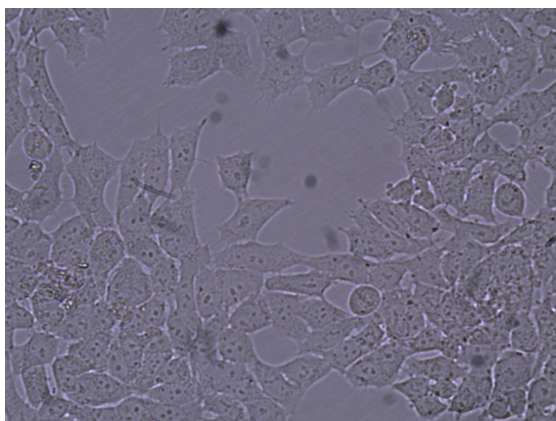




Hinc patriam sustinet

**Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa**



**Análise proteómica das fracções subcelulares de uma linha celular
de neuroblastomas humanos**

Stella Tatiana Liahuca de Esteves

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Biologia Funcional

Orientador: Professor Doutor Ricardo Boavida Ferreira

Co-orientador: Doutora Maria Cláudia Nunes dos Santos

Júri:

Presidente: Doutora Sara Barros Queiroz Amâncio, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Vogais: Doutor Ricardo Manuel de Seixas Boavida Ferreira, Professor Catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Doutora Vilma Marisa Arrojado Soares Sardão Oliveira

Doutora Helena Luísa de Araújo Vieira

Doutora Maria Cláudia Godinho Ferreira Dias Nunes dos Santos

Lisboa, 2009

Agradecimentos

Nestes dois anos que compuseram o meu Mestrado de Biologia Funcional tive oportunidade de conhecer pessoas novas, de crescer e de perceber que a vida tem diversas etapas e que estas nem sempre são acompanhadas de sucessos, mas todas são necessárias para o meu crescimento, tanto a nível pessoal como a nível profissional. Assim das várias pessoas que compõem esta longa caminhada, deixo um agradecimento às mais importantes.

Ao Professor Doutor Ricardo Boavida Ferreira por me ter aceite na sua equipa de investigação, por acompanhar sempre o trabalho, pelas suas correcções, pelo sentido crítico e pelo rigor em todas as discussões ao longo do estágio.

À Doutora Cláudia Nunes dos Santos, pelo rigor científico, pelo acompanhamento diário e pelo encorajamento em todas as etapas do estágio.

À Dra. Lucélia Tavares, pela sua ajuda indispensável em várias etapas deste estágio, sentido de organização e coordenação.

Ao Dr. Rui Pimpão, pela simpatia, amizade e por ter sido um bom companheiro de laboratório.

À Dra. Sofia Fortalezas, pela sua simpatia, amizade, criatividade e bom companheirismo proporcionando um bom ambiente de trabalho.

À Dra Meenu Tyagi, pela simpatia, companheirismo e por ser uma grande colega de laboratório e das caminhadas no regresso a casa.

À Dra. Diana Macedo, pela sua amizade de longos anos e de ser uma grande ajuda e por ser como é.

À Dra. Raissa Santos por ter sido uma excelente colegas nas aulas e pela sua amizade.

À Doutora Rita Francisco pela preciosa ajuda prestada no processo de optimização da Proteómica, e por todas as sugestões e disponibilidade para ajudar sempre que solicitada.

À Regina pela ajuda e por todas as dicas para a preparação dos gradientes.

À Doutora Vilma Sardão por gentilmente ter cedido o anticorpo policlonal anti-proteína p53 de cabra e pelas sugestões fornecidas, vitais para o presente trabalho.

À minha querida mãe, por me ter acompanhado, como sempre fez e por ser a grande mulher inspiradora que é.

Ao meu pai pelo acompanhamento e incentivo, assim como à Maria Alberta por me acompanhar e ter sempre uma palavra sensata para cada momento. Ao meu irmão Gustavo pois motiva-me a ser uma grande profissional.

