metais e as proteínas nos diferentes estados estruturais, isto é, *folded*, *unfolded* e estados intermédios.

## **1.2. Superóxido dismutase 1 e Esclerose Lateral Amiotrófica**

### **1.2.1. Esclerose Lateral Amiotrófica: aspectos gerais**

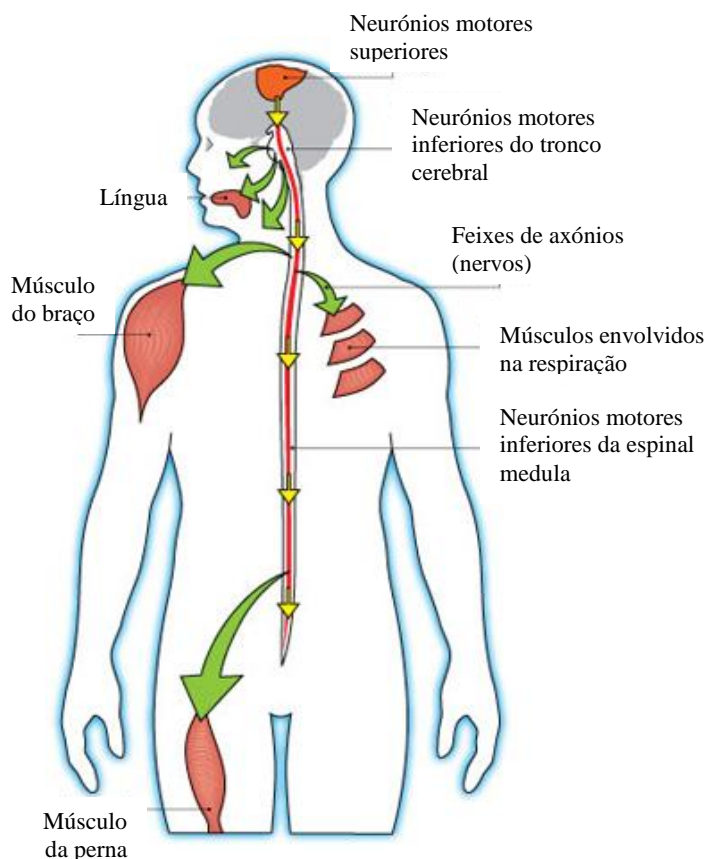
A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), também conhecida por doença de Lou Gehrig, foi descrita pela primeira vez no final do século XIX pelo neurologista Francês Jean-Martin Charcot (Seetharaman et al, 2009), e consiste numa doença neurodegenerativa fatal que envolve a morte selectiva dos neurónios motores superiores e inferiores, levando à atrofia muscular (Figuras 1.3 e 1.4), paralisia e morte (Shaw & Valentine, 2007). Em cada ano, são diagnosticados cerca de 5000 casos de ELA, sendo que a idade típica de início dos sintomas é entre os 50 e os 60 anos (Trumbull & Beckman, 2009). Em média, após ser efectuado o diagnóstico da doença, os pacientes têm entre 2 a 5 anos de esperança de vida (Rowland & Shneider, 2001).

O acompanhamento dos pacientes é um desafio, visto que, até agora, não existe nenhum tratamento efectivo e a terapia tem como objectivos melhorar a qualidade de vida e aumentar a esperança de vida, dentro do possível. A maioria dos centros de reabilitação opta, hoje em dia, por um tratamento multidisciplinar que, segundo alguns estudos, permite aumentar o tempo de sobrevivência. O único fármaco aprovado para o tratamento da ELA é o Riluzole que, de acordo com dois ensaios clínicos, permite prolongar a sobrevivência dos pacientes por mais 4 meses (Gordon, 2011).



**Figura 1.3** – Comparação entre a comunicação neurónio motor - músculo a) em funcionamento normal e b) num caso de ELA. Adaptado de: <http://www.medindia.net/patients/patientinfo/amyotrophic-lateral-sclerosis.htm> (consultado em 20/2/2011).

A ELA é considerada uma patologia genética complexa, na qual múltiplos factores genéticos e ambientais se combinam para originar a doença. Assim, as causas da ELA são bastante difíceis de identificar, o que poderá estar relacionado com o facto de ser uma doença rara, com uma incidência de, aproximadamente, 2 casos por 100.000 pessoas por ano nos países Ocidentais mas, principalmente, devido à complexidade associada à patologia (Gordon, 2011).



**Figura 1.4** – Esquema representativo dos neurónios motores afectados pela ELA e respectivos músculos associados. Entre os músculos afectados encontram-se os músculos dos membros superiores (braços) e inferiores (pernas), a língua e os músculos peitorais envolvidos na respiração. Adaptado de: [www.indianbuzzblog.blogspot.com](http://www.indianbuzzblog.blogspot.com) (consultado a 20/2/2011).

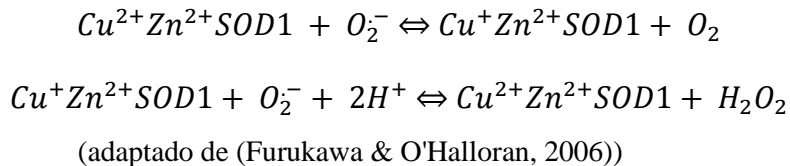
### 1.2.2. SOD1: função e estrutura

É, frequentemente, proposto que as espécies reactivas de oxigénio (EROs) têm um efeito tóxico para as células, através da oxidação de uma vasta gama de biomoléculas incluindo DNA, proteínas e lípidos. Modificações oxidativas nestas biomoléculas traduzem-se numa diminuição da actividade enzimática e/ou induzem mutações no DNA, podendo levar à morte celular através de necrose ou apoptose (Davies, 2000). Apesar do radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) não ser um forte oxidante, e até actuar como redutor, pode “atacar” e alterar os centros de Ferro-Enxofre em enzimas como as desidratases, libertando o ião  $Fe^{2+}$ , o que leva à produção de radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), através das reacções de Fenton (Kang & Eum, 2000). Além disso, a reacção do  $O_2^{\cdot-}$  como óxido nítrico (NO) forma, rapidamente, o potente e versátil oxidante peroxinitrito ( $ONNO^{\cdot-}$ ) (Furukawa & O'Halloran, 2006).

Apesar de os mecanismos associados à toxicidade das espécies reactivas de oxigénio ainda necessitarem de maior investigação, é hoje em dia claro que o *stress* oxidativo provoca lesões em

vários componentes essenciais da célula. Como tal, a célula possui vários sistemas de defesa contra estes ataques, entre os quais se encontra a enzima antioxidante Superóxido Dismutase Cobre-Zinco (CuZnSOD1 ou SOD1) (McCord & Fridovich, 1969).

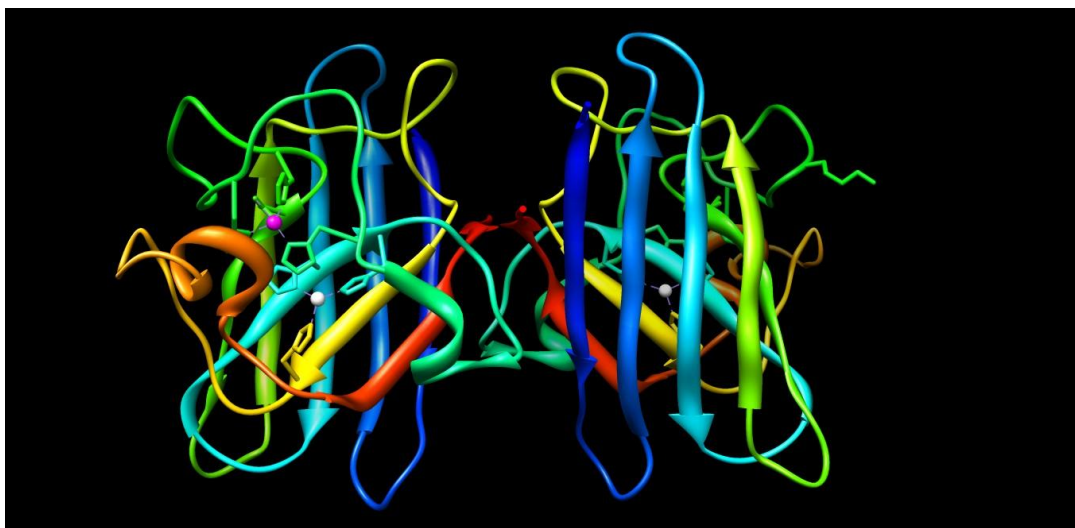
A SOD1 é uma metaloproteína que catalisa a dismutação do radical superóxido em oxigénio molecular ( $O_2$ ) e peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) (Potter et al, 2007):



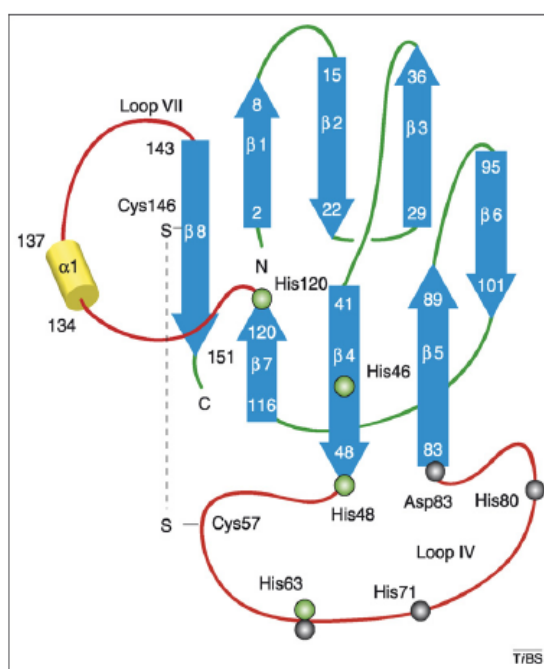
A SOD1 localiza-se, principalmente, no citosol, existindo também uma pequena fracção no espaço intermembranar mitocondrial, núcleo, lisossomas e peroxissomas. Ao nível dos tecidos, esta proteína é praticamente ubíqua, sendo que os níveis mais elevados se situam no fígado e nos rins (Furukawa & O'Halloran, 2006).

Esta enzima é constituída por duas subunidades idênticas (homodímero) compostas por 153 resíduos de aminoácidos (Figura 1.5), sendo que cada uma delas é constituída por um  $\beta$ -barrel e dois *loops* longos de estruturas irregulares: o *loop* de zinco (*loop* IV, resíduos 50 a 83) e o *loop* electrostático (*loop* VII, resíduos 121 a 142) (Figura 1.6). Cada uma das subunidades possui uma região de ligação a metais, que liga um ião cobre ( $Cu^{2+}$ ) e um ião zinco ( $Zn^{2+}$ ), posicionada de forma a que os iões partilhem um ligando histidilimidazolato comum (Potter et al, 2007; Seetharaman et al, 2009).

Em termos de estabilidade, a SOD1 é uma proteína bastante resistente à desnaturação térmica e química, tendo uma  $T_m$  de, aproximadamente, 90°C. Além disso, é observada actividade enzimática mesmo a 80°C, na presença de 10M de Ureia ou 4% de SDS (Furukawa & O'Halloran, 2006). Os iões metálicos têm uma enorme importância na integridade estrutural desta proteína (Rodriguez et al, 2005; Svensson et al, 2010; Trumbull & Beckman, 2009), uma vez que a ligação do  $Cu^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  promove a formação da ligação per-sulfureto, aumentando a afinidade das duas subunidades no dímero, e diminui a susceptibilidade à proteólise, quando comparado com a forma sem metais (Apo-SOD1) (Potter et al, 2007). Assim, a remoção do ião cobre da SOD1 leva a uma diminuição do  $T_m$  para cerca de 70°C, enquanto a remoção subsequente do ião zinco resulta num  $T_m$  de, aproximadamente, 60°C (Furukawa & O'Halloran, 2006).



**Figura 1.5** – Estrutura tridimensional da SOD1 humana. Os resíduos de aminoácidos estão representados sob a forma de *Ribbon* com coloração em arco-íris. A majenta estão representados os iões  $Zn^{2+}$  (um por monómero) e a branco os iões  $Cu^{2+}$  (um por monómero). As cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos que interagem com os iões metálicos estão representadas sob a forma de *atoms and bonds* (Ficheiro PDB: 1PU0).



**Figura 1.6** – Elementos da estrutura secundária da hSOD1. As folhas  $\beta$  e os resíduos que as compõem estão numerados; a hélice  $\alpha$  ( $\alpha 1$ ) é apresentada como um cilindro. Os resíduos que ligam Zinco (His63, His71, His80 e Asp83) estão apresentados como esferas cinzentas; os resíduos que ligam Cobre (His46, His48, His63 e His120) estão apresentados como esferas verdes. A ligação per-sulfureto entre os resíduos Cys57 e Cys146 está indicada a tracejado. Os dois *loops* maiores da SOD1 (*loops* IV e VII) estão coloridos de vermelho. Adaptado de (Shaw & Valentine, 2007).

A SOD1 pode ser descrita como uma “faca de dois gumes”, visto que pode funcionar como um antioxidante benéfico ou, com mutações num único resíduo (ver secção 1.2.3), pode formar

agregados proteicos que, dependendo da maquinaria de controlo de qualidade e da quantidade de SOD1 produzida, podem ser tóxicos para a célula (Furukawa & O'Halloran, 2006).

### 1.2.3. Associação entre a SOD1 e a ELA

Uma vez iniciada a doença, ocorre uma cascata de eventos celulares que inclui *stress* oxidativo (Miana-Mena et al, 2010), excitotoxicidade induzida por glutamato, agregação proteica intracelular (Chattopadhyay et al, 2008), disfunção mitocondrial (Li et al, 2010), transporte axonal anormal (Bilsland et al, 2010) e activação de caspases (Soo et al, 2009). Todos estes factores contribuem para a complexidade desta patologia e explicam o facto de a etiologia da doença ser, ainda, desconhecida.

Cerca de 90% dos casos de ELA são esporádicos (eELA) e não têm causa conhecida. Os restantes 10% dos casos têm origem genética e são denominados de familiares (fELA) (Chattopadhyay & Valentine, 2009; Li et al, 2010; Shaw & Valentine, 2007). Destes casos familiares, cerca de 25% são causados por mutações no gene que codifica para a SOD1, sendo que já foram identificadas mais de 100 mutações diferentes nesta proteína associadas a esta doença (Li et al, 2010; Nordlund & Oliveberg, 2008). A maioria destas mutações resulta na substituição de apenas um aminoácido na sequência, no entanto, outras levam ao aumento ou diminuição do número de aminoácidos da sequência polipeptídica. Estudos recentes sugerem que as mutações na SOD1 são mais comuns do que se pensava, podendo causar, aproximadamente, 7% do total de casos de ELA (Andersen et al, 2003).

Uma das marcas patológicas desta doença é, tal como já foi referido, a presença de depósitos de proteínas nos neurónios motores dos pacientes. Os agregados proteicos são também encontrados noutras doenças neurológicas como Alzheimer, Parkinson, Huntington e doenças de Priões, que se pensa estarem associadas a destabilização e *misfolding* de proteínas (Potter et al, 2007).

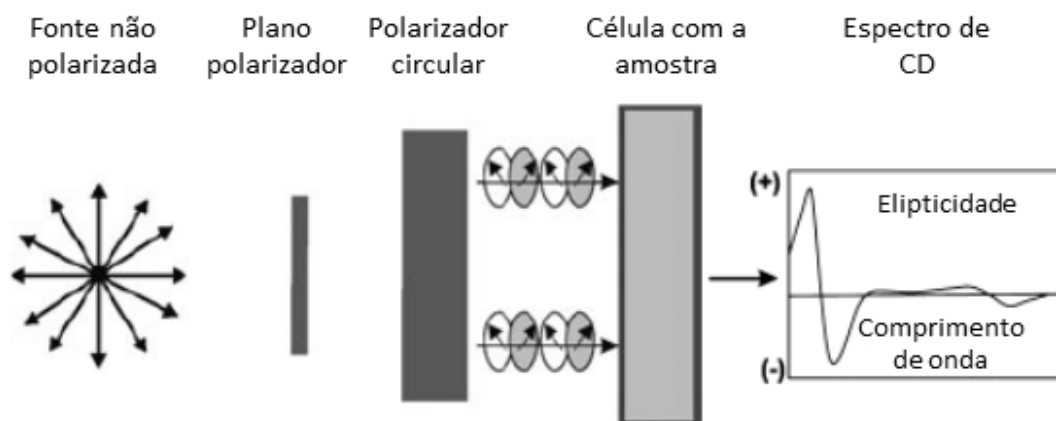
É, cada vez mais, consensual que a ELA mediada por SOD1 é uma doença de *misfolding* de proteína, associada a um ganho de função tóxica, e não à perda de função, como se chegou a supor inicialmente (Furukawa & O'Halloran, 2006). Para esta mudança de paradigma contribuíram bastante os estudos feitos em ratinhos, aos quais foi eliminado o gene que codifica para a SOD1 e que, apesar disso, não apresentavam sintomas de ELA nem tinham uma morte precoce (Reaume et al, 1996). Desta forma, a regulação intracelular da estabilidade da SOD1 será um factor muito importante no mecanismo molecular desta patologia.

## 1.3. Métodos de análise estrutural de proteínas

### 1.3.1. Espectroscopia de Dicroísmo Circular

Algumas biomoléculas possuem assimetria molecular, isto é, não são sobreponíveis com a sua imagem reflectida no espelho. Estas moléculas são denominadas de quirais, sendo que um dos exemplos mais conhecidos de quiralidade é o átomo de carbono tetraedricamente ligado a quatro grupos de átomos diferentes (Ranjbar & Gill, 2009).

A interacção de uma molécula quiral com a luz polarizada é um processo muito específico e pode ser usado como método de caracterização, quer de pequenas moléculas, quer de estruturas macromoleculares (Fasman, 1996). Um método usado para medir os efeitos da luz polarizada em moléculas assimétricas é o Dicroísmo Circular (CD). O dicroísmo é, por vezes, expresso como a propriedade que certos materiais têm para absorver luz em diferentes níveis, dependendo da polarização do feixe incidente. Assim, quando a absorção da luz circularmente polarizada numa direcção (por exemplo, direita) é diferente da absorção da luz circularmente polarizada na direcção oposta (esquerda), diz-se que o material exhibe dicroísmo circular (Figura 1.7) (Ranjbar & Gill, 2009).



**Figura 1.7** – Esquema de funcionamento da espectroscopia de Dicroísmo Circular, na qual uma diferença de absorção é medida. Adaptado de (Ranjbar & Gill, 2009)

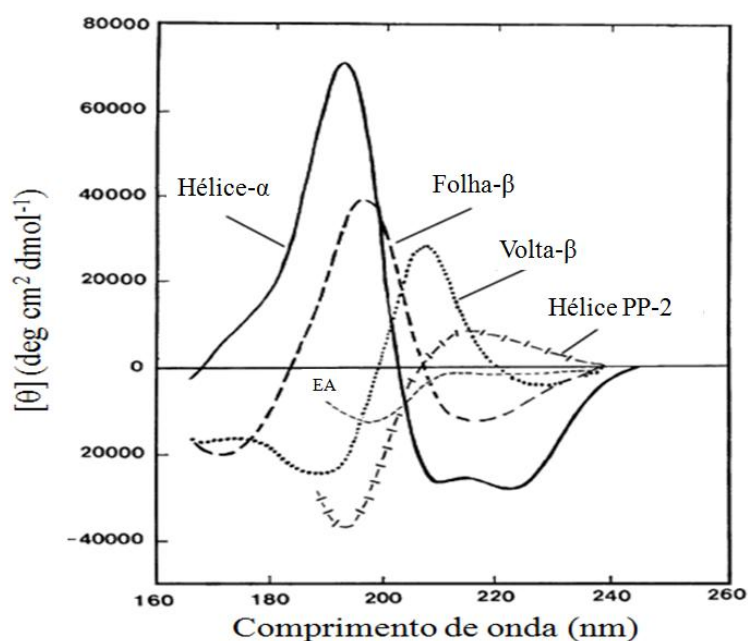
Tal como no espectro de absorção, as proteínas no seu estado nativo têm um espectro de CD característico, apresentando pequenas alterações específicas que permitem diferenciá-las. A aparência do espectro, assim como os valores máximo e mínimo, fornecem informação sobre a proteína (Hennessey & Johnson, 1981).

Esta técnica permite um número bastante variado de aplicações, em várias áreas de estudos biológicos, nomeadamente: (i) avaliação conformacional de proteínas e ácidos nucleicos; (ii) análise da termodinâmica do *folding* e *unfolding* de biomoléculas; (iii) estudos de interacção de biomoléculas

assimétricas (exemplos: interações proteína-proteína, interações proteína-DNA, interações proteína-ligando e interações DNA-ligando); (iv) cinética de *folding* e *unfolding* de macromoléculas (Ranjbar & Gill, 2009).

A estrutura secundária de uma proteína pode ser determinada através de espectroscopia de CD na região espectral do UV-longínquo (190 a 250nm) (Kelly & Price, 1997). Em termos espectrais, picos em forma de “w” com sulcos próximos dos 222 e 208nm são indicativos da presença de estruturas em hélice- $\alpha$ , enquanto picos em forma de “v” com um sulco entre os 217 e 220nm são indicativos de estruturas em folha- $\beta$  (Figura 1.8) (Ranjbar & Gill, 2009).

O espectro de CD de uma proteína na região do UV-próximo (250 a 320nm) pode ser sensível a determinados aspectos da estrutura terciária. Assim, sinais na região dos 255 aos 270nm são atribuídos a grupos fenil e fenilalanina, sinais entre 275 e 285nm são característicos de grupos fenólicos de tirosinas e, por fim, sinais na região dos 285 a 305nm correspondem a grupos indole de resíduos de triptofano (Kelly et al, 2005).



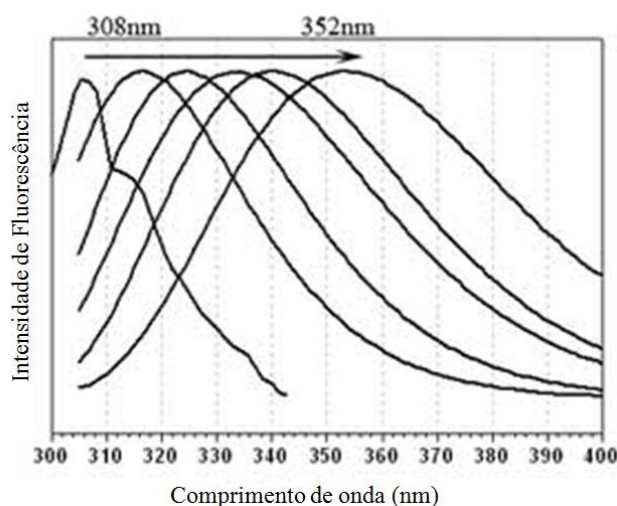
**Figura 1.8** – Espectros representativos das diferentes estruturas secundárias detectadas por Dicroísmo Circular de UV-longínquo. EA: Enrolamento Aleatório.

A estabilidade térmica de uma proteína pode ser avaliada através de CD, monitorizando as alterações do espectro à medida que se varia a temperatura. Em determinados casos, o espectro de CD, de UV-próximo ou longínquo, pode ser seguido a várias temperaturas. Alternativamente, pode ser escolhido um comprimento de onda que monitoriza uma característica específica da estrutura da proteína, e o sinal a esse comprimento de onda é lido de forma contínua, à medida que a temperatura aumenta (Ranjbar & Gill, 2009).

### 1.3.2. Espectroscopia de Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é um dos métodos mais robustos para estudar o *fold*ing e a dinâmica de proteínas (Bartlett & Radford, 2009), bem como estruturas membranares (Munishkina & Fink, 2007). Esta técnica tem sido aplicada, com sucesso, no estudo dos mecanismos complexos de agregação proteica, nomeadamente, na formação de fibrilas amilóides e na interação de proteínas amiloidogénicas com membranas (Lindgren & Hammarström, 2010). Uma grande vantagem da espectroscopia de fluorescência reside na sua vasta aplicabilidade, uma vez que, praticamente todas as proteínas têm resíduos de triptofano, tirosina e fenilalanina, que são potenciais fluoróforos naturais.

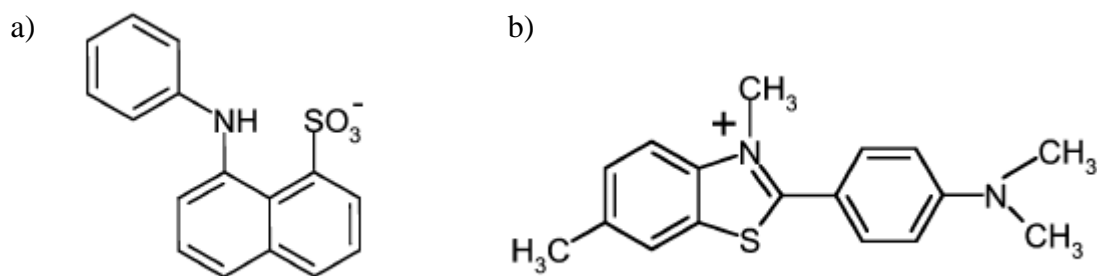
No entanto, os resíduos de tirosina e fenilalanina não são sensíveis ao ambiente que os rodeia e, por isso, não fornecem informação acerca da estrutura das proteínas. Os resíduos de triptofano podem emitir fluorescência desde os 308 até aos 352nm (Figura 1.9), dependendo das propriedades do ambiente que os rodeiam na proteína (Burstein et al, 2001) (Lakowicz et al, 2006). Assim, o desvio da posição do máximo de fluorescência dependerá do quão polar e flexível é o ambiente do triptofano.



**Figura 1.9** – Exemplos de espectros de emissão de fluorescência de resíduos de triptofano localizados em diferentes ambientes da molécula de proteína.

Como foi dito anteriormente, estudos de fluorescência em proteínas amiloidogénicas têm sido bastante úteis e demonstram a importância da utilização desta técnica não só como alternativa mas, principalmente, como complemento a técnicas como o EPR, CD, FTIR e NMR, entre outras (Munishkina & Fink, 2007).

A tioflavina T e o ANS (Figura 1.10) são fluoróforos extrínsecos não-covalentes usados, normalmente, em estudos de *fold*ing de proteínas e formação de fibrilas amilóides (Hawe et al, 2008; Munishkina & Fink, 2007).



**Figura 1.10** – Estrutura química do a) ANS e da b) ThT. Adaptado de (Hawe et al, 2008).

Inicialmente, a ThT era usada como corante histoquímico de depósitos amilóides em tecidos (Vassar & Culling, 1959), no entanto, hoje é, também, usada como sonda específica em estudos *in vitro* (Hawe et al, 2008). A excitação da ThT a 350nm resulta numa emissão a 438nm, enquanto uma excitação a 440nm leva a uma emissão a 483nm (Munishkina & Fink, 2007).

Tipicamente, as fibrilas amilóides têm uma estrutura secundária sob a forma de folhas- $\beta$  cruzadas e, tem sido proposto, que a ThT interage com estruturas deste tipo, intercalando-se nas mesmas. Assim, a ligação da sonda a estas fibrilas leva a um aumento da intensidade de fluorescência emitida e induz um desvio para o azul do comprimento de onda máximo, passando de 483nm para 478nm (Hawe et al, 2008; Munishkina & Fink, 2007).

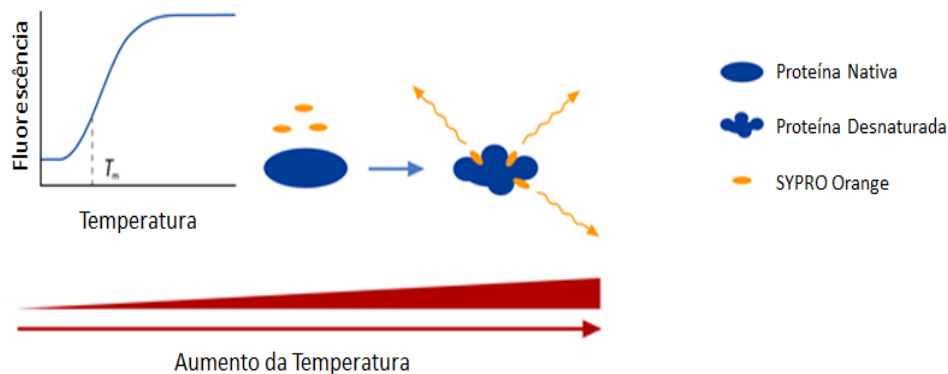
O ANS é um fluoróforo cujas propriedades espectrais e rendimento quântico de emissão são muito sensíveis à polaridade e viscosidade do meio envolvente, o que leva a que responda com um aumento da intensidade de fluorescência após interagir com regiões hidrofóbicas expostas em proteínas, designadas por *patches* hidrofóbicos (Bolognesi et al, 2010).

A interação do ANS com as regiões referidas é acompanhada de um desvio para o azul do comprimento de onda máximo de emissão, passando de 530nm para 475nm. Além disso, o rendimento quântico de emissão aumenta, até 100 vezes, após a ligação. Os estados parcialmente desnaturados e *molten globule* de uma proteína são os mais acessíveis para a ligação do ANS, o que leva a que este seja usado para detectar e caracterizar intermediários do *fold*ing proteico (Hawe et al, 2008; Munishkina & Fink, 2007).

### 1.3.3. *Differential Scanning Fluorimetry* (DSF)

A técnica de DSF consiste na utilização de fluoróforos (por exemplo, SYPRO® Orange) com afinidade para as zonas hidrofóbicas de uma proteína, que ficam expostas quando ocorre a desnaturação da mesma (Figura 1.11). O fluoróforo, também denominado de sonda, apresenta uma maior emissão de fluorescência quando ligado às regiões hidrofóbicas da proteína e uma menor emissão quando isso não se verifica. Este aumento significativo da emissão de fluorescência é

facilmente detectado, permitindo seguir a desnaturação proteica em função da temperatura (Ericsson et al, 2006; Niesen et al, 2007).



**Figura 1.11** – Esquema representativo da técnica de Differential Scanning Fluorimetry. A fluorescência do SYPRO® Orange aumenta fortemente quando este se encontra ligado a zonas hidrofóbicas expostas após a desnaturação de uma proteína. É possível estudar a estabilidade de uma proteína (por exemplo, a temperatura de desnaturação) seguindo a variação da intensidade de fluorescência à medida que se aumenta a temperatura. Adaptado de: [http://www.qiagen.com/literature/qiagennews/weeklyarticle/10\\_07/e07/default.aspx](http://www.qiagen.com/literature/qiagennews/weeklyarticle/10_07/e07/default.aspx) (consultado a 27/3/2011).

A desnaturação proteica envolve dois estados: o primeiro, no qual a proteína se encontra no seu estado nativo e o segundo, no qual a proteína está desnaturada. Entre estes dois estados existe uma zona de transição e a temperatura média dessa transição é definida como temperatura de desnaturação.

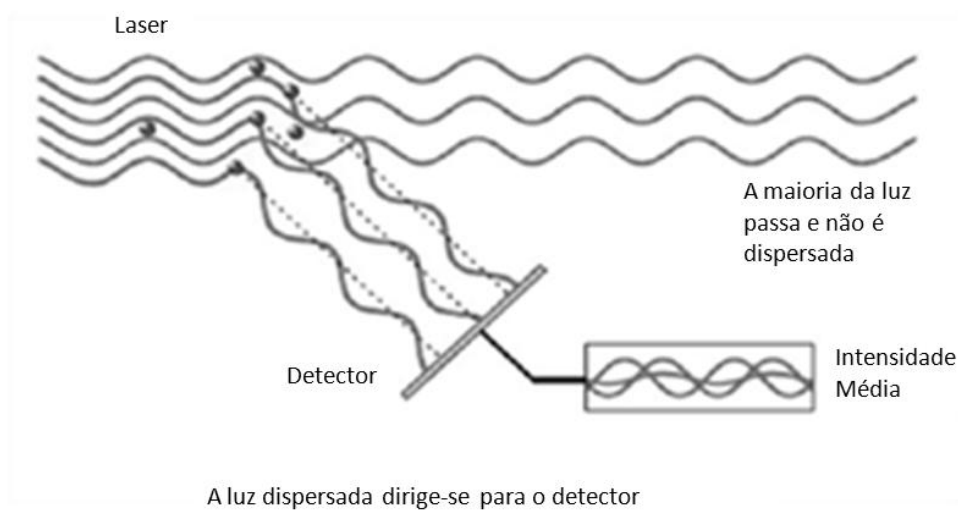
Este método, também conhecido pela designação comercial de Termofluor®, pode ser realizado num instrumento de PCR em tempo real, onde se podem obter curvas de desnaturação térmica de uma forma rápida (cerca de 1h), analisando um elevado número de amostras (placas com 96 poços) e utilizando pequenas quantidades de proteína (na ordem dos  $\mu\text{M}$ ) (Senisterra & Finerty, 2009).

#### 1.3.4. Dispersão Dinâmica de Luz (DLS)

A Dispersão Dinâmica de Luz (DLS), também conhecida por Espectroscopia de Correlação de Fótons (PCS) e por Dispersão *quasi*-elástica de Luz (QELS), é uma técnica utilizada para medir quer o tamanho, quer a distribuição de tamanhos de moléculas dispersas ou dissolvidas num líquido. É um método relativamente rápido (demora poucos minutos) e permite analisar partículas com tamanhos na região sub-micrométrica (inferior a  $1\mu\text{m}$ ) (Nobbmann et al, 2007).

Quando um feixe de luz passa através de uma solução que contém moléculas, parte da luz é dispersada (Figura 1.12), podendo ser analisada quer em termos de intensidade, quer em termos das

suas flutuações. O DLS detecta flutuações na intensidade da dispersão devido ao movimento Browniano das moléculas em solução (Nobbmann et al, 2007).



**Figura 1.12** – Esquema ilustrativo do funcionamento do DLS. Adaptado

[http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer\\_Nano\\_user\\_manual\\_Man0317-1.1.pdf](http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf) (consultado a 14/5/2011)

A intensidade de dispersão para cada espécie é proporcional ao produto da concentração pela massa molecular. Assim, agregados de grandes dimensões produzem sinais de dispersão muito fortes e a sensibilidade para estas espécies é bastante elevada (Philo, 2006).

Uma desvantagem do DLS é a sua baixa resolução. De uma forma geral, 2 espécies só podem ser resolvidas como picos separados se o seu raio diferir em pelo menos um factor 2 (correspondente a um factor de, aproximadamente, 8 na massa molecular). Assim, o DLS é uma técnica mais útil para agregados de grandes dimensões do que para pequenos oligómeros (Philo, 2006).

#### **1.4. Objectivos do trabalho realizado e plano de dissertação**

Este trabalho teve como objectivo principal contribuir para a compreensão dos mecanismos através dos quais a proteína SOD1 forma agregados amilóide, um aspecto que permanece ainda por esclarecer. Desta forma, foram estabelecidos os seguintes objectivos específicos: i) Avaliar o efeito do ião  $\text{Ca}^{2+}$  na estrutura e estabilidade da Apo-SOD1; ii) Avaliar o efeito do ião  $\text{Ca}^{2+}$  no mecanismo de amiloidogénese da Apo-SOD1; iii) Analisar o processo de formação de fibras amilóide pela proteína SOD1. Para atingir estes objectivos foram utilizadas diferentes técnicas moleculares e bioquímicas (expressão e purificação de proteínas, métodos electroforéticos e análise proteica), bem como métodos

espectroscópicos de análise estrutural (exemplos: espectroscopia de Dicroísmo Circular e espectroscopia de Fluorescência)

Esta dissertação está dividida em quatro secções: na primeira, é feita uma introdução teórica, de forma a enquadrar o tema estudado; na segunda, são apresentados os materiais e métodos usados durante a elaboração do trabalho; na terceira, são apresentados os resultados obtidos bem como uma discussão crítica sobre os mesmos; por fim, na quarta secção, são apresentadas as principais conclusões sobre o trabalho realizado e as perspectivas futuras.



## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Entidades

Este trabalho foi realizado no laboratório *Protein Biochemistry Folding and Stability* do Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa (ITQB-UNL).

### 2.2. Expressão e Purificação da SOD1

**Transformação e crescimento das células:** De forma a obter uma sobreexpressão de SOD1, incubaram-se 100  $\mu\text{L}$  de células BL21 (DE3) gold *E.coli* (GE Healthcare) com 1 $\mu\text{L}$  do plasmídeo pACA (Stanssens et al, 1989), que contém os genes da hSOD1 e do yCCS. Este plasmídeo foi, gentilmente, cedido por Mikael J. Lindberg, Umea University, Suécia. Após 30 minutos em gelo, induziu-se a entrada dos plasmídeos nas células, submetendo-as a um aquecimento a 42°C durante 45 segundos, seguido de incubação em gelo durante 5 minutos. Adicionaram-se 900 $\mu\text{L}$  de meio LB (ver anexo I) e incubou-se o inóculo a 37°C e 150rpm, durante 1h. De seguida, centrifugou-se a amostra a 13400rpm, durante 1min, tendo sido descartados 900 $\mu\text{L}$  do sobrenadante, enquanto o *pellet* foi ressuscitado. As células transformadas (i.e. *pellet* ressuscitado) cresceram, durante a noite, em placas de meio LA (ver anexo I) com Ampicilina (AmershamBiosciences), a uma concentração final de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . No dia seguinte, seleccionou-se uma colónia isolada e inoculou-se a mesma em 10 mL de meio LB com Ampicilina (AmershamBiosciences), a uma concentração final de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . O inóculo foi incubado, durante a noite, a 30°C e 150rpm. No dia seguinte, transferiram-se os 10mL de crescimento para 0,5L de meio TB (ver anexo I) com Ampicilina (AmershamBiosciences), a uma concentração final de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Este inóculo foi incubado a 24°C, 150rpm, até se obter uma Densidade Óptica (O.D.), a 600nm, entre 0,5 e 0,6. Após a obtenção do valor pretendido, induziu-se a expressão de proteínas através da adição de Isopropil-Beta-D Tiogalactopiranósido (IPTG) (Apollo Scientific), a uma concentração final de 0,5 mM, assim como  $\text{CuSO}_4$  anidro (Sigma-Aldrich) e  $\text{ZnSO}_4$  heptahidratado (AppliChem), com concentrações finais de 3mM e 30 $\mu\text{M}$ , respectivamente. Após incubação durante a noite a 24°C, 150rpm, recolheram-se as células, por centrifugação (AvantiJ-26 XPI Series, BeckmanCoulter, Rotor JA-10) a 8000rpm durante 10min.

**Disrupção celular:** O *pellet* de células obtido foi ressuscitado em tampão HEPES (AppliChem) 50mM pH 7,4 contendo 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de DNase (AppliChem), 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de RNase (Stratagene) e 0,3mM Fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) (Riedel-de Haen). As células foram lisadas utilizando uma *French Press* (ThermoElectronCorporation). O lisado celular foi centrifugado a 12.000

rpm (Avanti J-26 XPI Series, BeckmanCoulter, Rotor JA-25.50) durante 45min, sendo recolhido o sobrenadante.

**Aquecimento:** O sobrenadante obtido foi incubado a 65°C durante 30min e, de seguida, foi centrifugado a 10.000 rpm (Avanti J-26 XPI Series, BeckmanCoulter, Rotor JA-25.50) durante 45min, sendo recolhido o sobrenadante.

**Precipitação de proteínas:** Utilizou-se sulfato de amónio (Sigma-Aldrich) para efectuar uma precipitação selectiva das proteínas presentes na amostra. Assim, adicionou-se sulfato de amónio para uma concentração final de 50% e incubou-se durante 2h a 4°C, com agitação. De seguida, centrifugou-se a amostra a 10.000 rpm (Avanti J-26 XPI Series, BeckmanCoulter, Rotor JA-25.50) durante 20min e recolheu-se o sobrenadante. Adicionou-se sulfato de amónio para uma concentração final de 60% e incubou-se durante 1h a 4°C, com agitação. Posteriormente, centrifugou-se a amostra a 10.000 rpm (Avanti J-26 XPI Series, BeckmanCoulter, Rotor JA-25.50), durante 20min e recolheu-se o sobrenadante. Adicionou-se sulfato de amónio para uma concentração final de 90% e incubou-se durante 2h a 4°C, com agitação. Por fim, centrifugou-se a amostra a 10.000 rpm (Avanti J-26 XPI Series, BeckmanCoulter, Rotor JA-25.50), durante 45min e recolheu-se o *pellet*, que foi dissolvido em 40mL de tampão Tris-HCl (Sigma-Aldrich) 50mM pH 7,5.

**Cromatografia de exclusão molecular:** A solução obtida no passo anterior foi concentrada (Amicon Ultra-15, Millipore) até se obter um volume final de, aproximadamente, 4mL. A amostra foi eluída numa coluna Sephacryl S-200 HR (GE Healthcare) com tampão Tris-HCl (Sigma-Aldrich) 50mM pH 7,5 a um fluxo de 0,2 mL/min.

**Cromatografia de troca iónica:** As fracções que continham SOD1 foram reunidas numa só e a solução final foi eluída numa coluna Q Sepharose Fast-Flow (GE Healthcare). Foi utilizado tampão Tris-HCl (Sigma-Aldrich) 10mM pH 7,5, a um fluxo de 2mL/min e um gradiente de NaCl de 0M até 1M. As fracções que continham SOD1 eluíram a, aproximadamente, 140mM de NaCl.

### 2.3. Avaliação da pureza e integridade da SOD1

De forma a avaliar a pureza e integridade da SOD1 purificada, foram utilizadas, de forma sequencial, as seguintes técnicas: SDS-PAGE, espectroscopia UV-Visível, espectroscopia de CD e ensaio de actividade enzimática.

**SDS-PAGE:** As amostras obtidas após a cromatografia de troca iónica foram diluídas 1:1 em tampão de amostra (ver anexo II), fervidas durante 10min e aplicadas num gel com 12%

acrilamida:bisacrilamida (Bio-Rad) (ver anexo III). Foi utilizada uma voltagem constante de 200V. O gel foi corado com azul de Coomassie (USB Corporation) e descorado com uma solução aquosa de ácido acético (5%) e metanol (10%).

**Espectroscopia UV-Visível:** As amostras seleccionadas após a cromatografia de troca iónica e a análise dos géis obtidos foram colocadas numa *cuvette* de quartzo de 1cm, e foram traçados espectros (Espectrofotómetro UV-1700 PharmaSpecShimadzu) entre os comprimentos de onda 250 e 800nm. Foram, também, realizadas diluições dessas amostras e traçados os respectivos espectros, cobrindo os mesmos comprimentos de onda.

**Espectroscopia de Dicroísmo Circular:** As amostras seleccionadas após as técnicas anteriores foram colocadas numa *cuvette* de quartzo de 0,1cm, a uma concentração final de 30 $\mu$ M, e foram traçados espectros de 190 a 260nm (JASCO J-815 Spectrometer). Todos os espectros foram realizados utilizando os seguintes parâmetros: 2nm de largura de banda, 200nm/min de velocidade (em modo contínuo), 1s de tempo de resposta e uma média de 7 acumulações. As rampas de temperatura foram realizadas utilizando os seguintes parâmetros: comprimento de onda: 230nm, aumento de temperatura de 25 a 98°C a uma taxa de 1°C/min, sensibilidade de 100mdeg, 2nm de largura de banda e 1s de tempo de resposta.

**Ensaio de actividade enzimática:** De forma a calcular a actividade enzimática das amostras seleccionadas após a cromatografia de troca iónica, foi utilizado o método baseado na xantina oxidase e citocromo c (McCord & Fridovich, 1969). Inicialmente, foram adicionados a uma *cuvette* de 1cm, com agitação, tampão fosfato de sódio (50mM, Sigma-Aldrich) com 100  $\mu$ M EDTA (Sigma-Aldrich), Citocromo c isolado de coração de bovino (10 $\mu$ M, Sigma-Aldrich) e xantina (50 $\mu$ M, Sigma-Aldrich). Após total homogeneização, foi adicionada xantina oxidase (Sigma-Aldrich) e seguiu-se a formação de Citocromo c, na forma reduzida, a 550nm. É de referir que a quantidade de xantina oxidase (Sigma-Aldrich) adicionada foi a necessária para obter uma taxa de formação de 0,0025 $\Delta$ Abs/min. Após estabilização da taxa de formação de citocromo c reduzido, foi adicionado um determinado volume de amostra de SOD1 (variável consoante a amostra).

## 2.4. Obtenção do estado Apo da SOD1

Colocou-se a solução de proteína numa membrana de diálise com poro inferior a 10.000M WCO e, de seguida, colocou-se a membrana em tampão Acetato de Sódio (Sigma-Aldrich) 50mM pH 3,8 com 10mM EDTA (Sigma-Aldrich), sob agitação e a 4°C. Trocou-se a solução tampão a cada 24 horas, num total de 72 horas. Passou-se a membrana de diálise para tampão Acetato de Sódio (Sigma-Aldrich) 50mM pH 3,8, com 100mM Cloreto de Sódio. Trocou-se a solução tampão a cada 24 horas,

num total de 48 horas. Por fim, colocou-se a membrana de diálise em tampão Tris-HCl 10mM pH 7,5. Todos os tampões utilizados neste processo foram elaborados com água eluída numa coluna Chelex100 (BioRad), com, aproximadamente, 50mL de resina, de forma a remover os iões metálicos presentes em solução.