à minha avó que sempre acreditou em mim.

Aos meus queridos e amados tios, que me acompanham e que me motivam a ser uma grande pessoa e grande profissional.

Às minhas amigas que me acompanharam ao longo deste ano: Neusa Figueiredo, Náara Lima, Patrícia Fernandes, Ângela Motaco e Kajal Chandulal e que sempre tiveram uma palavra de apoio.

Ao Vitor Dâmaso, ao Ruben Barreto, ao João Pinto, à Vera Pinto, ao Nuno Faia e ao Jorge Andrade pela compreensão pelas minhas ausências e a todos aqueles que me acompanham nesta jornada.

Resumo

O estudo das proteínas e das alterações que ocorrem na sua expressão durante os processos neurodegenerativos é de importância primordial. O presente trabalho teve como objectivo principal otimizar o isolamento do translatoma nuclear e mitocondrial da linha celular humana de neuroblastomas, SK-N-MC, para que seja possível a sua caracterização em estudos posteriores.

A fracção mitocondrial foi seleccionada pois este organelo é responsável pela produção da maioria da energia celular e pela formação de espécies reactivas de oxigénio estando ainda implicada em diversas doenças neurodegenerativas. O núcleo corresponde ao organelo onde decorrem processos enzimáticos-chave, a maioria dos quais essenciais à homeostase celular.

Foi feita a optimização da metodologia do fraccionamento subcelular, utilizando a centrifugação isopícnica e a electroforese em SDS-PAGE. Para controlo de qualidade recorreu-se à técnica de imunodeteção em membrana. Obteve-se, neste estudo, o translatoma total da linha celular SK-N-MC por electroforese bidimensional. O fraccionamento subcelular é uma técnica bastante exigente que requer muito tempo para que possa haver uma efectiva optimização. De futuro, será interessante proceder à identificação de algumas das proteínas que compõem esta linha celular por espectrometria de massa.

Palavras chave: fraccionamento subcelular, núcleo, mitocôndria, electroforese bidimensional, doenças neurodegenerativas.

Abstract

The study of proteins and the changes that occur in their expression during neurodegenerative disorders is of major importance. This study main goal was to optimize the isolation of nuclear and mitochondrial translatoma from human neuroblastoma SK-N-MC cell line in order to make their characterization in further studies.

The mitochondrial fraction was selected because this organelle is responsible for producing the major part of cellular energy; it is also involved in the formation of reactive oxygen species and has been implicated in several neurodegenerative diseases. The nucleus corresponds to the organelle where key enzymatic processes occur, most of them, essential to homeostasis. The methodology used to optimize subcellular fractionation was isopycnic centrifugation and SDS-PAGE. To assure quality control, we used Western Blot. In the present study using two-dimensional electrophoresis, the total translatome of the cell line SK-N-MC was obtained. The subcellular fractionation is a very demanding technique that requires long time, to achieve an effective optimization. In the future, it will be interesting to identify some proteins from this cell line by mass spectrometry.

Key words: subcellular fractionation, nuclei, mitochondria, two - dimensional electrophoresis, neurodegenerative disorders.

Executive summary

The human brain is a very demanding organ in what comes to deal with energy expenses. It is a complex organ and his biochemical characteristics, makes it prone to oxygen stress. To meet brain needs, mitochondrion is the main organelle that supplies energy. This organelle is implicated in several diseases, among those: diabetes, myopathies, and cancer and neurodegenerative diseases. On the other hand, nucleus is the most complex organelle in the cell, and nuclear proteins play a major role in controlling cell functions. Thus, studying these two organelles is very important in order to understand more about several diseases, neurodegenerative disorders included.

To study neurodegenerative diseases, proteomics have been used successfully in several studies, but one of the drawbacks of proteomics is that this powerful methodology cannot resolve all the proteins present in eukaryotic proteomes. Thus it is clear that a natural way to analyze the content of a proteome is to fractionate it into discrete groups and then analyze separately each group.