## 2.5. Titulação da Apo-SOD1 com ião $\text{Ca}^{2+}$ no equilíbrio

### 2.5.1. Efeitos ao nível da estrutura secundária

A estrutura secundária da proteína foi analisada através de espectroscopia de CD (JASCO J-815 Spectrometer equipado com um controlador de temperatura - JASCO CDF-426S/15). Foi utilizada uma *cuvette* de quartzo de 0,1cm e foram realizados espectros de 190 a 260nm. Todos os espectros foram realizados utilizando os seguintes parâmetros: 2nm de largura de banda, 200 nm/min de velocidade (em modo contínuo), 1s de tempo de resposta e uma média de 7 acumulações.

A Apo-SOD1, a uma concentração final de 30 $\mu\text{M}$ , foi incubada durante a noite (37°C, com agitação) com concentrações crescentes de  $\text{CaCl}_2$ , de acordo com a tabela 2.1. Foram realizados espectros de CD de todas as amostras após 16h de incubação.

**Tabela 2.1** – Conteúdo das amostras utilizadas para estudar a influência do ião  $\text{Ca}^{2+}$  na estrutura secundária da Apo-SOD1, através de Espectroscopia de Dicroísmo Circular.

Amostra	Concentração de Proteína ( $\mu\text{M}$ )	Concentração de $\text{Ca}^{2+}$ ( $\mu\text{M}$ )	Razão Ião/Proteína
1	30	0	0
2		6	0,2
3		15	0,5
4		24	0,8
5		30	1
6		36	1,2
7		42	1,4
8		48	1,6
9		54	1,8
10		60	2
11		75	2,5
12		90	3

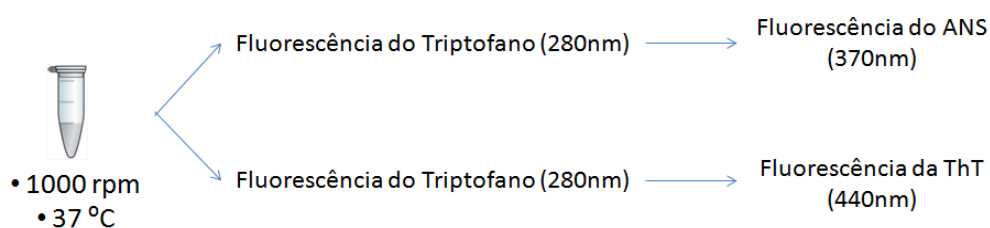
## 2.5.2. Efeitos ao nível da estrutura terciária e centro hidrofóbico

A estrutura terciária da proteína foi analisada através de espectroscopia de Fluorescência (Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer, Varian®). Foi usada uma *cuvette* de quartzo de 1cm e os comprimentos de onda utilizados estão presentes na tabela 2.2. Todos os espectros foram realizados utilizando os seguintes parâmetros: abertura do feixe de excitação: 5nm, abertura do feixe de emissão: 10nm, 600 nm/min de velocidade (em modo contínuo), 600V, 25°C.

**Tabela 2.2** – Fluoróforos utilizados e respectivos comprimentos de onda de excitação e emissão.

Fluoróforo	$\lambda_{\text{excitação}}$ (nm)	Gama de $\lambda_{\text{emissão}}$ (nm)
<b>Triptofano</b>	280	300-500
<b>ANS</b>	370	400-600
<b>ThT</b>	440	455-555

Para este estudo, foram utilizadas as amostras mencionadas no ponto 2.5.1 (Apo-SOD1 incubada com  $\text{Ca}^{2+}$ , durante a noite, a 37°C, com agitação). Após a incubação, retiraram-se 40 $\mu\text{L}$  de cada amostra para diferentes *ependorfs* e diluiu-se para 250 $\mu\text{L}$  (concentração final de proteína de, aproximadamente, 5 $\mu\text{M}$ ). Com estas amostras, foram efectuados espectros baseados na fluorescência do triptofano e, de seguida, adicionou-se o fluoróforo ANS (numa proporção de 5x) (Figura 2.1) e realizaram-se os respectivos espectros.



**Figura 2.1** – Esquema representativo dos ensaios realizados utilizando espectroscopia de fluorescência.

A estrutura terciária da proteína foi, também, analisada através da técnica de *Differential Scanning Fluorimetry*. A Apo-SOD1, a uma concentração de 6 $\mu\text{M}$ , foi incubada (37°C, com agitação) com concentrações crescentes de  $\text{CaCl}_2$  (Tabela 2.3), durante a noite. A 18 $\mu\text{L}$  de cada amostra foram adicionados 2 $\mu\text{L}$  da sonda SYPRO® Orange (proporção final de 10x) e as soluções resultantes foram colocadas numa placa de PCR de 96 poços. Obtiveram-se valores de emissão de fluorescência da sonda a cada minuto, num total de uma hora, a uma temperatura constante de 37°C.

**Tabela 2.3** – Conteúdo das amostras utilizadas para estudar a influência do íon  $\text{Ca}^{2+}$  na estrutura terciária da Apo-SOD1, através de *Differential Scanning Fluorimetry*.

Amostra	Concentração de Proteína ( $\mu\text{M}$ )	Concentração de $\text{Ca}^{2+}$ ( $\mu\text{M}$ )	Razão Íon/Proteína
1	6	0	0
2		1,8	0,3
3		3	0,5
4		4,8	0,8
5		6	1
6		7,8	1,3
7		9	1,5
8		10,8	1,8
9		12	2
10		24	4
11		36	6
12		48	8

### 2.5.3. Efeitos ao nível da estrutura quaternária e agregação

A Apo-SOD1, a uma concentração final de  $30\mu\text{M}$ , foi incubada ( $37^\circ\text{C}$ , com agitação) com diferentes concentrações de  $\text{CaCl}_2$ , segundo a tabela 2.4. Após 24h de incubação, as amostras foram diluídas 1:1 em tampão de amostra (ver anexo II) e aplicadas num gel nativo com 12% acrilamida:bisacrilamida (Bio-Rad) (ver anexo III). Foi utilizada uma voltagem constante de 100V. O gel foi corado com azul de Coomassie (USB Corporation) e descorado com uma solução aquosa de ácido acético (5%) e metanol (10%).

No que diz respeito ao estudo da agregação da Apo-SOD1, foram utilizadas as amostras mencionadas no ponto 2.5.1 (Apo-SOD1 incubada com  $\text{Ca}^{2+}$ , durante a noite, a  $37^\circ\text{C}$ , com agitação). Após a incubação, retiraram-se  $40\mu\text{L}$  de cada amostra para diferentes *eppendorfs* e diluiu-se para  $250\mu\text{L}$  (concentração final de proteína de, aproximadamente,  $5\mu\text{M}$ ). Com estas amostras, foram efectuados espectros baseados na fluorescência do triptofano e, de seguida, adicionou-se o fluoróforo ThT (numa proporção de 10x) (Figura 2.1) e realizaram-se os respectivos espectros.

**Tabela 2.4** – Conteúdo das amostras utilizadas para estudar a influência do íon  $\text{Ca}^{2+}$  na estrutura quaternária da Apo-SOD1 através de um gel Native-PAGE.

Amostra	Concentração de Proteína ( $\mu\text{M}$ )	Concentração de $\text{Ca}^{2+}$ ( $\mu\text{M}$ )	Razão $\text{Ca}^{2+}$ /Proteína
1	30	0	0
2		15	0,5
3		30	1
4		45	1,5
5		60	2
6		120	4
7		180	6
8		240	8

Foi, também, utilizada a técnica de DLS para avaliar a influência do íon  $\text{Ca}^{2+}$  na formação de agregados da proteína Apo-SOD1. Foi usada uma *cuvette* de quartzo de baixo-volume, própria para medições de tamanho e massa molecular de proteínas (Malvern Instruments) e todas as medições (Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments) foram realizadas utilizando os seguintes parâmetros: substância dispersante: água; número de medições em cada ensaio: 8; número de aquisições em cada medição: 12; temperatura: 25°C.

Filtraram-se 500 $\mu\text{L}$  da amostra numa seringa estéril, através de um filtro de nylon de 0,45 $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro. Após a homogeneização da solução, transferiu-se lentamente a amostra para a *cuvette* indicada.

Inicialmente, foi feita a medição da amostra de Apo-SOD1, a uma concentração de 70 $\mu\text{M}$ . De seguida, foram adicionados volumes crescentes de  $\text{CaCl}_2$ , até à razão de 4Ca:1Apo-SOD1, e efectuados os respectivos espectros.

## 2.6. A influência do Íon $\text{Ca}^{2+}$ na estabilidade térmica e química da Apo-SOD1

Com as amostras 1, 5, 10 e 12 do ponto 2.5.1, foram efectuados estudos de estabilidade térmica e determinação das temperaturas de desnaturação, através de Espectroscopia de dicroísmo circular. As rampas de temperatura foram realizadas utilizando os seguintes parâmetros: comprimento de onda de 230nm, aumento de temperatura de 25 a 98°C a uma taxa de 1°C/min, sensibilidade de 100mdeg, 2nm de largura de banda e 1s de tempo de resposta.

Foram, também, efectuados estudos de estabilidade térmica e determinação das temperaturas de desnaturação, através do método de *Differential Scanning Fluorimetry*. As amostras utilizadas foram preparadas de acordo com a tabela 2.5. A 18 $\mu\text{L}$  de cada amostra foram adicionados 2 $\mu\text{L}$  da

sonda SYPRO® Orange (proporção final de 10x) e as soluções finais foram colocadas numa placa de PCR de 96 poços.

**Tabela 2.5** – Conteúdo das amostras utilizadas para estudar a influência do íon  $\text{Ca}^{2+}$  na estabilidade térmica da Apo-SOD1, através de *Differential Scanning Fluorimetry*.

Amostra	Concentração de Proteína ( $\mu\text{M}$ )	Concentração de íon $\text{Ca}^{2+}$ ( $\mu\text{M}$ )	Razão Íon/Proteína
1	6	0	0
2		12	2
3		24	4
4		48	8
5		72	12
6		96	16

A intensidade de fluorescência foi gerada em função da temperatura, obtendo-se uma curva sigmoidal. A partir do ponto de inflexão da curva, foi possível estimar a temperatura à qual 50% das moléculas de proteína se encontram na forma desnaturada ( $T_m$ ).

A estabilidade química da Apo-SOD1 incubada com diferentes concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  foi analisada através de espectroscopia de fluorescência (Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer, Varian®). Foi usada uma *cuvette* de quartzo de 1cm e mediu-se a intensidade de fluorescência do resíduo de triptofano da SOD1 (Tabela 2.2). Todos os espectros foram realizados utilizando os seguintes parâmetros: abertura do feixe de excitação: 5nm, abertura do feixe de emissão: 10nm, 600nm/min de velocidade (em modo contínuo), 600V, 25°C.

A Apo-SOD1, a uma concentração final de 30 $\mu\text{M}$ , foi incubada (37°C, com agitação) com e sem  $\text{CaCl}_2$ , de acordo com a tabela 2.6. Após 16h de incubação, adicionou-se Cloreto de Guanidínio, a diferentes concentrações, e incubou-se durante 2h à temperatura ambiente, sem agitação. De seguida, diluiu-se a amostra até se obter uma concentração de proteína de, aproximadamente, 5  $\mu\text{M}$  e traçaram-se os respectivos espectros.

**Tabela 2.6** – Conteúdo das amostras utilizadas para estudar a influência do íon  $\text{Ca}^{2+}$  na estabilidade química da Apo-SOD1, através de Espectroscopia de Fluorescência.

Amostra	Concentração de Proteína ( $\mu\text{M}$ )	Concentração de $\text{Ca}^{2+}$ ( $\mu\text{M}$ )	Concentração de Cloreto de Guanidínio (M)
1	30	0	0
2			0,2
3			0,4
4			0,6
5			0,8
6			1
7			1,2
8			1,4
9			1,6
10			1,8
11			2
12			2,5
13			3
14		60	0
15			0,2
16			0,4
17			0,6
18			0,8
19			1
20			1,2
21			1,4
22			1,6
23			1,8
24			2
25			2,5
26			3

## 2.7. Avaliação da interferência do íon $\text{Ca}^{2+}$ na afinidade entre a Apo-SOD1 e o íon $\text{Zn}^{2+}$

De forma análoga à indicada no ponto 2.5.1, a Apo-SOD1, a uma concentração final de  $30\mu\text{M}$ , foi incubada durante a noite ( $37^\circ\text{C}$ , com agitação) com concentrações crescentes de  $\text{ZnCl}_2$ , segundo a tabela 2.7. Foram realizados espectros de CD de todas as amostras após 16h de incubação.

**Tabela 2.7** – Conteúdo das amostras utilizadas para estudar a interferência do íon  $\text{Ca}^{2+}$  na afinidade entre a Apo-SOD1 e íon  $\text{Zn}^{2+}$ , através de Espectroscopia de Dicroísmo Circular.

Amostra	Concentração de Proteína ( $\mu\text{M}$ )	Concentração de $\text{Zn}^{2+}$ ( $\mu\text{M}$ )	Razão Íon/Proteína
1	30	0	0
2		6	0,2
3		15	0,5
4		24	0,8
5		30	1
6		36	1,2
7		42	1,4
8		48	1,6
9		54	1,8
10		60	2
11		75	2,5
12		90	3

A Apo-SOD1, à mesma concentração, foi, também, incubada durante a noite ( $37^\circ\text{C}$ , com agitação) com concentrações crescentes de  $\text{CaCl}_2$ , segundo a tabela 2.7. Após a incubação, foram adicionados iguais volumes de  $\text{ZnCl}_2$  e incubou-se, novamente, durante 24 horas nas mesmas condições. Por fim, foram realizados espectros de CD de todas as amostras.

Com a amostra 12, foi efectuado o estudo de estabilidade térmica e determinação da temperatura de desnaturação, através de Espectroscopia de dicroísmo circular. A rampa de temperatura foi realizada utilizando os seguintes parâmetros: comprimento de onda:  $230\text{nm}$ , aumento de temperatura de  $25$  a  $98^\circ\text{C}$  a uma taxa de  $1^\circ\text{C}/\text{min}$ , sensibilidade de  $100\text{mdeg}$ ,  $2\text{nm}$  de largura de banda e  $1\text{s}$  de tempo de resposta.

## 2.8. O papel do TCEP na monomerização e consequente agregação da Apo-SOD1

A influência do agente redutor TCEP na estrutura quaternária da Apo-SOD1 foi estudada através de um método baseado no AMS (Chattopadhyay et al, 2008). Este agente modificador de grupos tiol, com cerca de 500Da de tamanho, liga-se a grupos -SH livres nos resíduos de cisteína. Desta forma, é possível perceber se as ligações per-sulfureto estão intactas (S-S), impedindo a ligação do AMS, ou se estão quebradas (2 SH), permitindo a ligação do AMS e consequente aumento do tamanho da proteína.

A Apo-SOD1, a uma concentração final de 45 $\mu$ M, foi incubada durante 24h (37°C, com agitação) com concentrações crescentes de TCEP e 2,5% de SDS, de acordo com a tabela 2.8. Após a incubação, foi adicionado AMS a uma concentração final de 10mM e procedeu-se a nova incubação, durante 1h, nas mesmas condições. Foram preparadas amostras iguais às anteriores mas sem 24h de incubação. De seguida, as amostras foram diluídas 1:1 em tampão de amostra nativo (ver anexo II) e, sem serem fervidas, foram aplicadas num gel SDS-PAGE com 12% acrilamida:bisacrilamida (Bio-Rad) (ver anexo III). Foi utilizada uma voltagem constante de 150V. O gel obtido foi corado com azul de Coomassie (USB Corporation) e descorado com uma solução aquosa de ácido acético (5%) e metanol (10%).

**Tabela 2.8** – Conteúdo das amostras utilizadas para estudar a influência do agente redutor TCEP na estrutura quaternária da Apo-SOD1.

Amostra	Concentração de Proteína ( $\mu$ M)	Concentração de TCEP (mM)	Concentração de SDS (%)
1	45	0	2,5
2		2	
3		4	
4		10	

A influência do agente redutor TCEP na estrutura terciária da Apo-SOD1 foi estudada através de espectroscopia de Fluorescência (Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer, Varian®). A Apo-SOD1, a uma concentração final de 30 $\mu$ M, foi incubada durante 24 horas (37°C, com agitação) com concentrações crescentes de TCEP, de acordo com a tabela 2.9. Após a incubação e a respectiva diluição da amostra (concentração final de proteína de, aproximadamente, 5 $\mu$ M), adicionou-se a ThT (2,5x) e realizaram-se os respectivos espectros de fluorescência.

Todos os espectros foram realizados utilizando os seguintes parâmetros: abertura do feixe de excitação: 5nm, abertura do feixe de emissão: 10nm, 600 nm/min de velocidade (em modo contínuo), 600V, 25°C.

**Tabela 2.9** – Conteúdo das amostras utilizadas para estudar a influência do agente redutor TCEP na estrutura terciária da Apo-SOD1.

Amostra	Concentração de Proteína ( $\mu\text{M}$ )	Concentração de TCEP (mM)
1	30	0
2		1
3		2
4		3
5		4
6		5

### 2.9. Ião $\text{Ca}^{2+}$ como potenciador da agregação da Apo-SOD1

De forma idêntica à indicada no ponto 2.5.2, a Apo-SOD1, a uma concentração de  $30\mu\text{M}$ , foi incubada ( $37^\circ\text{C}$ , com agitação) com concentrações crescentes de  $\text{CaCl}_2$ , na presença de  $2\text{mM}$  de TCEP, segundo a tabela 2.11. Após 24 horas de incubação, retiraram-se  $2 \times 40\mu\text{L}$  de cada amostra para diferentes *ependorfs* e diluiu-se para  $250\mu\text{L}$  (concentração final de proteína de, aproximadamente,  $5\mu\text{M}$ ). De seguida, adicionaram-se os fluoróforos ANS (5x) e ThT (2,5x) e realizaram-se os respectivos espectros de fluorescência (figura 2.1).

**Tabela 2.10** – Conteúdo das amostras utilizadas para estudar a influência do ião  $\text{Ca}^{2+}$  na estrutura terciária da Apo-SOD1, através de Espectroscopia de Fluorescência.

Amostra	Concentração de Proteína ( $\mu\text{M}$ )	Concentração de ião $\text{Ca}^{2+}$ ( $\mu\text{M}$ )	Concentração de TCEP (mM)	Razão Ião/Proteína
1	30	0	2	0
2		6		0,2
3		15		0,5
4		24		0,8
5		30		1
6		36		1,2
7		45		1,5
8		54		1,8
9		60		2
10		75		2,5
11		90		3

A formação de fibrilas amilóides pela Apo-SOD1 foi avaliada através do estudo da cinética de ligação da ThT. Foi usada uma *cuvette* de quartzo de 1cm, com agitação, e os comprimentos de onda utilizados foram 440nm para a excitação da ThT e 490nm para a emissão. Todos os espectros foram realizados utilizando os seguintes parâmetros: abertura do feixe de excitação: 5, abertura do feixe de emissão: 5, 2nm de largura de banda, 1s de tempo de resposta, 600V, 37°C.

Em cada um dos ensaios, e para um volume final de 800µL, adicionou-se: 20µM de Apo-SOD1, diferentes concentrações de CaCl<sub>2</sub> (originando diferentes razões Cálcio:Proteína), 2mM TCEP e 50µM ThT (2,5x a concentração de proteína). Registaram-se os valores de intensidade de fluorescência a 490nm a cada 10min durante 2000min.

**Tabela 2.11** – Conteúdo das amostras utilizadas para estudar a influência de do íon Ca<sup>2+</sup> na estrutura terciária da Apo-SOD1, através de Espectroscopia de Fluorescência (Estudo da cinética de ligação da ThT).

<b>Amostra</b>	<b>Concentração de Proteína (µM)</b>	<b>Concentração de íon Ca<sup>2+</sup> (µM)</b>	<b>Concentração de TCEP (mM)</b>	<b>Razão Íon/Proteína</b>
<b>1</b>	20	0	2,5	0
<b>2</b>		40		2



### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Expressão e Purificação da SOD1

Actualmente, a comunidade científica parece estar de acordo em relação à ideia de que a ELA mediada por SOD1 é uma doença de *misfolding* de proteína, na qual esta adquire uma função tóxica (Furukawa & O'Halloran, 2006). Assim, a regulação intracelular da estabilidade da SOD1 será um factor importante no mecanismo molecular desta patologia.

De forma a proceder à análise da estrutura e estabilidade da SOD1 e respectiva interacção com iões metálicos, nomeadamente  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ , foi necessário expressar e purificar a mesma.

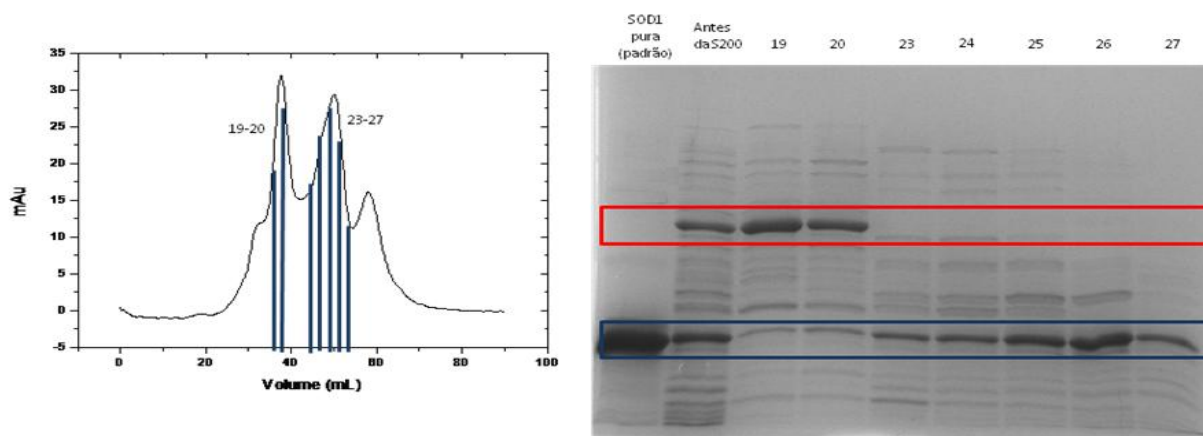
Assim, procedeu-se à transformação das células BL21 (DE3) *E. coli* com o plasmídeo pACA. Este plasmídeo foi construído de forma a conter quer o gene que codifica para a SOD1, quer o gene que codifica para o chaperão de levedura para o cobre ( $\gamma\text{CCS}$ ). Assim, é possível obter um nível de expressão de SOD1 mais elevado, bem como uma incorporação de ião  $\text{Cu}^{2+}$  com melhor rendimento (Stanssens et al, 1989). Após o subsequente crescimento em meio de cultura optimizado, as células foram lisadas com recurso a uma *French Press*.

Uma das características da SOD1 é a sua elevada estabilidade térmica. Tirando partido dessa característica, incubou-se o extracto solúvel a 65°C durante 30 minutos. Desta forma foi possível remover grande parte das proteínas contaminantes de *E.coli*, bem como enzimas proteolíticas e parte do  $\gamma\text{CCS}$ . Efectuou-se, ainda, uma precipitação selectiva de proteínas com várias concentrações de sulfato de amónio. A amostra obtida após o processo anterior foi eluída numa coluna Sephacryl S-200 HR (cromatografia de exclusão molecular) tendo sido obtido o cromatograma apresentado na figura 3.1. Analisando o gel SDS-PAGE correspondente às fracções eluídas, é possível comprovar a sobreexpressão da SOD1 e do  $\gamma\text{CCS}$ , uma vez que, no poço correspondente à amostra inicial, injectada na coluna, as bandas correspondentes a estas proteínas têm uma intensidade bastante superior à das restantes. Além disso, é possível detectar a presença de dois picos principais: no primeiro (fracções 19 e 20) elui, principalmente, o CSS, entre outros contaminantes; no segundo pico (fracções 23 a 27) elui a SOD1, juntamente com outras proteínas. Uma vez que a coluna utilizada tem um intervalo de fraccionamento de 5 a 250 kDa, e que a SOD1, sob a forma de dímero, tem cerca de 32 kDa, o facto de o CCS eluir, ligeiramente, antes da SOD1 estará relacionado com a possível complexação entre as duas moléculas (Lamb et al, 2000), dando origem a um oligómero de dimensões superiores às da SOD1. Desta forma, foi possível eliminar o principal contaminante da amostra.

É importante realçar que as fracções finais do segundo pico (25 a 27) possuem uma maior quantidade de SOD1 e uma menor quantidade de contaminantes, sendo por isso agrupadas numa só.

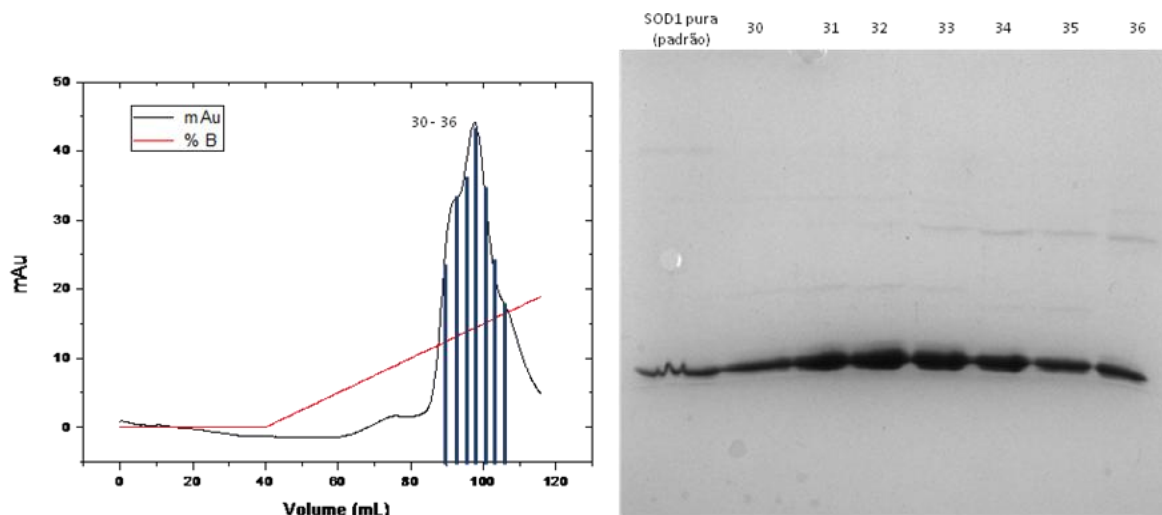
A solução obtida no passo anterior foi, de seguida, eluída numa coluna Q-Sepharose Fast-Flow (cromatografia de troca iónica), tendo sido obtido o cromatograma e respectivo gel SDS-PAGE

presentes na figura 3.2. É possível verificar que não existe qualquer pico de absorvância durante a passagem dos 40mL de tampão A (Tris-HCl 10mM pH 7,5). Após o início do gradiente de NaCl, detecta-se a presença de um pico principal, correspondente a uma concentração de 140mM de NaCl (14%). Neste pico, as fracções 30 a 33 continham SOD1 pura e, por isso, foram agrupadas numa só, ao passo que as fracções 34 a 36 foram descartadas, por apresentarem alguns contaminantes.



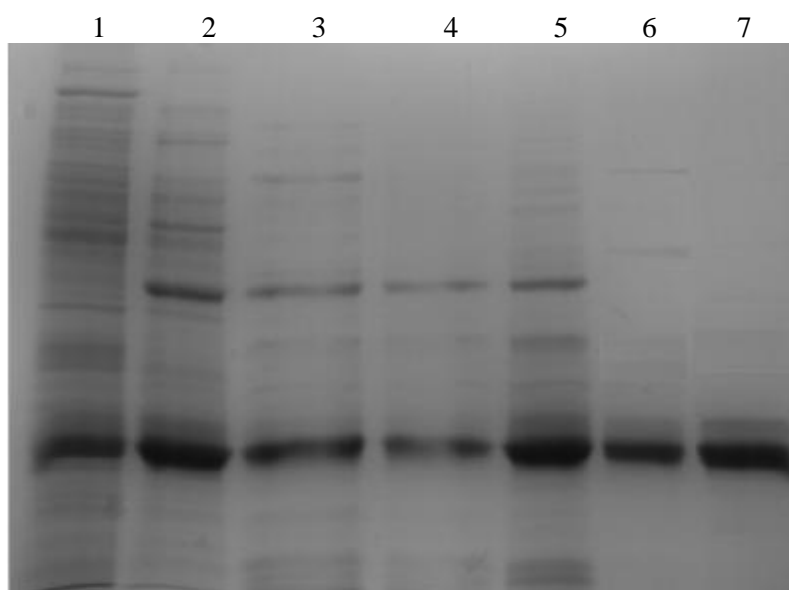
**Figura 3.1** – Cromatograma referente à cromatografia de Filtração em gel (Coluna Sephacryl S-200 HR) e respectivo gel SDS-PAGE. As fracções 19 e 20 (indicadas com linhas azuis) correspondem ao primeiro pico obtido, enquanto as fracções 23 a 27 (indicadas com linhas azuis) correspondem ao segundo. O rectângulo vermelho realça a presença do yCCS (27kDa) e o rectângulo azul realça a presença da SOD1 na forma de monómero (16kDa).

A SOD1 pura eluiu a 140mM de NaCl, o que está de acordo com a informação da literatura, que indica valores na ordem dos 125mM (Ahl et al, 2004)



**Figura 3.2** – Cromatograma referente à cromatografia de troca iónica (Coluna Q-Sepharose *Fast-Flow*) e respectivo gel SDS-PAGE. As fracções 30 a 36 (indicadas com linhas azuis) correspondem ao pico obtido durante o gradiente de NaCl.

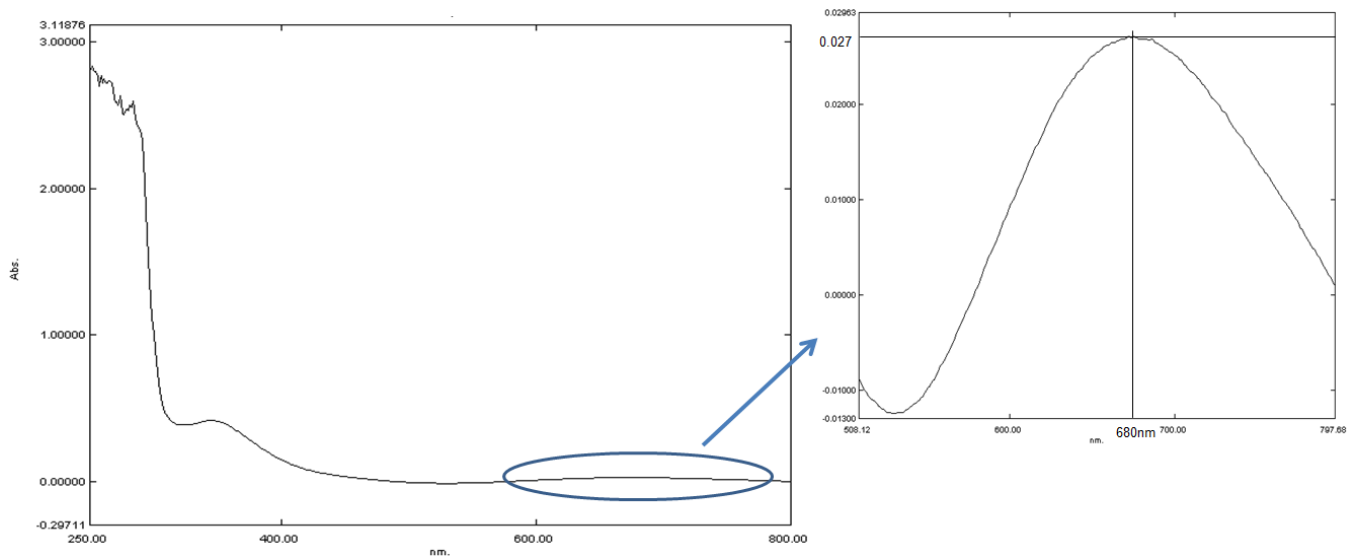
Após a purificação da SOD1, efectuou-se um gel SDS-PAGE no qual foram aplicadas amostras referentes aos diferentes passos do processo (Figura 3.3). Analisando o gel obtido, é possível constatar que o número de bandas em cada poço vai diminuindo à medida que se avança no processo, o que significa que vão sendo eliminados os contaminantes da amostra. Tal como foi dito anteriormente, o principal contaminante da amostra ( $\gamma$ CCS) é eliminado durante a cromatografia de exclusão molecular. Após a cromatografia de troca iónica (poço 7) surge apenas uma banda, o que indica que foi obtida SOD1 pura.



**Figura 3.3** – Gel SDS-PAGE referente ao processo de purificação da SOD1. 1- Sobrenadante após *French Press*; 2- Sobrenadante após aquecimento a 65°C; 3- Sobrenadante após 50% de sulfato de amónio; 4- Sobrenadante após 60% de sulfato de amónio; 5- Antes da cromatografia de filtração em gel; 6- Antes da cromatografia de troca iónica; 7- Final da purificação.

Com o intuito de avaliar a pureza e integridade da SOD1 purificada, foram utilizadas as seguintes técnicas: espectroscopia UV-Visível, espectroscopia de Dicroísmo Circular e ensaio de actividade enzimática.

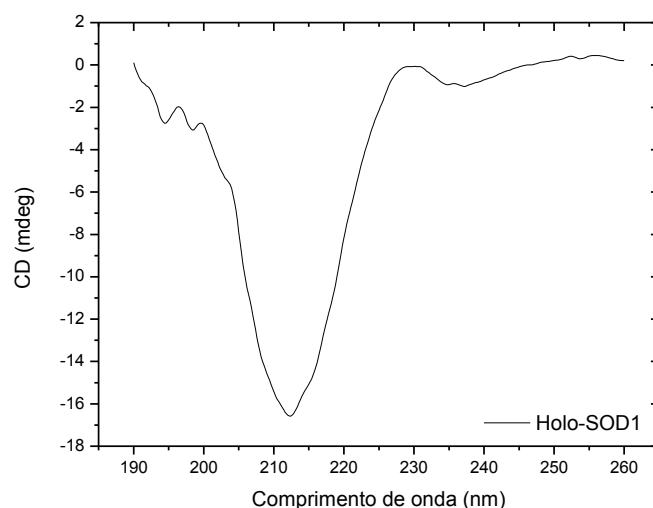
Na figura 3.4 é apresentado o espectro UV-Visível da proteína purificada. Devido à elevada concentração da amostra, o sinal a 280nm encontra-se saturado, impedindo o cálculo da concentração de proteína. Para ultrapassar esta questão, foi efectuada uma diluição da amostra e, de seguida, o respectivo espectro, que permitiu calcular o valor de concentração da solução de proteína. A zona ampliada (500 a 800nm) permite observar um pequeno aumento de absorvância a 680nm, que é o comprimento de onda de absorção característico do centro metálico da SOD1 ligado ao ião  $\text{Cu}^{2+}$  (Ahl et al, 2004). Assim, é possível afirmar que a proteína purificada estava, pelo menos, parcialmente metalada, uma vez que se detectou a presença do ião  $\text{Cu}^{2+}$  (Phillips et al, 1984). No que toca ao ião  $\text{Zn}^{2+}$ , esta técnica não permite detectar a sua presença.



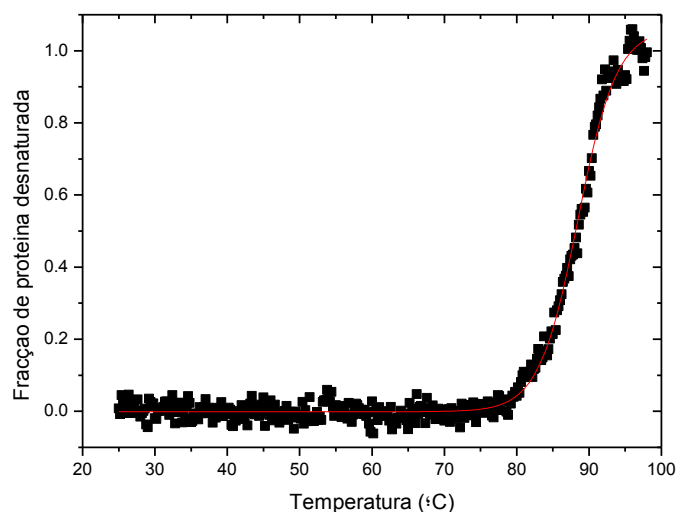
**Figura 3.4** – Espectro UV-Visível da SOD1 obtida após purificação. Devido à elevada concentração da amostra, o sinal a 280nm encontra-se saturado. A zona ampliada permite observar um pequeno aumento de absorvância a 680nm, devido à presença do ião  $\text{Cu}^{2+}$ .

Efectuou-se o espectro de dicroísmo circular de UV-longínquo, presente na figura 3.5. Tal como seria de esperar, obteve-se um espectro em forma de “v”, com um único mínimo, situado próximo dos 214nm, que é característico de proteínas com estrutura secundária em folha- $\beta$  (Ranjbar & Gill, 2009). Além disso, é possível detectar, na zona dos 230nm, a presença de um “ombro”, que é característico da forma Holo da SOD1, isto é, da forma com metais incorporados (Potter et al, 2007). Esta informação vem juntar-se à informação obtida com a técnica anterior, uma vez que indica a presença do ião metálico  $\text{Zn}^{2+}$ .

Uma das características da Holo-SOD1 no seu estado nativo é apresentar uma elevada estabilidade térmica, descrita na literatura com uma  $T_m$  de, aproximadamente, 90°C (Furukawa & O'Halloran, 2006). Assim, efectuou-se uma rampa de temperatura, na qual se mediu o sinal de dicroísmo circular a 230nm à medida que se aumentava a temperatura, a uma taxa de 1°C/min. O resultado obtido foi, de seguida, convertido num gráfico de “fracção de proteína desnaturada” em função da temperatura, para facilitar a análise do mesmo (Figura 3.6). Aplicando um ajuste sigmoidal aos dados obtidos, obteve-se um valor de  $T_m$  de 88,5°C. Este valor está bastante próximo do valor descrito na literatura, mencionado anteriormente.

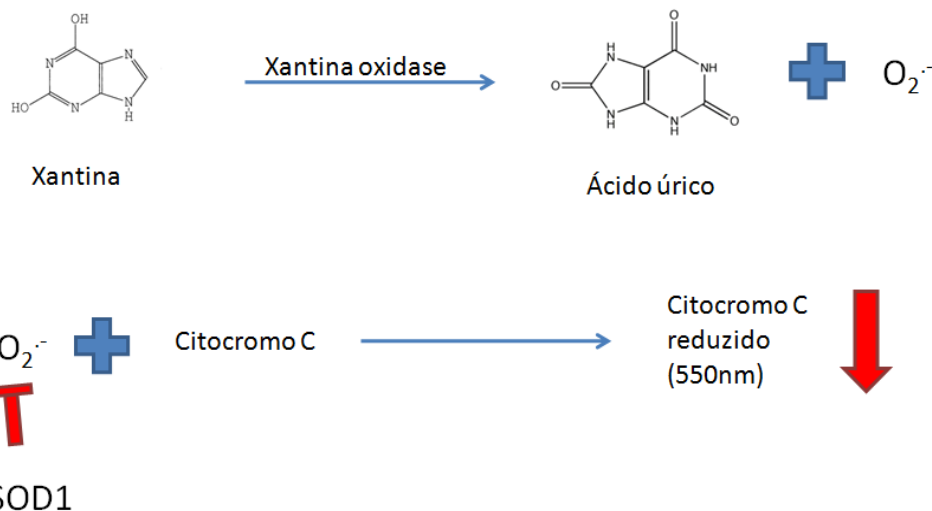


**Figura 3.5** – Espectro de Dicroísmo Circular da SOD1 obtida após purificação. É possível observar, na zona dos 230nm, a presença de um “ombro”, que é característico da forma Holo da SOD1.



**Figura 3.6** – Rampa de temperatura referente à SOD1 obtida após purificação. Mediu-se o sinal de Dicroísmo Circular a 230nm à medida que se aumentava a temperatura, a uma taxa de 1°C/min. A linha vermelha corresponde ao ajuste sigmoidal efectuado para calcular a temperatura de desnaturação ( $T_m = 88,5^\circ\text{C}$ ).

Para concluir a análise à pureza e à integridade dos centros metálicos necessários à actividade enzimática da SOD1 purificada, efectuou-se um ensaio de actividade enzimática baseado no citocromo c e na xantina oxidase (McCord & Fridovich, 1969) (Figura 3.7). Sabendo que, neste caso, uma unidade enzimática (1U) é a quantidade de SOD1 necessária para diminuir, em 50%, a formação de citocromo c reduzido, foi obtido um valor de actividade específica de 5851,6 U/mg. Este valor é bastante aceitável, uma vez que a SOD1 comercial purificada a partir de eritrócitos humanos apresenta valores de actividade específica entre os 2500 e os 6000 U/mg (Sigma-Aldrich).



**Figura 3.7** – Esquema representativo do ensaio de actividade enzimática realizado com a SOD1 após purificação. Inicialmente, a xantina é transformada em ácido úrico e radical superóxido, por acção da xantina oxidase. De seguida, o radical formado reage com o citocromo c, reduzindo-o. Desta forma, é possível seguir a formação de citocromo c reduzido a 550nm. Na presença de SOD1 (vermelho), ocorre a remoção do radical superóxido e, conseqüentemente, há uma diminuição da formação de citocromo c reduzido (seta vermelha). Uma unidade enzimática (IU) é a quantidade de SOD1 necessária para diminuir, em 50%, a formação de citocromo c reduzido.

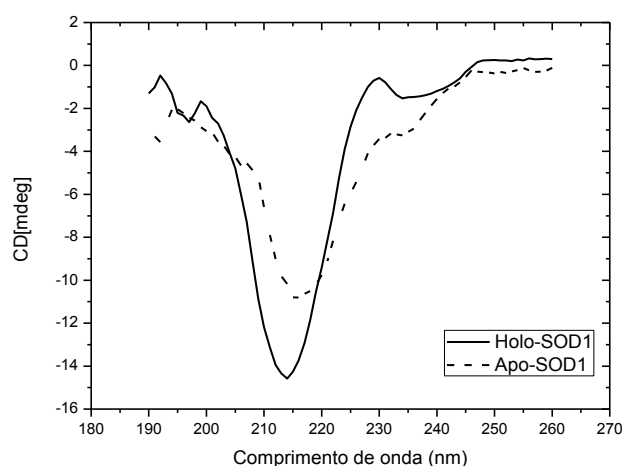
Reunindo todos os resultados obtidos a partir das técnicas utilizadas, é possível afirmar que a purificação da SOD1 decorreu de forma bastante satisfatória, tendo sido obtida Holo-SOD1 pura e no seu estado nativo.

### 3.2. Comparação estrutural entre as formas Holo e Apo-SOD1

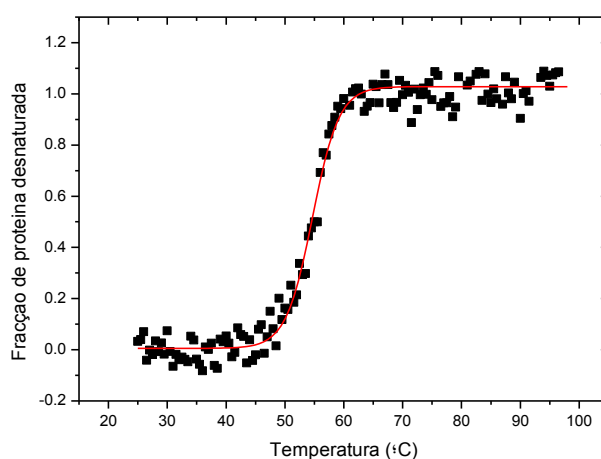
Recentemente, foi proposto, que a Apo-SOD1, quando incubada a 37°C, a uma concentração e pH próximos dos fisiológicos (100µM e pH 7, respectivamente), dá origem a oligómeros solúveis. Estas entidades são formadas por ligações per-sulfureto intermoleculares e por interações não-covalentes entre as folhas-β, dando origem a estruturas semelhantes a amilóide, capazes de ligar ThT (Banci et al, 2007). Assim, a perda de metais, além de diminuir fortemente a estabilidade, poderá ser um factor essencial para a oligomerização da SOD1 associada à ELA (Banci et al, 2008). Com base na informação da literatura, optou-se por centrar atenções no estudo da Apo-SOD1 e na sua contribuição para a patologia.

Após o processo de remoção dos iões metálicos da Holo-SOD1, com vista à obtenção do estado Apo, efectuou-se uma análise à estrutura e estabilidade da proteína, de forma a averiguar se o processo tinha corrido como esperado. Assim, efectuou-se o espectro de Dicroísmo Circular de UV-longínquo, presente na figura 3.8. É possível observar que, na zona dos 230nm, o “ombro” é

praticamente inexistente, o que indica que os íões metálicos foram removidos da proteína (Potter et al, 2007). Com a mesma amostra, efectuou-se uma rampa de temperatura, na qual se mediu o sinal de dicroísmo circular a 230nm à medida que se aumentava a temperatura, a uma taxa de 1°C/min. O resultado obtido foi, de seguida, convertido num gráfico de “fracção de proteína desnaturada” em função da temperatura, para facilitar a análise do mesmo (figura 3.9). Aplicando um ajuste sigmoidal aos dados obtidos, obteve-se um valor de  $T_m$  de 55,5°C. Este valor está próximo dos 52,8°C, que têm sido reportados na literatura como  $T_m$  da Apo-SOD1 (Shaw & Valentine, 2007), o que indica que, de facto, a SOD1 se encontra na forma Apo.



**Figura 3.8** – Espectros de Dicroísmo Circular da Holo-SOD1 obtida após purificação (linha preta contínua) e da respectiva Apo-SOD1 (linha preta tracejada), após o processo de remoção dos íões metálicos. No caso Holo-SOD1, é possível observar, na zona dos 230nm, a presença de um “ombro”, que é característico desta forma da SOD1.



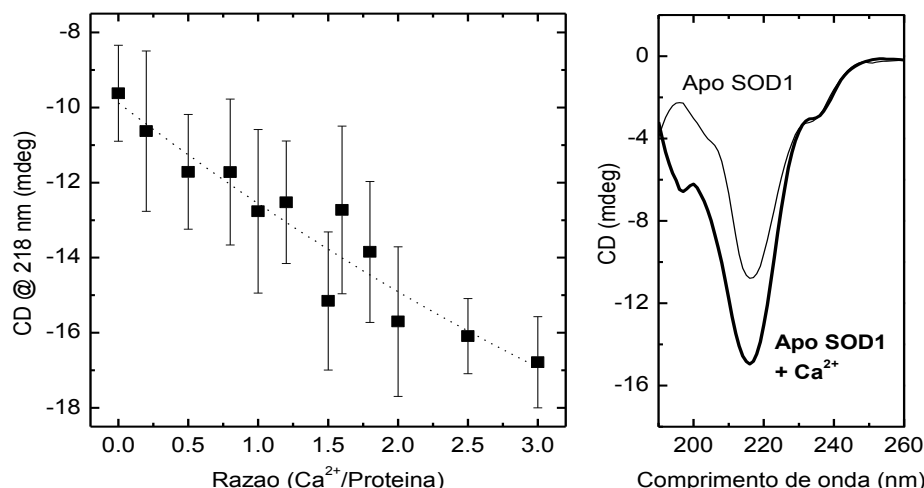
**Figura 3.9** – Rampa de temperatura referente à Apo-SOD1 obtida após remoção dos íões metálicos da Holo-SOD1 purificada. Mediu-se o sinal de Dicroísmo Circular a 230nm à medida que se aumentava a temperatura, a uma taxa de 1°C/min. A linha vermelha corresponde ao ajuste sigmoidal efectuado para calcular a temperatura de desnaturação ( $T_m = 55,5^\circ\text{C}$ ).

### 3.3. Efeito do Ião $\text{Ca}^{2+}$ na estrutura da Apo-SOD1

Como já foi referido anteriormente, é, cada vez mais, consensual que a ELA mediada por SOD1 é uma doença de *misfolding* de proteína, associado a um ganho de função tóxica (Furukawa & O'Halloran, 2006). No entanto, uma questão bastante intrigante e que permanece por esclarecer é o facto de esta proteína ser expressa de forma ubíqua (Pramatarova et al, 2001) mas apenas formar agregados proteicos nos neurónios motores. Uma possível explicação para esse facto é o ambiente muito particular existente no espaço sináptico, onde existem elevados níveis de iões metálicos como  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  (Barnham & Bush, 2008). Recentemente, tem sido proposto que a perda da homeostase intracelular do ião  $\text{Ca}^{2+}$  é um processo bastante relevante para a ELA, podendo mesmo ter um papel crucial nos vários mecanismos de disfunção dos neurónios motores (Tradewell et al, 2011). Desta forma, optou-se por estudar a interacção entre a Apo-SOD1 e o ião  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### 3.3.1. Estrutura secundária

Numa primeira abordagem, estudou-se a influência do ião  $\text{Ca}^{2+}$  na estrutura secundária da Apo-SOD1. Para tal, titulou-se a Apo-SOD1 no equilíbrio com concentrações crescentes de  $\text{Ca}^{2+}$  e efectuaram-se espectros de CD de UV-longínquo de cada uma das amostras. De seguida, efectuou-se um gráfico no qual se relaciona o valor obtido a 218nm (valor mínimo) em cada espectro com a razão Cálcio:Proteína (Figura 3.10).

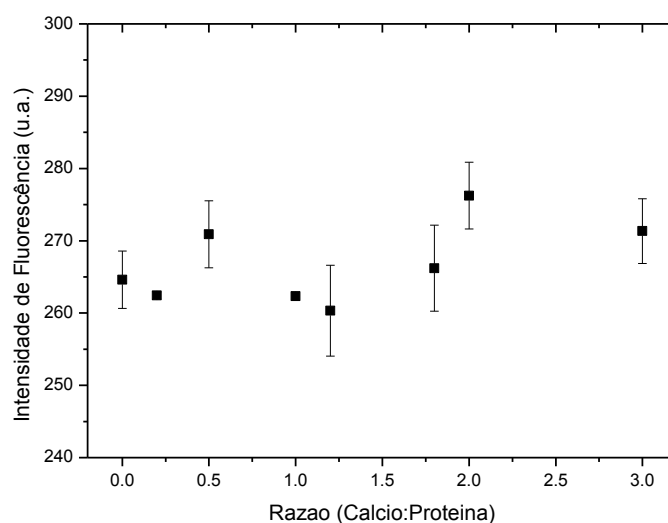


**Figura 3.10** – Influência do ião  $\text{Ca}^{2+}$  na estrutura secundária da Apo-SOD1. A partir dos espectros de dicroísmo circular de UV-longínquo de cada uma das amostras obtiveram-se os valores de CD a 218nm, que estão representados em função da razão Cálcio:Proteína. A linha a tracejado serve, apenas, para indicar a tendência. No gráfico da direita é possível observar a diferença espectral entre uma amostra sem  $\text{Ca}^{2+}$  (linha mais fina) e uma amostra com  $\text{Ca}^{2+}$  (linha mais grossa). Os valores apresentados correspondem à média dos 3 ensaios realizados e as barras de erros correspondem ao desvio padrão dos mesmos.

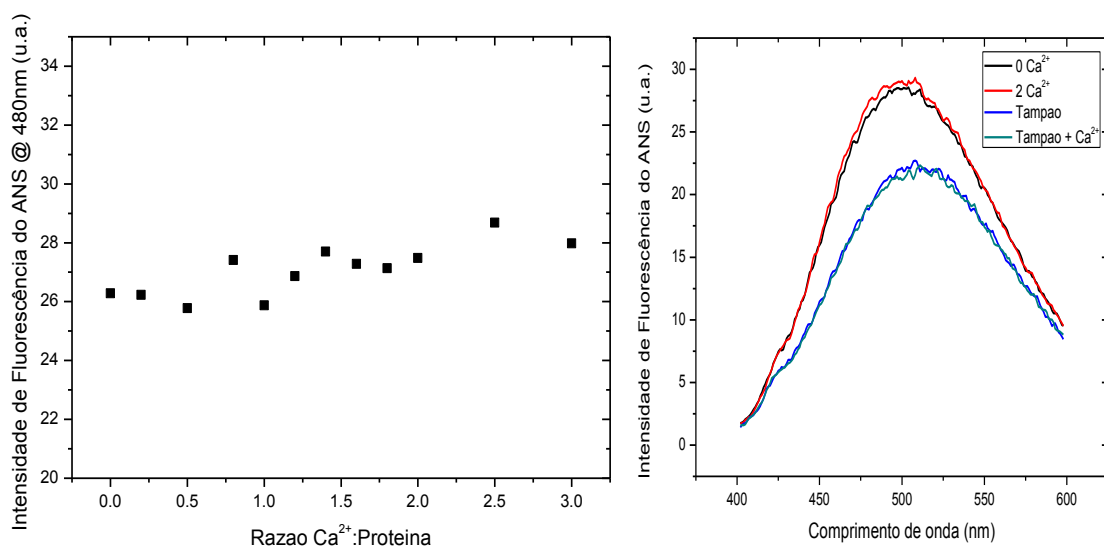
Analisando a figura 3.10 é possível constatar que à medida que aumenta a razão  $\text{Ca}^{2+}$ :Proteína (i.e. aumenta a concentração de Cálcio) o valor de CD a 218nm vai sendo cada vez mais negativo. Isto é facilmente detectável na comparação entre o espectro da Apo-SOD1 sem incubação com  $\text{Ca}^{2+}$  e o espectro da mesma proteína mas incubada, durante a noite, com  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta diminuição do sinal de dicroísmo circular a 218nm indica que ocorre uma interacção entre a Apo-SOD1 e o ião  $\text{Ca}^{2+}$ , promovendo a passagem de estrutura que se encontrava em enrolamento aleatório para estrutura secundária bem definida (Ranjbar & Gill, 2009).

### 3.3.2. Estrutura terciária e centro hidrofóbico

As amostras mencionadas no ponto 3.3.1 (Apo-SOD1 incubada com  $\text{Ca}^{2+}$ , durante a noite, a 37°C, com agitação) foram utilizadas para estudar a estrutura terciária da Apo-SOD1 através de espectroscopia de fluorescência. Após o período de incubação e a respectiva diluição de cada amostra, efectuaram-se espectros de fluorescência, aproveitando o facto de a SOD1 ter um fluoróforo intrínseco (resíduo de triptofano, na posição 32). Foram, também, efectuados estudos baseados em fluoróforos extrínsecos, nomeadamente, o ANS e a SYPRO Orange.



**Figura 3.11** – Resultados de espectroscopia de fluorescência do resíduo de triptofano referentes às amostras de Apo-SOD1 incubada, durante a noite, com diferentes concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ . Mediu-se a intensidade de fluorescência do triptofano para cada amostra e, de seguida, representou-se o valor de fluorescência a 347nm (valor máximo) de cada espectro em função da razão Cálcio:Proteína. Os valores apresentados correspondem à média dos 2 ensaios realizados e as barras de erros correspondem ao desvio padrão dos mesmos.



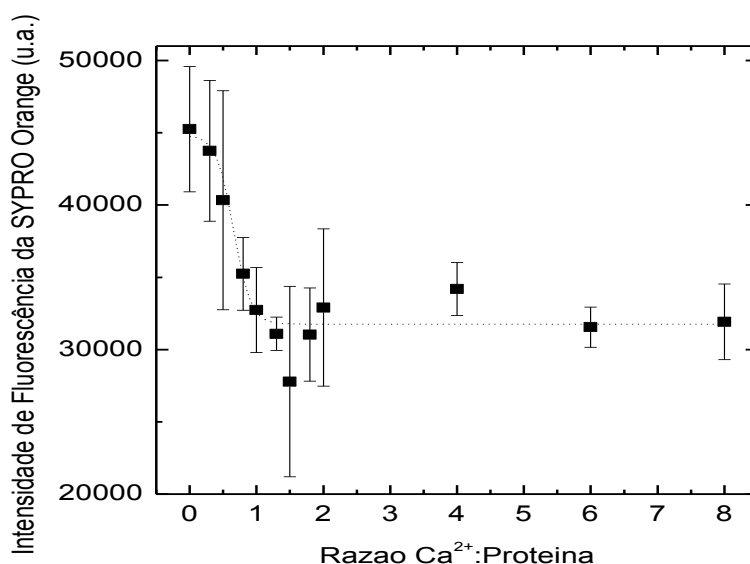
**Figura 3.12** – Resultados de espectroscopia de fluorescência do ANS referentes às amostras de Apo-SOD1 incubada, durante a noite, com diferentes concentrações de Ca<sup>2+</sup>. Mediu-se a intensidade de fluorescência do ANS em função do comprimento de onda, para cada uma das amostras e, de seguida, representou-se o valor obtido a 480nm em função da razão Ca<sup>2+</sup>:Proteína. No gráfico da direita é possível observar a diferença espectral entre uma amostra sem Ca<sup>2+</sup> (linha preta) e uma amostra com Ca<sup>2+</sup> (linha vermelha).

Os resultados obtidos para a fluorescência do triptofano e do ANS são apresentados nas figuras 3.11 e 3.12, respectivamente. É possível observar que o valor máximo de fluorescência do resíduo de triptofano se mantém, praticamente, constante à medida que aumenta a concentração de Ca<sup>2+</sup>, o que indica que este ião não afecta o ambiente que rodeia o resíduo de triptofano. Além disso, não foi detectado qualquer desvio no comprimento de onda de emissão máximo. Em relação ao ANS, apesar de se detectar um desvio do comprimento de onda de emissão máximo para o azul, em relação ao controlo (solução tampão e solução tampão com Ca<sup>2+</sup>), não se detectam alterações, provocadas pelo ião Ca<sup>2+</sup>, no valor de intensidade de fluorescência a 480nm. Isto pode ser facilmente observado na figura 3.12, onde não se detecta qualquer diferença significativa entre uma amostra sem adição de ião e uma amostra com uma razão Ca<sup>2+</sup>:Proteína de 2. Assim, com os dados obtidos, é possível constatar que o ião Ca<sup>2+</sup> não afecta nem a estrutura terciária nem o centro hidrofóbico da Apo-SOD1.

Com o objectivo de complementar a informação obtida anteriormente, procedeu-se ao estudo da estrutura terciária da Apo-SOD1 através da técnica de DSF. Após a incubação a 37°C, durante a noite, com diferentes concentrações de CaCl<sub>2</sub>, foi adicionada a sonda SYPRO® Orange e, de seguida, mediu-se a emissão de fluorescência, a cada minuto, num total de 60 minutos.

Dos dados obtidos, utilizou-se o valor inicial de intensidade fluorescência de cada amostra (t = 0min), visto que o objectivo era avaliar as alterações provocados pelo ião Ca<sup>2+</sup> no centro hidrofóbico da Apo-SOD1, durante o período de incubação. Assim, representou-se o valor inicial de intensidade de fluorescência de cada amostra em função da razão Cálcio:Proteína (Figura 3.13).

Analisando os resultados obtidos, é possível constatar que, até à razão  $1,5\text{Ca}^{2+} : 1 \text{ Apo-SOD1}$ , ocorre uma diminuição da intensidade de fluorescência à medida que aumenta a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ , enquanto que, a partir desse valor, ocorre uma estabilização da mesma. Esta diminuição indica que existe uma menor quantidade de sonda ligada, o que significa que diminuiu o número de zonas hidrofóbicas disponíveis para a ligação. Desta forma, é possível afirmar que o ião  $\text{Ca}^{2+}$  interage com a Apo-SOD1, levando a alterações na hidrofobicidade da sua superfície. Esta interação parece ser um processo específico e bem definido, uma vez que foi obtido um comportamento de saturação, ou seja, ocorrem alterações na estrutura da proteína até uma determinada concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  e depois há uma estabilização. É importante referir que após os 60 minutos de incubação o comportamento obtido foi bastante semelhante, o que comprova, mais uma vez, que se trata de uma interação específica e bem definida.



**Figura 3. 13** – Resultados de *Differential Scanning Fluorimetry* referentes às amostras de Apo-SOD1 incubada, durante a noite, com diferentes concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ . Mediu-se a intensidade de fluorescência da SYPRO Orange® ao longo de 60min, para cada uma das amostras. Representou-se o valor da intensidade de fluorescência inicial ( $t=0\text{min}$ ) em função da razão Cálcio:Proteína. A linha a tracejado serve, apenas, para indicar a tendência. Os valores apresentados correspondem à média dos 3 ensaios realizados e as barras de erros correspondem ao desvio padrão dos mesmos.

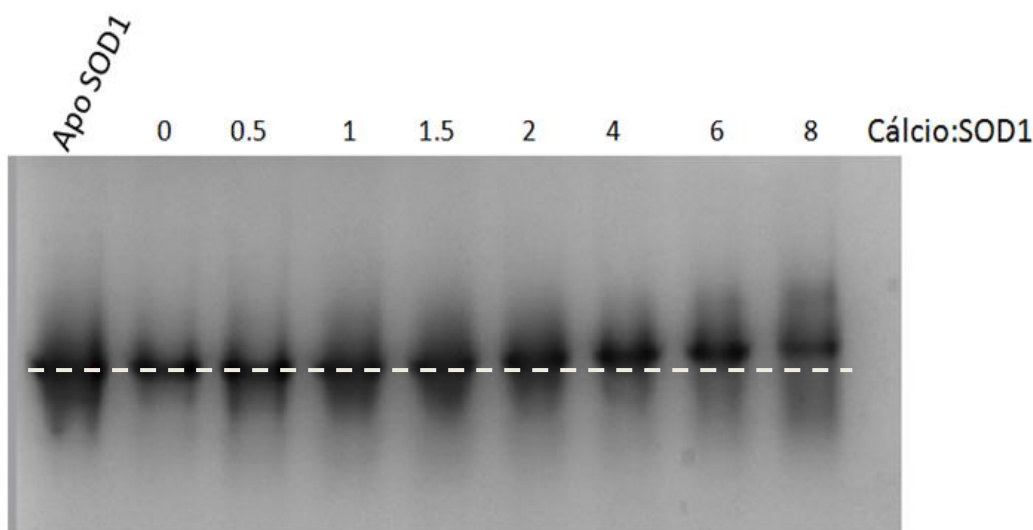
Seria de esperar que os resultados obtidos por esta técnica fossem semelhantes aos obtidos com o fluoróforo ANS, uma vez que ambas as sondas reconhecem zonas hidrofóbicas expostas em proteínas. No entanto, deve ser tido em conta o facto de o método de DSF ter como objectivo o cálculo de temperaturas de desnaturação de proteínas, ou seja, a sonda adicionada liga, preferencialmente, zona hidrofóbicas expostas durante a desnaturação térmica da proteína. Neste caso em particular, foi utilizada a mesma técnica, no entanto fez-se uma adaptação, na qual a temperatura usada foi constante ( $37^\circ\text{C}$ ), o que poderá alterar a forma como a SYPRO® Orange se liga às zonas referidas. Além disso, a

forma como são adquiridos os dados de intensidade de fluorescência é bastante diferente, uma vez que no caso do fluoróforo ANS é usada uma *cuvette* de quartzo e são traçados espectros num espectrofluorímetro com feixe de incidência horizontal, enquanto que a técnica de DSF pressupõe a utilização de placas de 96 poços e um aparelho de PCR, no qual a leitura das amostras é feita na vertical. Por fim, outro factor que poderá levar aos resultados díspares obtidos é a estrutura das duas sondas, uma vez que diferenças ao nível da carga e da estrutura global destas podem traduzir-se em diferentes resultados obtidos. No entanto, uma vez que a estrutura da SYPRO® Orange não é pública, torna-se impossível efectuar esta comparação.

### 3.3.3. Estrutura quaternária e agregação

Ao contrário do que acontece nos géis desnaturantes SDS-PAGE, onde a migração depende apenas da massa da proteína (a carga global negativa é conferida pelo detergente utilizado), nos géis Native-PAGE a proteína está no seu estado nativo e, por isso, a migração depende não só da massa mas também da conformação da proteína e da presença de cofactores (iões metálicos, por exemplo).

Desta forma, foi possível estudar a interacção entre o ião  $\text{Ca}^{2+}$  e a Apo-SOD1, bastando para tal incubar a proteína com o  $\text{Ca}^{2+}$ , seguindo-se a sua aplicação num gel Native-PAGE.



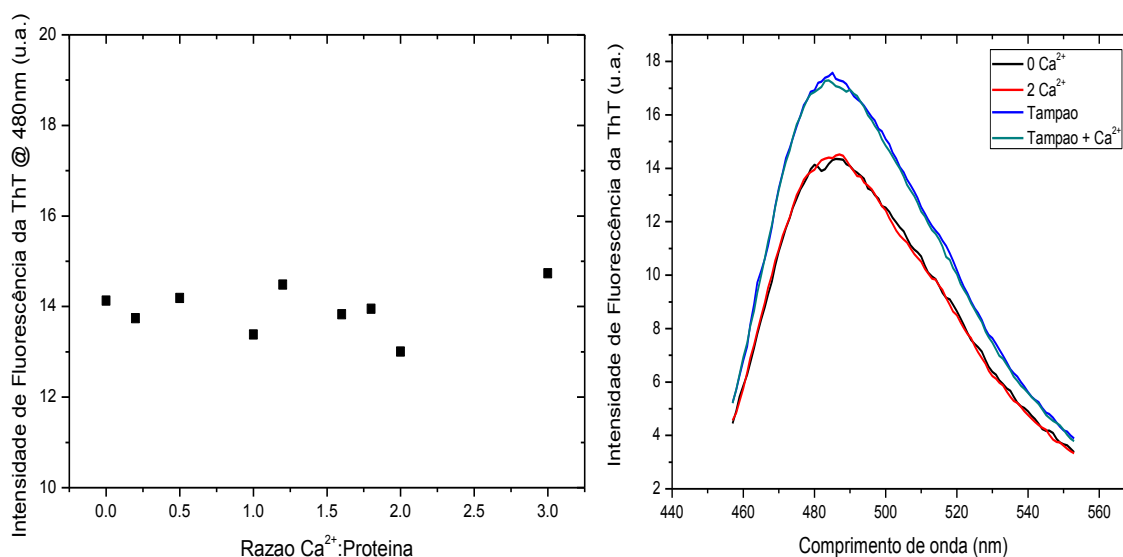
**Figura 3.14** – Gel Native-PAGE referente ao estudo da influência do ião  $\text{Ca}^{2+}$  na estrutura quaternária da Apo-SOD1. No primeiro poço (esquerda) está presente a Apo-SOD1 sem incubação, enquanto nos restantes está presente a proteína incubada com concentrações crescentes de  $\text{Ca}^{2+}$ . A linha a tracejado serve de referência para a posição das bandas.

Analisando o gel obtido (Figura 3.14) é possível observar, em primeiro lugar, que não ocorreu dissociação do dímero nem formação significativa de oligómeros, uma vez que todas as bandas estão ao nível da Apo-SOD1 sem incubação (primeiro poço). É possível verificar, também, que à medida que aumenta a concentração de cálcio as bandas tornam-se menos intensas e mais dispersas. Por fim, é

detectável uma ligeira diminuição da distância percorrida pelas amostras que contêm maior concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Embora esta técnica não permita tirar conclusões quantitativas, os resultados obtidos indicam que o ião  $\text{Ca}^{2+}$  interage com a Apo-SOD1, afectando a sua estrutura e/ou carga, o que se reflecte numa alteração do padrão de migração no gel Native-PAGE. No entanto, não ocorre qualquer alteração significativa na estrutura quaternária da proteína, ou seja, esta mantém-se, essencialmente, na forma de dímero.

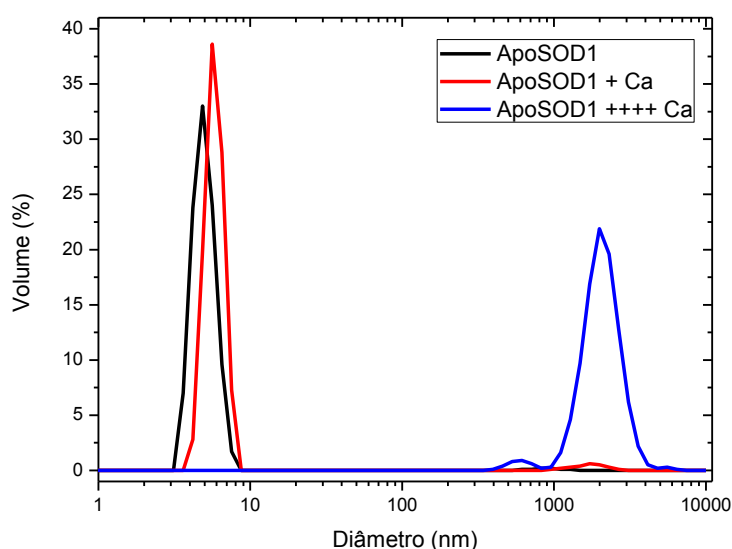
No que respeita ao processo de agregação e formação de fibrilas amilóides pela Apo-SOD1 incubada com  $\text{Ca}^{2+}$ , é possível constatar que a intensidade de fluorescência da ThT nas amostras que têm proteína é inferior à verificada no controlo, e que esta não depende da adição de ião  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 3.15), o que sugere que este ião não potencia a ocorrência de fenómenos de agregação nem de formação de fibrilas amilóides da Apo-SOD1.



**Figura 3.15** – Resultados de espectroscopia de fluorescência da ThT referentes às amostras de Apo-SOD1 incubada, durante a noite, com diferentes concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ . Mediu-se a intensidade de fluorescência da ThT em função do comprimento de onda, para cada uma das amostras e, de seguida, representou-se o valor obtido a 480nm em função da razão  $\text{Ca}^{2+}$ :Proteína. No gráfico da direita é possível observar a diferença espectral entre uma amostra sem  $\text{Ca}^{2+}$  (linha mais fina) e uma amostra com  $\text{Ca}^{2+}$  (linha mais grossa).

Apesar de os métodos utilizados anteriormente revelarem que não se verifica qualquer fenómeno de agregação da Apo-SOD1 quando esta é incubada com  $\text{Ca}^{2+}$ , optou-se por utilizar a técnica de DLS, visto que é bastante mais sensível, permitindo detectar agregados que não são detectáveis nos géis Native-PAGE, nem através de métodos espectroscópicos de fluorescência. Esta técnica permite calcular não só o tamanho, como a distribuição de tamanhos de partículas em solução, incluindo proteínas (Nobbmann et al, 2007).

Desta forma, mediu-se, inicialmente, o diâmetro das moléculas presentes numa solução de Apo-SOD1 (linha preta da Figura 3.16), tendo-se obtido um valor médio de 4,8nm. Este resultado está de acordo com o esperado, uma vez que o dímero da Apo-SOD1 tem entre 5 e 6nm de diâmetro (Wilkins et al, 1999). De seguida, foi adicionado  $\text{Ca}^{2+}$ , numa concentração idêntica à de proteína (linha vermelha da Figura 3.16). O diâmetro médio das moléculas em solução aumentou para 5,72nm, valor bastante próximo do valor inicial, o que indica que esta proporção de  $\text{Ca}^{2+}$  não leva à formação de agregados de Apo-SOD1. Após a adição de  $\text{Ca}^{2+}$  numa concentração quatro vezes superior à de proteína (linha azul na Figura 3.16), observou-se um aumento bastante acentuado do diâmetro médio das moléculas em solução, passando a ser de 1983nm. Além disso, a largura do pico também aumentou de forma significativa, o que indica que existe uma maior heterogeneidade no tamanho das espécies presentes em solução.



**Figura 3.16** – Monitorização da formação de agregados de Apo-SOD1, através da técnica de DLS. À amostra inicial de Apo-SOD1 (linha preta) foram adicionados volumes crescentes de  $\text{Ca}^{2+}$  (linhas vermelha e azul), resultando num aumento do diâmetro médio das moléculas em solução.

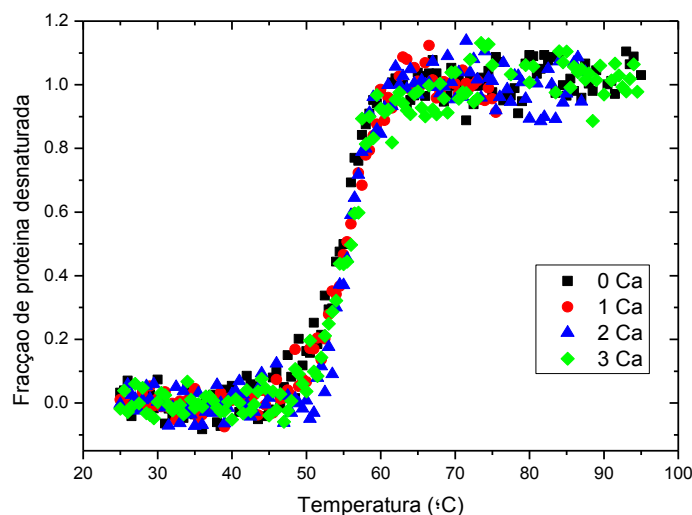
O resultado obtido através desta técnica não está de acordo com os resultados obtidos anteriormente, uma vez que indica a formação de agregados de grandes dimensões da Apo-SOD1, quando incubada com  $\text{Ca}^{2+}$ . No entanto, é necessário ter em conta que, tal como foi referido, esta técnica é bastante mais sensível que as anteriores e, além disso, detecta agregados proteicos que podem não ligar ThT. Assim, é possível sugerir que o ião  $\text{Ca}^{2+}$  interage com a Apo-SOD1, potenciando a formação de agregados desta proteína. Estes resultados vêm de encontro às informações recentes, que indicam que o ião  $\text{Ca}^{2+}$  poderá ter uma grande influência na ELA (Tradewell et al, 2011).

### 3.4. A influência do íon $\text{Ca}^{2+}$ na estabilidade da Apo-SOD1

O passo seguinte foi, então, averiguar se a interacção entre o íon  $\text{Ca}^{2+}$  e a Apo-SOD1 leva a alterações na estabilidade térmica e química da proteína. Para tal, utilizaram-se várias técnicas, nomeadamente, a espectroscopia de Dicroísmo Circular e o *Differential Scanning Fluorimetry*, para estudar a estabilidade térmica, e a espectroscopia de Fluorescência, para estudar a estabilidade química.

#### 3.4.1. Estabilidade térmica

Incubou-se a Apo-SOD1, durante a noite, com diferentes concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  e, de seguida, efectuaram-se rampas de temperatura, nas quais se mediu o sinal de dicroísmo circular a 230nm à medida que se aumentava a temperatura, a uma taxa de  $1^\circ\text{C}/\text{min}$ . Os resultados obtidos foram, de seguida, convertidos num gráfico de “fracção de proteína desnaturada” em função da temperatura, para facilitar a análise do mesmo (Figura 3.17). Apesar do processo de desnaturação térmica da Apo-SOD1 não ser um processo reversível, aplicou-se um ajuste sigmoidal aos dados obtidos, no sentido de obter valores comparativos de temperatura de desnaturação. Assim, obtiveram-se os seguintes valores de  $T_m$  aparente: 0  $\text{Ca}^{2+}$ :  $55^\circ\text{C}$ ; 1  $\text{Ca}^{2+}$ :  $55,4^\circ\text{C}$ ; 2  $\text{Ca}^{2+}$ :  $55,7^\circ\text{C}$ ; 4  $\text{Ca}^{2+}$ :  $55,5^\circ\text{C}$ .

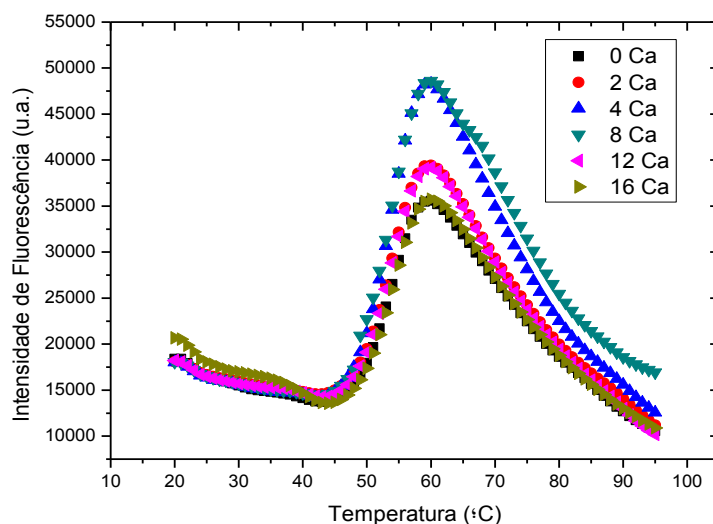


**Figura 3.17** – Rampas de temperatura referentes às amostras de Apo-SOD1 incubada durante a noite com diferentes concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ . Mediu-se o sinal de Dicroísmo Circular a 230nm à medida que se aumentava a temperatura, a uma taxa de  $1^\circ\text{C}/\text{min}$ . As  $T_m$  obtidas foram as seguintes: 0  $\text{Ca}^{2+}$ :  $55^\circ\text{C}$ ; 1  $\text{Ca}^{2+}$ :  $55,4^\circ\text{C}$ ; 2  $\text{Ca}^{2+}$ :  $55,7^\circ\text{C}$ ; 3  $\text{Ca}^{2+}$ :  $55,5^\circ\text{C}$ .

A estabilidade térmica da Apo-SOD1 incubada com diferentes concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  foi, também, avaliada através de *Differential Scanning Fluorimetry* (Figura 3.18). Nesta técnica, mede-se a

intensidade de fluorescência da sonda SYPRO® Orange à medida que a temperatura aumenta, sendo, por isso, possível calcular a temperatura de desnaturação da proteína. Utilizando um software apropriado (Folha de análise DSF, versão 2.5, ftp://ftp.sgc.ox.ac.uk/pub/biophysics/), obteve-se um valor de  $T_m$  de 54°C para todas as amostras, o que está de acordo com os valores obtidos com a técnica anterior e com os valores reportados na literatura (Shaw & Valentine, 2007).

Os resultados obtidos indicam que o íon  $Ca^{2+}$  não afecta a estabilidade térmica da Apo-SOD1, uma vez que a  $T_m$  obtida foi sempre semelhante, independentemente da concentração de íon presente.



**Figura 3.18** – Rampas de temperatura referentes às amostras de Apo-SOD1 incubada, durante a noite, com diferentes concentrações de  $Ca^{2+}$ . Mediu-se a intensidade de fluorescência da SYPRO® Orange à medida que a temperatura aumentava. Foi obtido uma  $T_m$  de 54°C para todas as amostras.

### 3.4.2. Estabilidade química

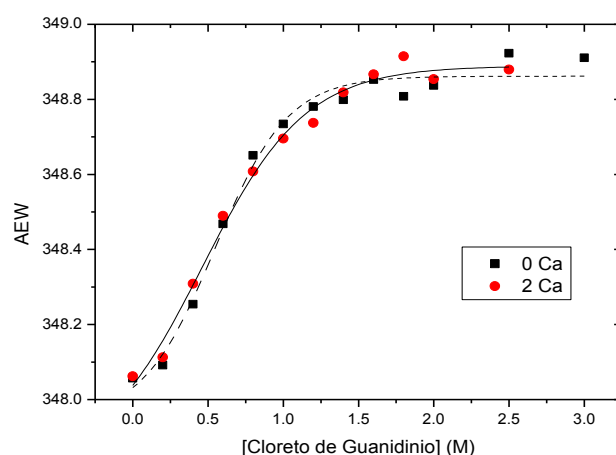
Utilizou-se um ensaio baseado no poder desnaturante do cloreto de guanidínio [ $C(NH_2)_3Cl$ ] para estudar a estabilidade química da Apo-SOD1 incubada, ou não, com  $Ca^{2+}$ . Após a incubação durante a noite, adicionou-se cloreto de guanidínio e incubou-se durante 2 horas. De seguida, efectuaram-se os espectros de fluorescência do resíduo de triptofano.

A desnaturação de uma proteína traduz-se, normalmente, num aumento da intensidade de fluorescência dos resíduos de triptofano e num desvio do comprimento de onda de emissão máximo para o vermelho. A melhor forma de ter em conta as duas alterações mencionadas é calcular o comprimento de onda de emissão médio (do inglês, AEW), utilizando a seguinte fórmula:

$$\langle \lambda \rangle = \frac{\sum_{i=\lambda_i}^{\lambda_N} (F_i \times \lambda_i)}{\sum_{i=\lambda_i}^{\lambda_N} F_i} \quad (1)$$

onde  $F_i$  corresponde à intensidade de fluorescência obtida ao comprimento de onda  $i$  e  $\lambda_i$  corresponde ao comprimento de onda. Assim, é possível analisar o efeito do cloreto de guanidínio na fluorescência do resíduo de triptofano e, conseqüentemente, na desnaturação da proteína.

Os resultados obtidos são apresentados na figura 3.19. Aplicando um ajuste sigmoidal aos dados obtidos, foi possível calcular o ponto médio aparente da transição ( $C_m$ ) de cada amostra: 0  $\text{Ca}^{2+}$ :  $C_m = 0.55\text{M}$  e 2  $\text{Ca}^{2+}$ :  $C_m = 0.46\text{M}$ . Apesar de não ser possível observar uma fase de pré-transição bem definida, a curva de desnaturação é muito semelhante, o que sugere que o íon  $\text{Ca}^{2+}$  não afecta a estabilidade química da Apo-SOD1.



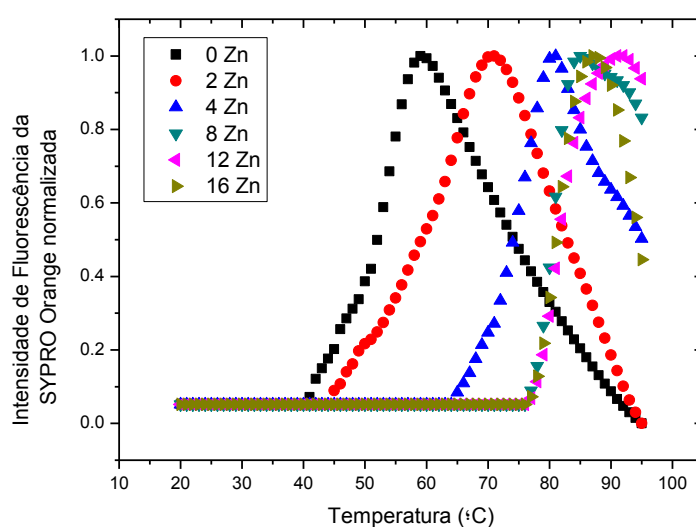
**Figura 3.19** – Estudo da estabilidade química da Apo-SOD1 incubada, durante a noite, com e sem  $\text{Ca}^{2+}$ . Mediante a intensidade de fluorescência do resíduo de triptofano e, de seguida, calculou-se o comprimento de onda de emissão médio (do inglês, AEW). Aplicando um ajuste sigmoidal aos dados obtidos (linha contínua para a amostra sem  $\text{Ca}^{2+}$  e linha tracejada para a amostra com  $\text{Ca}^{2+}$ ) foi possível calcular o ponto médio da transição ( $C_m$ ) de cada amostra: 0  $\text{Ca}^{2+}$ :  $C_m = 0.55\text{M}$  e 2  $\text{Ca}^{2+}$ :  $C_m = 0.46\text{M}$ .

Os estudos efectuados sugerem que, apesar de interagir com a estrutura da Apo-SOD1, o íon  $\text{Ca}^{2+}$  não afecta a estabilidade conformacional da mesma.

### 3.5. Avaliação da interferência do íon $\text{Ca}^{2+}$ na afinidade entre a Apo-SOD1 e o $\text{Zn}^{2+}$

Está descrito de forma bastante clara na literatura que a SOD1 tem, em cada monómero, um local de ligação para o íon  $\text{Zn}^{2+}$  e que a ligação do mesmo aumenta a estabilidade térmica da proteína (Potter et al, 2007). Assim, o objectivo principal deste estudo foi averiguar se o íon  $\text{Ca}^{2+}$  altera a afinidade entre a Apo-SOD1 e o  $\text{Zn}^{2+}$  e, caso altere, quais as conseqüências para a estrutura da proteína. Para além disso, este estudo também poderia permitir perceber se a possível ligação do íon  $\text{Ca}^{2+}$  ocorria no local de ligação do íon  $\text{Zn}^{2+}$ .

Numa primeira abordagem, e apenas para confirmar a informação já descrita, utilizou-se a técnica de DSF para efectuar um ensaio semelhante ao do ponto 3.4.1, mas neste caso a Apo-SOD1 foi incubada com diferentes concentrações de  $Zn^{2+}$  (Figura 3.20). Utilizando o software apropriado (Folha de análise DSF, versão 2.5, <ftp://ftp.sgc.ox.ac.uk/pub/biophysics/>), calcularam-se os valores de  $T_m$  de cada uma das amostras, tendo-se obtido os seguintes resultados: 0  $Zn^{2+}$ : 54°C; 2  $Zn^{2+}$ : 65°C; 4  $Zn^{2+}$ : 77°C; 8  $Zn^{2+}$ : 81°C; 12  $Zn^{2+}$ : 81°C; 16  $Zn^{2+}$ : 81°C. Tal como seria de esperar, a temperatura de desnaturação aumenta à medida que aumenta a concentração de  $Zn^{2+}$ , até atingir o valor máximo de 81°C, estabilizando de seguida. Este valor está bastante próximo dos 80°C, que têm sido reportados como  $T_m$  da SOD1 com ião  $Zn^{2+}$  ligado (Potter et al, 2007).



**Figura 3.20** – Rampas de temperatura referentes às amostras de Apo-SOD1 incubada durante a noite com diferentes concentrações de  $Zn^{2+}$ . Mediu-se a intensidade de fluorescência da SYPRO® Orange à medida que a temperatura aumentava. Após a normalização dos valores obtidos, foi possível calcular as temperaturas de desnaturação. As  $T_m$  obtidas foram as seguintes: 0  $Zn^{2+}$ : 54°C; 2  $Zn^{2+}$ : 65°C; 4  $Zn^{2+}$ : 77°C; 8  $Zn^{2+}$ : 81°C; 12  $Zn^{2+}$ : 81°C; 16  $Zn^{2+}$ : 81°C.

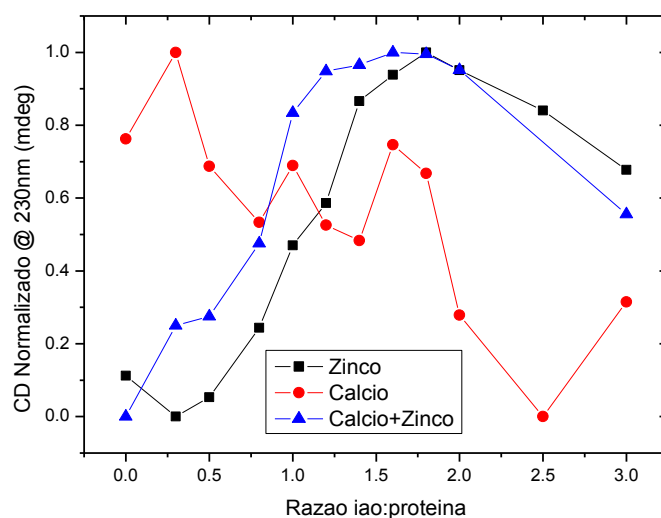
Seguidamente, incubou-se a Apo-SOD1 (37°C, com agitação), durante a noite, com diferentes concentrações de  $ZnCl_2$ . Após a incubação, realizaram-se os espectros de CD de todas as amostras.

Por fim, procedeu-se à incubação da Apo-SOD1 (37°C, com agitação), durante 24h, com diferentes concentrações de  $CaCl_2$ . Após a incubação, adicionaram-se volumes idênticos, isto é, na mesma proporção, de  $ZnCl_2$  e incubou-se, novamente, durante 24h nas mesmas condições.

Dos dados obtidos, utilizaram-se os valores de CD a 230nm, visto que este é um comprimento de onda que fornece bastante informação acerca da ligação de iões metálicos à proteína (Kayatekin et al, 2010), e o valor a 218nm, que permite avaliar a contribuição de folhas- $\beta$  para a estrutura secundária da proteína (Ranjbar & Gill, 2009). Os valores obtidos aos comprimentos de onda referidos foram representados em função da razão Ião:Proteína (Figuras 3.21 e 3.22).

Tal como já foi referido anteriormente, o aumento do sinal de dicroísmo circular a 230nm, vulgarmente designado de “ombro”, no espectro da SOD1, é característico da forma com ião  $Zn^{2+}$  ligado (Potter et al, 2007), e permite distingui-la da forma Apo (sem metais incorporados). Assim, tal como seria de esperar, o ião  $Zn^{2+}$  provoca um aumento do sinal de dicroísmo circular a 230nm (Figura 3.21). Este processo parece ser bastante específico, uma vez que o sinal aumenta à medida que aumenta a concentração de  $Zn^{2+}$ , mas após atingir o valor correspondente à razão Ião:Proteína de 1.3, estabiliza. Este valor está bastante próximo do valor mencionado na literatura, onde está descrito que a ligação de um ião  $Zn^{2+}$  por dímero é suficiente para induzir as principais alterações conformacionais na proteína (Potter et al, 2007).

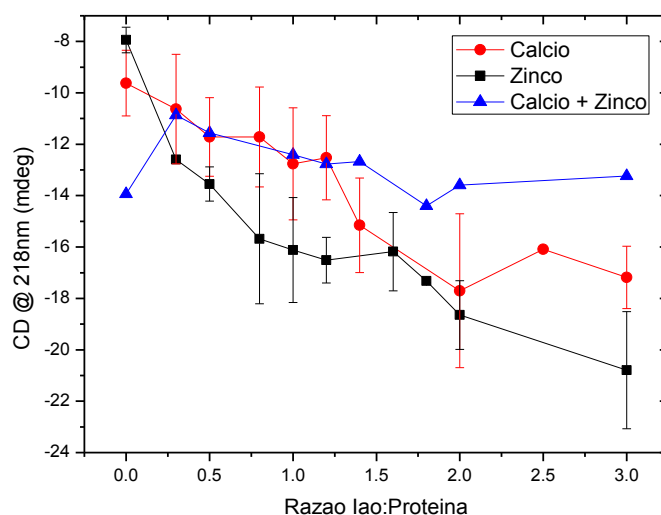
No caso em que a Apo-SOD1 foi incubada previamente com  $Ca^{2+}$  e, só depois, com  $Zn^{2+}$ , o comportamento é muito semelhante ao da incubação só com  $Zn^{2+}$ , o que indica que o ião  $Ca^{2+}$  não parece interferir com a ligação do ião  $Zn^{2+}$  ao seu local específico na SOD1. Finalmente, quando a Apo-SOD1 foi incubada apenas com o ião  $Ca^{2+}$  o comportamento obtido é mais oscilatório e aparenta ter um efeito contrário ao observado para a ligação do  $Zn^{2+}$ , ou seja, ocorre uma diminuição do sinal de CD a 230nm.



**Figura 3.21** – Influência do ião  $Ca^{2+}$  na afinidade entre a Apo-SOD1 e o ião  $Zn^{2+}$ . A partir dos espectros de dicroísmo circular de UV-longínquo de cada uma das amostras obtiveram-se os valores de CD a 230nm, que, após serem normalizados, foram representados em função da razão ião:proteína.

No que diz respeito à monitorização dos resultados a 218nm (Figura 3.22), é possível constatar que o ião  $Zn^{2+}$  leva a que o sinal de CD se torne mais negativo, quando comparado com o  $Ca^{2+}$ . Isto indica que ambos os iões interagem com a Apo-SOD1, levando a modificações de estrutura que se encontrava em enrolamento aleatório para estrutura secundária bem definida. No entanto, quando a proteína é incubada inicialmente com  $Ca^{2+}$  e, de seguida, com  $Zn^{2+}$ , o comportamento obtido não é tão significativo, ou seja, não ocorre uma diminuição tão acentuada do sinal de CD. Este resultado sugere

que a acção combinada destes dois iões provoca alterações estruturais na Apo-SOD1 diferentes das provocadas por cada um dos iões isoladamente. Esta informação pode ser bastante relevante para o melhor conhecimento da ELA, uma vez que ambos os iões referidos estão presentes em elevadas concentrações no espaço sináptico (Barnham & Bush, 2008)

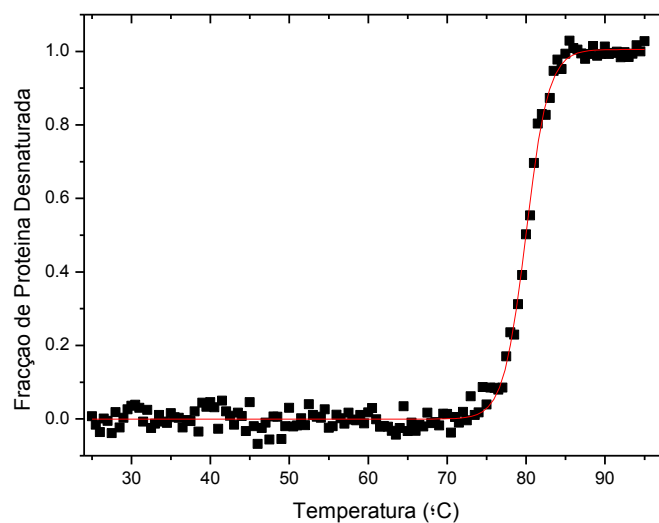


**Figura 3.22** – Influência do ião  $\text{Ca}^{2+}$  na afinidade entre a Apo-SOD1 e o ião  $\text{Zn}^{2+}$ . A partir dos espectros de dicroísmo circular de UV-longínquo de cada uma das amostras obtiveram-se os valores de CD a 218nm, que foram representados em função da razão ião:proteína. Os valores apresentados para as amostras com Cálcio e com Zinco (isoladamente) correspondem à média dos 3 ensaios realizados e as barras de erros correspondem ao desvio padrão dos mesmos.

Reunindo os resultados obtidos, é possível constatar que o ião  $\text{Ca}^{2+}$  interage com a Apo-SOD1, levando a alterações ao nível da estrutura secundária, no entanto, não interfere com a ligação do ião  $\text{Zn}^{2+}$  à Apo-SOD1.

Para complementar a informação já obtida, efectuou-se um estudo de estabilidade térmica e determinação da temperatura de desnaturação, através de Espectroscopia de dicroísmo circular, da amostra de Apo-SOD1 incubada, previamente, com  $\text{Ca}^{2+}$  e, depois, com  $\text{Zn}^{2+}$ , numa proporção de 3:1 (Ião:Proteína). O resultado obtido foi, de seguida, convertido num gráfico de “fracção de proteína desnaturada” em função da temperatura, para facilitar a análise do mesmo (Figura 3.23). Aplicando um ajuste sigmoidal aos dados obtidos, obteve-se um valor de  $T_m$  de 80°C.

Este resultado corrobora a ideia de que o ião  $\text{Ca}^{2+}$  não interfere com a ligação do ião  $\text{Zn}^{2+}$  à Apo-SOD1, uma vez que a  $T_m$  obtida é igual à obtida quando se incuba a proteína apenas com ião  $\text{Zn}^{2+}$  (Potter et al, 2007).



**Figura 3.23** – Rampa de temperatura referente à amostra de Apo-SOD1 incubada com  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  (razão Ião:Proteína = 3). Mediu-se o sinal de Dicroísmo Circular a 230nm à medida que se aumentava a temperatura, a uma taxa de  $1^\circ\text{C}/\text{min}$ . A linha vermelha corresponde ao ajuste sigmoideal efectuado para calcular a temperatura de desnaturação ( $T_m = 80^\circ\text{C}$ ).

### 3.6. Ião $\text{Ca}^{2+}$ como potenciador da agregação da Apo-SOD1

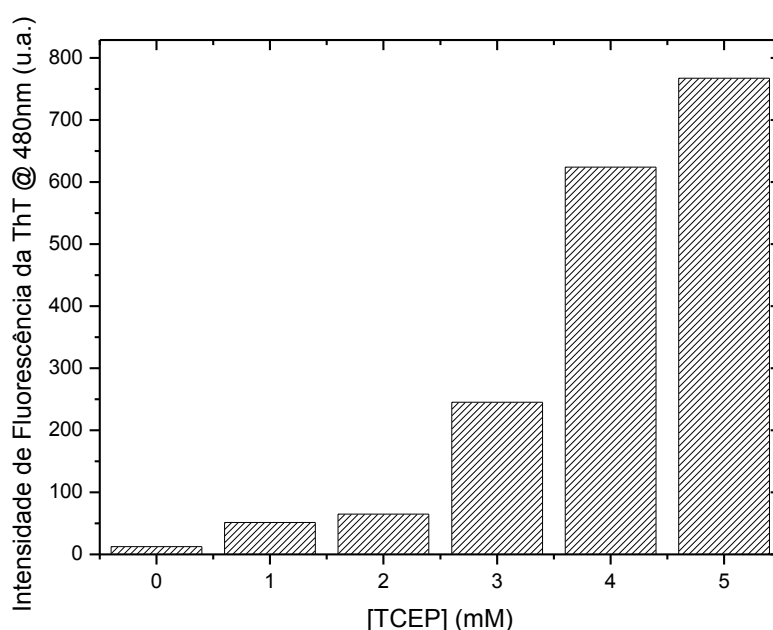
Visto que, anteriormente, apenas a técnica de DLS indicou que o ião  $\text{Ca}^{2+}$  por si só induz a formação de agregados da Apo-SOD1 (secção 6.2.3), procurou-se na literatura informação acerca de possíveis condições potenciadoras de agregação, com o objectivo de perceber se, nessas condições, o ião  $\text{Ca}^{2+}$  influenciaria, ou não, o processo. Desta forma, optou-se por utilizar o agente redutor tris-[2-carboxietil]-fosfina (TCEP), uma vez que, por um lado, este redutor numa concentração entre 5 e 10mM leva à dissociação do dímero da Apo-SOD1 (Doucette et al, 2004) e, por outro, permite mimetizar o ambiente redutor existente na célula, tornando as condições do ensaio mais próximas das fisiológicas. Juntamente com o ambiente redutor, utilizou-se uma temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , bem como um pH de 7,5 (condições fisiológicas).

#### 3.6.1. O papel do TCEP na monomerização e conseqüente agregação da Apo-SOD1

Tal como foi referido anteriormente, a ligação per-sulfureto existente na SOD1 permite aumentar a afinidade das duas subunidades no dímero, conferindo uma grande estabilidade (Potter et al, 2007). Assim, caso a proteína seja incubada num ambiente fortemente redutor, a ligação per-sulfureto é quebrada, levando a uma diminuição da afinidade entre as subunidades no dímero e,

consequentemente, ao aumento da população de monómeros de SOD1. Na literatura está descrito que esta monomerização induz a agregação da Apo-SOD1 (Chattopadhyay et al, 2008). Desta forma, procedeu-se à incubação da Apo-SOD1 com diferentes concentrações de TCEP, a fim de avaliar o seu efeito na monomerização e agregação da proteína, bem como seleccionar a concentração mais adequada para o estudo subsequente.

Após a incubação e a diluição, mediu-se a intensidade de fluorescência da ThT para cada amostra e, de seguida, representou-se o valor obtido a 480nm, em cada espectro, em função da concentração de TCEP (Figura 3.24).



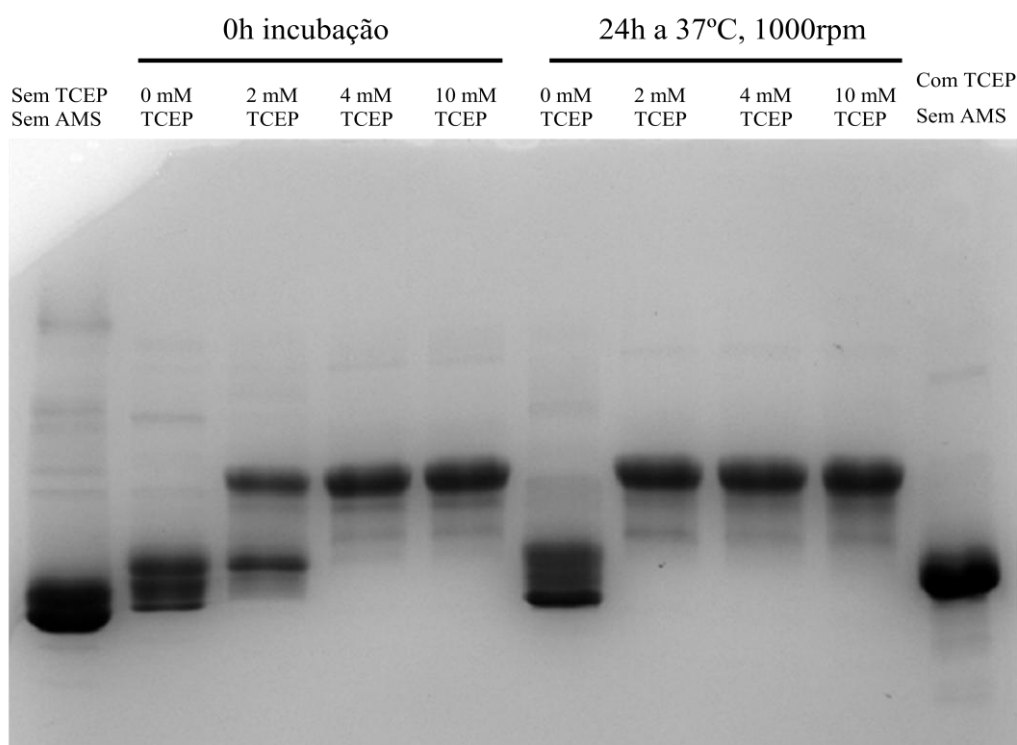
**Figura 3.24** – Resultados de espectroscopia de fluorescência, baseados na sonda ThT, referentes às amostras de Apo-SOD1 incubada, durante 24h, com diferentes concentrações TCEP. Mediu-se a intensidade de fluorescência da ThT para cada amostra e, de seguida, representou-se o valor de fluorescência a 480nm de cada espectro em função da concentração de TCEP.

Analisando o resultado obtido é possível constatar que à medida que aumenta a concentração de redutor, aumenta o valor de intensidade de fluorescência da ThT a 480nm. Este efeito sugere que a redução da ponte per-sulfureto nativa e o conseqüente aumento da população de monómero em solução potencia, fortemente, fenómenos de agregação e de formação de fibrilas amilóides.

Com o objectivo de perceber qual o estado de monomerização da Apo-SOD1 para um determinado efeito de agregação observado, efectuou-se um estudo baseado no reagente AMS. Este agente modificador de grupos tiol, com cerca de 500Da de massa molecular, liga-se a grupos -SH livres nos resíduos de cisteína. Assim, é possível perceber se as ligações per-sulfureto estão intactas

(S-S), impedindo a ligação do AMS, ou se estão quebradas (2 SH), permitindo a ligação do AMS e consequente aumento do tamanho da proteína. As alterações ao nível do tamanho da proteína são detectadas através de um gel SDS-PAGE parcialmente desnaturante, ou seja, é realizado o método habitual, mas utiliza-se tampão de amostra nativo e as amostras não são fervidas. É importante referir que a Apo-SOD1 tem na sua constituição 4 resíduos de cisteína, sendo que dois deles participam numa ligação per-sulfureto, enquanto os restantes se encontram livres.

A primeira informação que é possível retirar do gel obtido (Figura 3.25), é que a Apo-SOD1, num gel SDS-PAGE parcialmente desnaturante, migra sempre sob a forma de monómero, uma vez que mesmo na amostra que não contém TCEP (primeiro poço a contar da esquerda) ela migra dessa forma. No entanto, uma vez que a incubação com AMS ocorre antes da corrida do gel, é possível extrapolar, a partir do padrão de ligação do AMS, se a proteína no início se encontrava sob a forma de dímero ou monómero.



**Figura 3.25** – Gel SDS-PAGE referente ao estudo da influência do TCEP na estrutura quaternária da Apo-SOD1. No primeiro poço (esquerda) está presente a Apo-SOD1 sem TCEP nem AMS, enquanto no último poço (direita) a amostra contém TCEP. Nos restantes poços está a proteína incubada com diferentes concentrações de agente redutor.

No que diz respeito às amostras preparadas na altura da elaboração do gel (0h incubação), é possível verificar que sem a adição de TCEP (segundo poço a contar da esquerda), ocorre a ligação de duas moléculas de AMS, uma vez que a amostra migra ligeiramente menos que a amostra à qual não foi adicionado AMS (primeiro poço). Este resultado indica que, na ausência de TCEP, a ligação per-sulfureto se encontra intacta e que, portanto, antes de correr a amostra no gel esta encontra-se,

essencialmente, na forma de dímero. Quando é adicionado TCEP, a uma concentração de 2mM, já se detectam duas bandas principais: a banda de menor migração, correspondente à Apo-SOD1 com 4 moléculas de AMS ligadas; e a de maior migração, correspondente à Apo-SOD1 com duas moléculas de AMS ligadas. Isto indica que parte das moléculas de proteína tem a ligação per-sulfureto intacta, enquanto as restantes já não a possuem. Quando se adicionam concentrações superiores de TCEP, nomeadamente 4 e 10mM, ocorre sempre a ligação de quatro moléculas de AMS, o que indica que os grupos tiol dos resíduos de cisteína se encontram no estado reduzido e, conseqüentemente, que não existe ligação per-sulfureto. Indirectamente, é possível concluir que, utilizando essas concentrações, a amostra inicial (antes de correr o gel) já era composta por monómeros de Apo-SOD1.

No caso em que se procedeu a uma incubação de 24h, é possível observar que, independentemente da concentração, a presença de TCEP leva à ligação de quatro moléculas de AMS, o que indica que a ligação per-sulfureto é inexistente. Ao contrário do que aconteceu nas amostras que não foram incubadas, a uma concentração de 2mM de TCEP, é detectada apenas uma banda, o que significa que todas as moléculas de proteína têm os grupos tiol livres (-SH).

Em suma, é possível afirmar que com uma concentração de 2mM de TCEP temos um estado destabilizado da Apo-SOD1 mas não totalmente reduzido, visto que algumas moléculas de proteína ainda mantêm a ligação per-sulfureto e, conseqüentemente, estão sob a forma de dímero. No entanto, isto apenas se verifica quando as amostras não são incubadas durante 24h, a 37°C com agitação.

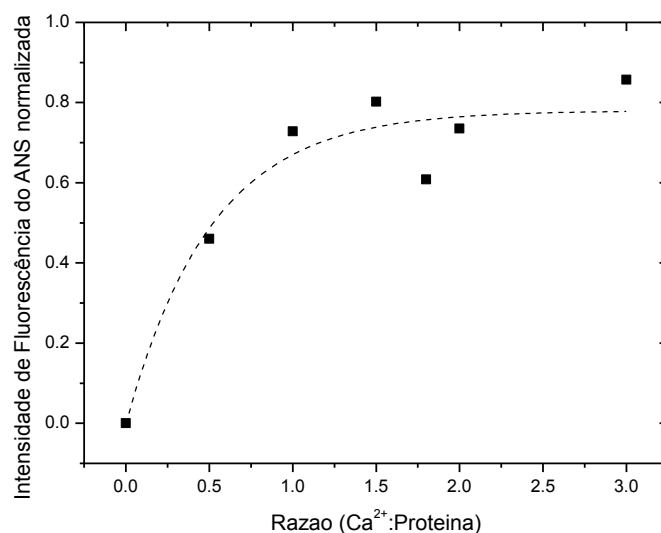
### **3.6.2. Ião $\text{Ca}^{2+}$ promove a formação de agregados amilóide da Apo-SOD1 após 24h de incubação**

Depois de se perceber qual a concentração de TCEP que permite destabilizar o dímero e obter uma mistura de populações na qual existem moléculas de Apo-SOD1 com a ligação per-sulfureto intacta e outras sem esta ligação, passou-se ao objectivo principal deste estudo, ou seja, analisar a influência do ião  $\text{Ca}^{2+}$  nos fenómenos de agregação e de formação de fibrilas amilóides pela Apo-SOD1, no estado destabilizado, promovido pela presença do redutor.

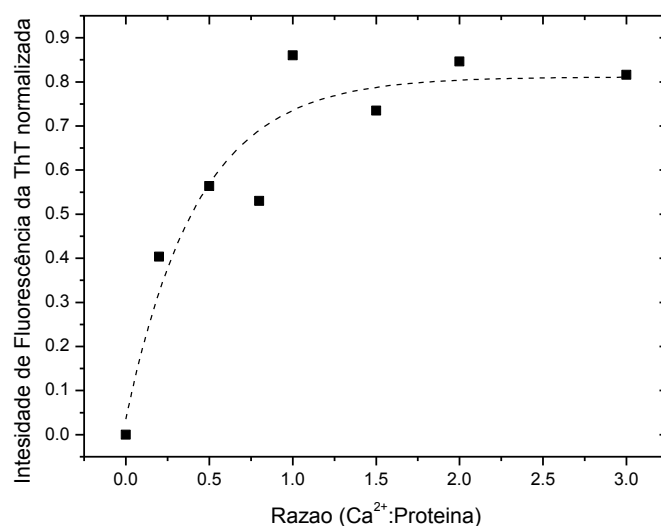
Após o período de incubação e a respectiva diluição de cada amostra, efectuaram-se espectros de fluorescência baseados em fluoróforos extrínsecos, nomeadamente, o ANS e a ThT.

Os resultados obtidos são apresentados nas figuras 3.26 e 3.27. É possível observar que, quer para o ANS quer para a ThT, ocorre inicialmente um aumento da intensidade de fluorescência à medida que aumenta a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ , sendo que atinge o valor máximo quando a razão  $\text{Ca}^{2+}$ :Proteína é, aproximadamente, igual a um, estabilizando de seguida. É importante referir que a Apo-SOD1 incubada sem  $\text{Ca}^{2+}$  (razão 0) também apresenta valores de intensidade de fluorescência de ThT superiores ao controlo (sem proteína), o que está de acordo com o esperado uma vez que tem sido descrito que a Apo-SOD1, quando incubada a 37°C e a pH fisiológico, forma fibrilas amilóides capazes de ligar ThT (Chattopadhyay et al, 2008).

O facto de ocorrer uma estabilização da intensidade de fluorescência e de essa estabilização ocorrer após a razão 1, poderá indicar que o processo em causa é bastante específico e inclui a interacção de um ião cálcio por molécula de Apo-SOD1.



**Figura 3.26** – Resultados de espectroscopia de fluorescência do ANS referentes às amostras de Apo-SOD1 incubada, durante 24h, com diferentes concentrações de Ca<sup>2+</sup>. Mediu-se a intensidade de fluorescência do ANS para cada amostra e, de seguida, representou-se o valor de fluorescência a 480nm de cada espectro, após normalização, em função da razão Cálcio:Proteína. Os resultados apresentados correspondem à média de 3 ensaios realizados. A linha a tracejado serve, apenas, para indicar a tendência.



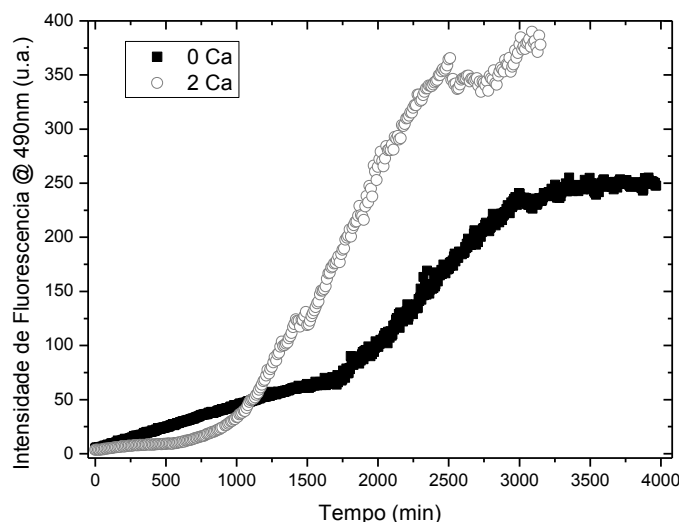
**Figura 3.27** – Resultados de espectroscopia de fluorescência da ThT referentes às amostras de Apo-SOD1 incubada, durante 24h, com diferentes concentrações de Ca<sup>2+</sup>. Mediu-se a intensidade de fluorescência da ThT para cada amostra e, de seguida, representou-se o valor de fluorescência a 480nm de cada espectro, após normalização, em função da razão Cálcio:Proteína. Os resultados apresentados correspondem à média de 3 ensaios realizados. A linha a tracejado serve, apenas, para indicar a tendência.

Estes resultados indicam que, num ambiente destabilizado pelo redutor TCEP, o íon  $\text{Ca}^{2+}$  promove alterações na estrutura da Apo-SOD1, nomeadamente, leva ao aumento das zonas hidrofóbicas expostas ao solvente (aumento da intensidade de fluorescência do ANS) e potencia fenómenos de agregação e formação de fibrilas amilóides (aumento da intensidade de fluorescência da ThT).

### 3.6.3. Cinética de agregação monitorizada através da sonda ThT

Após os resultados bastante prometedores obtidos depois da incubação da Apo-SOD1 com o íon  $\text{Ca}^{2+}$  durante 24h, em ambiente redutor, optou-se por estudar a cinética de agregação da proteína, ao longo do tempo, em modo contínuo, através da sonda ThT, tal como tem sido descrito na literatura (Banci et al, 2007).

As condições utilizadas foram idênticas às anteriores, ou seja, incubou-se a Apo-SOD1 com 2mM de TCEP e uma concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  duas vezes superior à de proteína (razão 2). No entanto, desta vez, foi adicionada ThT juntamente com os restantes reagentes e a amostra esteve sempre sob agitação magnética. Como controlo, foi realizado o mesmo procedimento mas sem a adição de íon  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figura 3.28** – Cinética de ligação da ThT referente às amostras de Apo-SOD1 incubada com (razão 2) e sem  $\text{Ca}^{2+}$  e com uma concentração de 2mM de TCEP. Mediu-se a intensidade de fluorescência da ThT a 490nm a cada 10min, num total de 4000min.

Analisando os resultados obtidos (Figura 3.28) é possível constatar que a fase latência sofre alterações, passando de, aproximadamente 1750 minutos, no caso da amostra sem  $\text{Ca}^{2+}$  (linha preta), para cerca de 750 minutos, quando é adicionado  $\text{Ca}^{2+}$  à amostra (linha cinzenta). Isto significa que a adição do íon  $\text{Ca}^{2+}$  permite acelerar o processo, fazendo com que o aumento da intensidade de

fluorescência da ThT comece bastante mais cedo. Além disso, o declive da fase exponencial, que corresponde ao período de formação das fibrilas amilóides, é superior no caso em que é adicionado o ião em estudo. Assim, é possível afirmar que o ião  $\text{Ca}^{2+}$  potencia a formação de fibrilas amilóides pela Apo-SOD1.

É importante realçar, também, que o valor máximo de intensidade de fluorescência atingido pela amostra com  $\text{Ca}^{2+}$  é superior ao da amostra sem adição deste ião, o que indica que há um maior número de moléculas de ThT ligadas e, conseqüentemente, uma maior formação de fibrilas amilóides.

Os resultados obtidos neste estudo, realizado de forma contínua ao longo do tempo, estão de acordo com os obtidos para uma incubação de 24h, ou seja, parece ser um facto que o ião  $\text{Ca}^{2+}$  potencia, *in vitro*, a formação de fibrilas amilóides pela proteína Apo-SOD1.



## 4. Conclusões

A Esclerose Lateral Amiotrófica é uma doença neurodegenerativa progressiva e fatal, na qual os pacientes acabam por falecer 3 a 5 anos após se iniciarem os sintomas. Apesar de as manifestações externas estarem bem estabelecidas, a etiologia da ELA está muito longe de ser conhecida, uma vez que se trata de uma doença bastante complexa, com componente genética, mas, também, “ambiental”, e na qual existem diferentes alterações celulares, nomeadamente, agregação proteica intracelular, excitotoxicidade induzida por glutamato, disfunção mitocondrial, entre outros.

Este trabalho pretendeu dar um contributo válido para o aumento do conhecimento em relação a esta patologia, mais concretamente ao nível do estudo da contribuição dos agregados proteicos para o desenvolvimento da mesma. Assim, efectuou-se um estudo *in vitro* sobre a influência do ião  $\text{Ca}^{2+}$ , um dos iões presentes em elevadas concentrações no espaço sináptico, na estrutura e estabilidade da Apo-SOD1 e, ainda, na formação de agregados amilóide pela mesma proteína.

Observou-se que o ião  $\text{Ca}^{2+}$  afecta a estrutura secundária da Apo-SOD1, promovendo a transformação de estrutura com enrolamento aleatório em estrutura secundária bem definida. Contudo, estas alterações não interferem na afinidade entre a proteína e um dos iões que esta liga, isto é, o ião  $\text{Zn}^{2+}$ . Além disso, o ião  $\text{Ca}^{2+}$  não afecta nem a estabilidade térmica nem a estabilidade química da Apo-SOD1. No que diz respeito às estruturas terciária e quaternária da proteína, o ião  $\text{Ca}^{2+}$ , por si só, provoca alterações, nomeadamente ao nível da hidrofobicidade da sua superfície. No entanto, o seu efeito é, fortemente, potenciado se a proteína estiver destabilizada, mais concretamente, se esta for incubada com o redutor TCEP. Desta forma, num ambiente destabilizado, o ião  $\text{Ca}^{2+}$  promove o aumento das zonas hidrofóbicas da proteína expostas ao solvente, bem como, fenómenos de agregação e formação de fibrilas amilóides pela Apo-SOD1.

Os resultados obtidos vêm de encontro às informações recentes da literatura, que indicam que os pacientes com ELA têm problemas ao nível da regulação dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  (Cozzolino et al, 2008) (Jaiswal & Keller, 2009) e que, conseqüentemente, este ião poderá ter uma grande influência na ELA (Tradewell et al, 2011). A grande maioria dos estudos efectuados, actualmente, foca-se na influência do ião  $\text{Ca}^{2+}$  na morfologia e função das mitocôndrias e do retículo endoplasmático (Jahn et al, 2006) (Cousse et al, 2011), uma vez que estes têm um papel fundamental no tamponamento deste ião. Contudo, e tal como é demonstrado aqui, o ião  $\text{Ca}^{2+}$  pode influenciar, directamente, o *fold*ing e *misfold*ing da SOD1, o que leva a que esta abordagem deva ser explorada com maior ênfase.

No que diz respeito a futuros estudos, seria interessante avaliar o efeito do ião  $\text{Ca}^{2+}$  na Apo-SOD1 em ambiente celular, mais concretamente, avaliar a citotoxicidade das fibrilas amilóides formadas. Além disso, seria interessante estudar o efeito dos iões  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  na estrutura da Apo-SOD1, uma vez que estes iões metálicos também se encontram presentes, em elevadas concentrações, no espaço sináptico.

Uma vez determinada a etiologia da ELA, as terapias que impeçam a progressão da doença irão, certamente, aparecer, mas até lá as terapias sintomáticas e paliativas continuam a ajudar a que os pacientes enfrentem os desafios da ELA com dignidade e com o conforto possível.

## 5. Bibliografia

Ahl IM, Lindberg MJ, Tibell LA (2004) Coexpression of yeast copper chaperone (yCCS) and CuZn-superoxide dismutases in *Escherichia coli* yields protein with high copper contents. *Protein Expr Purif* **37**: 311-319

Alberts, B. et al. 2002. The Shape and Structure of Proteins. *In* Molecular Biology of the Cell, 4<sup>a</sup> ed, Garland Science, New York and London.

Andersen PM, Sims KB, Xin WW, Kiely R, O'Neill G, Ravits J, Piro E, Harati Y, Brower RD, Levine JS, Heinicke HU, Seltzer W, Boss M, Brown RH (2003) Sixteen novel mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase gene in amyotrophic lateral sclerosis: a decade of discoveries, defects and disputes. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* **4**: 62-73

Anfinsen CB (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**: 223-230

Banci L, Bertini I, Boca M, Girotto S, Martinelli M, Valentine JS, Vieru M (2008) SOD1 and amyotrophic lateral sclerosis: mutations and oligomerization. *PLoS One* **3**: e1677

Banci L, Bertini I, Durazo A, Girotto S, Gralla EB, Martinelli M, Valentine JS, Vieru M, Whitelegge JP (2007) Metal-free superoxide dismutase forms soluble oligomers under physiological conditions: a possible general mechanism for familial ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 11263-11267

Barnham KJ, Bush AI (2008) Metals in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Curr Opin Chem Biol* **12**: 222-228

Bartlett AI, Radford SE (2009) An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 582-588

Bertini, I. et al. 1994. Bioinorganic chemistry, University Science Books, California.

Bilsland LG, Sahai E, Kelly G, Golding M, Greensmith L, Schiavo G (2010) Deficits in axonal transport precede ALS symptoms in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 20523-20528

Bleackley MR, Macgillivray RT (2011) Transition metal homeostasis: from yeast to human disease. *Biometals*

Bolognesi B, Kumita JR, Barros TP, Esbjorner EK, Luheshi LM, Crowther DC, Wilson MR, Dobson CM, Favrin G, Yerbury JJ (2010) ANS binding reveals common features of cytotoxic amyloid species. *ACS Chem Biol* **5**: 735-740

Burstein EA, Abornev SM, Reshetnyak YK (2001) Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. I. Decomposition algorithms. *Biophys J* **81**: 1699-1709

Chattopadhyay M, Durazo A, Sohn SH, Strong CD, Gralla EB, Whitelegge JP, Valentine JS (2008) Initiation and elongation in fibrillation of ALS-linked superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 18663-18668

Chattopadhyay M, Valentine JS (2009) Aggregation of copper-zinc superoxide dismutase in familial and sporadic ALS. *Antioxid Redox Signal* **11**: 1603-1614

Chiti F, Dobson CM (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* **75**: 333-366

Coussee E, De Smet P, Bogaert E, Elens I, Van Damme P, Willems P, Koopman W, Van Den Bosch L, Callewaert G (2011) G37R SOD1 mutant alters mitochondrial complex I activity, Ca(2+) uptake and ATP production. *Cell Calcium* **49**: 217-225

Cozzolino M, Ferri A, Carrì MT (2008) Amyotrophic lateral sclerosis: from current developments in the laboratory to clinical implications. *Antioxid Redox Signal* **10**: 405-443

Crouch PJ, Hung LW, Adlard PA, Cortes M, Lal V, Filiz G, Perez KA, Nurjono M, Caragounis A, Du T, Laughton K, Volitakis I, Bush AI, Li QX, Masters CL, Cappai R, Cherny RA, Donnelly PS, White AR, Barnham KJ (2009) Increasing Cu bioavailability inhibits Abeta oligomers and tau phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 381-386

Davies KJ (2000) Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* **50**: 279-289

Doucette PA, Whitson LJ, Cao X, Schirf V, Demeler B, Valentine JS, Hansen JC, Hart PJ (2004) Dissociation of human copper-zinc superoxide dismutase dimers using chaotrope and reductant. Insights into the molecular basis for dimer stability. *J Biol Chem* **279**: 54558-54566

Ellis JP, Bakke CK, Kirchdoerfer RN, Jungbauer LM, Cavagnero S (2008) Chain dynamics of nascent polypeptides emerging from the ribosome. *ACS Chem Biol* **3**: 555-566

Englander SW, Mayne L, Krishna MM (2007) Protein folding and misfolding: mechanism and principles. *Q Rev Biophys* **40**: 287-326

Ericsson UB, Hallberg BM, Detitta GT, Dekker N, Nordlund P (2006) Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Anal Biochem* **357**: 289-298

Fasman, G.D. 1996. Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules, Plenum Publishing Corp, New York, USA.

Fenton, D. E. 1995. Biocoordination chemistry. Oxford Chemistry Primers, Oxford: Oxford University Press.

Furukawa Y, O'Halloran TV (2006) Posttranslational modifications in Cu,Zn-superoxide dismutase and mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid Redox Signal* **8**: 847-867

Gomes, C. M. & Wittung-Stafshede, P. 2010. Protein Folding and Metal Ions: Mechanisms, Biology and Disease, CRC Press Group, Taylor & Francis, USA.

- Gordon PH (2011) Amyotrophic lateral sclerosis: pathophysiology, diagnosis and management. *CNS Drugs* **25**: 1-15
- Hawe A, Sutter M, Jiskoot W (2008) Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. *Pharm Res* **25**: 1487-1499
- Hennessey JP, Johnson WC (1981) Information content in the circular dichroism of proteins. *Biochemistry* **20**: 1085-1094
- Jahn K, Grosskreutz J, Haastert K, Ziegler E, Schlesinger F, Grothe C, Dengler R, Bufler J (2006) Temporospatial coupling of networked synaptic activation of AMPA-type glutamate receptor channels and calcium transients in cultured motoneurons. *Neuroscience* **142**: 1019-1029
- Jaiswal MK, Keller BU (2009) Cu/Zn superoxide dismutase typical for familial amyotrophic lateral sclerosis increases the vulnerability of mitochondria and perturbs Ca<sup>2+</sup> homeostasis in SOD1G93A mice. *Mol Pharmacol* **75**: 478-489
- Kang JH, Eum WS (2000) Enhanced oxidative damage by the familial amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu,Zn-superoxide dismutase mutants. *Biochim Biophys Acta* **1524**: 162-170
- Kayatekin C, Zitzewitz JA, Matthews CR (2010) Disulfide-reduced ALS variants of Cu, Zn superoxide dismutase exhibit increased populations of unfolded species. *J Mol Biol* **398**: 320-331
- Kelly SM, Jess TJ, Price NC (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta* **1751**: 119-139
- Kelly SM, Price NC (1997) The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochim Biophys Acta* **1338**: 161-185
- Lakowicz JR, Chowdhury MH, Ray K, Zhang J, Fu Y, Badugu R, Sabanayagam CR, Nowaczyk K, Szmanski H, Aslan K, Geddes CD (2006) Plasmon-controlled fluorescence: A new detection technology. *Proc Soc Photo Opt Instrum Eng* **6099**: 609909
- Lamb AL, Torres AS, O'Halloran TV, Rosenzweig AC (2000) Heterodimer formation between superoxide dismutase and its copper chaperone. *Biochemistry* **39**: 14720-14727
- Li Q, Vande Velde C, Israelson A, Xie J, Bailey AO, Dong MQ, Chun SJ, Roy T, Winer L, Yates JR, Capaldi RA, Cleveland DW, Miller TM (2010) ALS-linked mutant superoxide dismutase 1 (SOD1) alters mitochondrial protein composition and decreases protein import. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 21146-21151
- Lindgren M, Hammarström P (2010) Amyloid oligomers: spectroscopic characterization of amyloidogenic protein states. *FEBS J* **277**: 1380-1388
- McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* **244**: 6049-6055

Miana-Mena FJ, González-Mingot C, Larrodé P, Muñoz MJ, Oliván S, Fuentes-Broto L, Martínez-Ballarín E, Reiter RJ, Osta R, García JJ (2010) Monitoring systemic oxidative stress in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*

Munishkina LA, Fink AL (2007) Fluorescence as a method to reveal structures and membrane-interactions of amyloidogenic proteins. *Biochim Biophys Acta* **1768**: 1862-1885

Murray, R. et al. 2006. Harper's Illustrated Biochemistry. Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York.

Nelson, D et al. 2008, Lehninger principles of biochemistry, 5<sup>a</sup> ed, W.H. Freeman, New York.

Niesen FH, Berglund H, Vedadi M (2007) The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat Protoc* **2**: 2212-2221

Nobbmann U, Connah M, Fish B, Varley P, Gee C, Mulot S, Chen J, Zhou L, Lu Y, Shen F, Yi J, Harding SE (2007) Dynamic light scattering as a relative tool for assessing the molecular integrity and stability of monoclonal antibodies. *Biotechnol Genet Eng Rev* **24**: 117-128

Nordlund A, Oliveberg M (2008) SOD1-associated ALS: a promising system for elucidating the origin of protein-misfolding disease. *HFSP J* **2**: 354-364

Noy D, Solomonov I, Sinkevich O, Arad T, Kjaer K, Sagi I (2008) Zinc-amyloid beta interactions on a millisecond time-scale stabilize non-fibrillar Alzheimer-related species. *J Am Chem Soc* **130**: 1376-1383

Pace CN, Shirley BA, McNutt M, Gajiwala K (1996) Forces contributing to the conformational stability of proteins. *FASEB J* **10**: 75-83

Phillips JC, Bauer R, Dunbar J, Johansen JT (1984) A proposal for the metal geometry in yeast superoxide dismutase based on results from EXAFS spectroscopy. *J Inorg Biochem* **22**: 179-186

Philo JS (2006) Is any measurement method optimal for all aggregate sizes and types? *AAPS J* **8**: E564-571

Potter SZ, Zhu H, Shaw BF, Rodriguez JA, Doucette PA, Sohn SH, Durazo A, Faull KF, Gralla EB, Nersissian AM, Valentine JS (2007) Binding of a single zinc ion to one subunit of copper-zinc superoxide dismutase apoprotein substantially influences the structure and stability of the entire homodimeric protein. *J Am Chem Soc* **129**: 4575-4583

Pramatarova A, Laganière J, Roussel J, Brisebois K, Rouleau GA (2001) Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J Neurosci* **21**: 3369-3374

Ranjbar B, Gill P (2009) Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses- a review. *Chem Biol Drug Des* **74**: 101-120

- Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH, Scott RW, Snider WD (1996) Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* **13**: 43-47
- Rodriguez JA, Shaw BF, Durazo A, Sohn SH, Doucette PA, Nersissian AM, Faull KF, Eggers DK, Tiwari A, Hayward LJ, Valentine JS (2005) Destabilization of apoprotein is insufficient to explain Cu,Zn-superoxide dismutase-linked ALS pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 10516-10521
- Rose GD, Fleming PJ, Banavar JR, Maritan A (2006) A backbone-based theory of protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 16623-16633
- Rowland LP, Shneider NA (2001) Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* **344**: 1688-1700
- Seetharaman SV, Prudencio M, Karch C, Holloway SP, Borchelt DR, Hart PJ (2009) Immature copper-zinc superoxide dismutase and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Biol Med (Maywood)* **234**: 1140-1154
- Senisterra GA, Finerty PJ (2009) High throughput methods of assessing protein stability and aggregation. *Mol Biosyst* **5**: 217-223
- Shaw BF, Valentine JS (2007) How do ALS-associated mutations in superoxide dismutase 1 promote aggregation of the protein? *Trends Biochem Sci* **32**: 78-85
- Shi W, Zhan C, Ignatov A, Manjasetty BA, Marinkovic N, Sullivan M, Huang R, Chance MR (2005) Metalloproteomics: high-throughput structural and functional annotation of proteins in structural genomics. *Structure* **13**: 1473-1486
- Shortle D (1996) The denatured state (the other half of the folding equation) and its role in protein stability. *FASEB J* **10**: 27-34
- Soo KY, Atkin JD, Horne MK, Nagley P (2009) Recruitment of mitochondria into apoptotic signaling correlates with the presence of inclusions formed by amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutations. *J Neurochem* **108**: 578-590
- Stanssens P, Opsomer C, McKeown YM, Kramer W, Zabeau M, Fritz HJ (1989) Efficient oligonucleotide-directed construction of mutations in expression vectors by the gapped duplex DNA method using alternating selectable markers. *Nucleic Acids Res* **17**: 4441-4454
- Svensson AK, Bilsel O, Kayatekin C, Adefusika JA, Zitzewitz JA, Matthews CR (2010) Metal-free ALS variants of dimeric human Cu,Zn-superoxide dismutase have enhanced populations of monomeric species. *PLoS One* **5**: e10064
- Tradewell ML, Cooper LA, Minotti S, Durham HD (2011) Calcium dysregulation, mitochondrial pathology and protein aggregation in a culture model of amyotrophic lateral sclerosis: mechanistic relationship and differential sensitivity to intervention. *Neurobiol Dis* **42**: 265-275

Travaglini-Allocatelli C, Ivarsson Y, Jemth P, Gianni S (2009) Folding and stability of globular proteins and implications for function. *Curr Opin Struct Biol* **19**: 3-7

Trumbull KA, Beckman JS (2009) A role for copper in the toxicity of zinc-deficient superoxide dismutase to motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid Redox Signal* **11**: 1627-1639

Valko M, Morris H, Cronin MT (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* **12**: 1161-1208

Vassar PS, Culling CF (1959) Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues. *Arch Pathol* **68**: 487-498

Villanueva J, Hoshino M, Katou H, Kardos J, Hasegawa K, Naiki H, Goto Y (2004) Increase in the conformational flexibility of beta 2-microglobulin upon copper binding: a possible role for copper in dialysis-related amyloidosis. *Protein Sci* **13**: 797-809

Wilkins DK, Grimshaw SB, Receveur V, Dobson CM, Jones JA, Smith LJ (1999) Hydrodynamic radii of native and denatured proteins measured by pulse field gradient NMR techniques. *Biochemistry* **38**: 16424-16431

Winklhofer KF, Tatzelt J, Haass C (2008) The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases. *EMBO J* **27**: 336-349

Zatta P, Drago D, Bolognin S, Sensi SL (2009) Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy. *Trends Pharmacol Sci* **30**: 346-355

## **Anexo I**

### **Composição dos meios de cultura utilizados nos crescimentos celulares**

Meio de cultura *Lysogeny Broth* (LB) - Para 1L: 10g triptona, Fluka; 5g extracto de levedura, Biokan; 5g NaCl, Panreac.

Meio de cultura *Luria Agar* (LA) - Para 1L: 10g triptona, Fluka; 5g extracto de levedura, Biokan; 5g NaCl, Panreac; 15g Agar, Roth.

Meio de cultura *Terrific Broth* (TB) - Para 1L: 12g triptona, Fluka; 24g extracto de levedura, Biokan; 9,4g Mono-Hidrogenofosfato de Potássio, Merck; 2,2g Di-Hidrogenofosfato de Potássio, Merck; 4mL glicerol 87%, Merck.

## **Anexo II**

### **Composição das soluções tampão utilizadas nos géis SDS-PAGE**

Tampão de amostra:

0,125M Tris, Sigma-Aldrich ; 6% (m/v) SDS, Roth ; 20% (v/v) glicerol, Merck; 5% (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanol, Sigma-Aldrich; 0,02% (m/v) azul de bromofenol, Sigma-Aldrich, pH 6,8.

Tampão de eluição (5x)

Após diluição 1:5 : 0,025M Tris, Sigma-Aldrich; 0,192M glicina, Sigma-Aldrich; 4% SDS, Roth, pH 8,3.

### **Composição das soluções tampão utilizadas nos géis Native-PAGE**

Tampão de amostra:

0,125M Tris, Sigma-Aldrich; 20% (v/v) glicerol, Merck; 5% (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanol, Sigma-Aldrich; 0,02% (m/v) azul de bromofenol, Sigma-Aldrich, pH 6,8.

Tampão de eluição (5x)

Após diluição 1:5 : 0,025M Tris, Sigma-Aldrich; 0,192M glicina, Sigma-Aldrich, pH 8,3.

## Anexo III

### Composição dos géis SDS-PAGE realizados

Gel resolvente 12%:

	Volume ( $\mu\text{L}$ )
Água	1750
Tampão Tris-HCl 1,5M pH 8,8 com 0,3% SDS	1250
30% Acrilamida	2000
Tetrametiletilenodiamina (TEMED)	5
10% Persulfato de amónio (PSA)	25

Gel concentrador 4%:

	Volume ( $\mu\text{L}$ )
Água	1153
Tampão Tris-HCl 0,5M pH 6,8 com 0,4% SDS	625
30% Acrilamida	325
Tetrametiletilenodiamina (TEMED)	2,5
10% Persulfato de amónio (PSA)	12,5

### Composição dos géis Native-PAGE realizados

Gel resolvente 12%:

	Volume ( $\mu\text{L}$ )
Água	1750
Tampão Tris-HCl 1,5M pH 8,8	1250
30% Acrilamida	2000
Tetrametiletilenodiamina (TEMED)	5
10% Persulfato de amónio (PSA)	25

Gel concentrador 4%:

	<b>Volume (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
<b>Água</b>	1153
<b>Tampão Tris-HCl 0,5M pH 6,8</b>	625
<b>30% Acrilamida</b>	325
<b>Tetrametiletenodiamina (TEMED)</b>	2,5
<b>10% Persulfato de amónio (PSA)</b>	12,5