Therefore, the objective of this study was to optimize subcellular fractionation of SK-N-MC cell line, to obtain the nuclear and mitochondrial proteomes, thus in the future, we could make their proteomic characterization.

To achieve our goal to optimize subcellular fractionation we used isopycnic centrifugation in discontinuous gradient and in continuous sucrose gradients, and also SDS-PAGE. Efficacy of disruption was examined by Trypan blue staining. The amounts of proteins were measured using modified Lowry method and 2D Quant Kit, whereas the purity of mitochondrial and nuclear isolation was evaluated by Western blot analyses of mitochondrial (ATP5E) protein and nuclear protein (p53). To obtain the total translome of the cell line SK-N-MC two-dimensional electrophoresis was used. The subcellular fractionation is a very demanding technique that requires long time, to achieve an effective optimization. In the future, it will be interesting to identify some proteins in the human cell line SK-N-MC, by mass spectrometry.

Key words: subcellular fractionation, nuclei, mitochondria, two-dimensional electrophoresis, neurodegenerative disorders.

Índice geral

Agradecimentos.....	2
Índice de Figuras.....	9
Índice de esquemas	9
Índice de tabelas	10
Lista de abreviaturas	11
1. Introdução	13
1.1. Neurodegeneração.....	13
1.2. Proteómica.....	14
1.3. Fraccionamento subcelular.....	16
1.4. A mitocôndria e o núcleo – A sua importância na célula	20
Objectivos	21
2. Material e Métodos	22
2.1. Material biológico	22
2.2. Manutenção da linha celular	22
2.3. Quantificação celular.....	23
2.4. Congelamento	24
2.5. Descongelamento.....	24
2.6. Análise proteómica.....	25
a) Extracção proteica.....	25
b) Quantificação proteica das amostras para electroforese bidimensional	26
c) Electroforese bidimensional	27

i.	Focagem isoeléctrica (1ª Dimensão)	27
ii.	SDS-PAGE (2ª Dimensão)	28
d)	Visualização dos spots proteicos	29
2.7.	Fraccionamento Subcelular.....	30
2.8.	Isolamento das fracções mitocondrial e nuclear através	34
	de ultracentrifugação isopícnica	34
i.	Gradiente descontínuo de sacarose para obtenção da fracção mitocondrial.....	34
ii.	Gradiente descontínuo de sacarose para obtenção da fracção nuclear	34
iii.	Procedimento de dessalinização das amostras	35
iv.	Gradiente contínuo de sacarose para obtenção das fracções nuclear e mitocondrial ..	35
2.9.	Quantificação proteica: método de Lowry modificado	36
2.10.	Electroforese em géis de poliacrilamida SDS – PAGE	37
2.11.	Coloração com CALRED™	38
2.12.	Coloração com nitrato de prata	38
2.13.	Electrotransferência de polipéptidos	39
2.14.	Imunodeteção em membrana	39
2.15.	Coloração dos polipéptidos em membrana com Ponceau S.....	41
3.	Resultados e Discussão	42
3.1.	Optimização das condições de extracção proteica para electroforese bidimensional ..	42
3.2.	Detecção dos polipéptidos por imunodeteção em membrana para avaliação da eficiência do fraccionamento	50
a)	Imunodeteção da proteína actina	50
b)	Imunodeteção da proteína p53	51
c)	Imunodeteção da proteína ATP5E.....	55
3.3.	Optimização do fraccionamento subcelular	56
3.3.1.	Tampão de extracção	56

3.3.2. Ultracentrifugação das fracções enriquecidas em mitocôndrias em gradiente descontínuo de sacarose	62
3.3.3. Ultracentrifugação das fracções enriquecidas em núcleos em gradiente descontínuo de sacarose.....	63
3.3.4. Ultracentrifugação das fracções enriquecidas em mitocôndrias em gradiente contínuo de sacarose	64
3.3.5. Ultracentrifugação das fracções enriquecidas em núcleos em gradiente contínuo de sacarose	64
4. Conclusões e perspectivas futuras	65
5. Referências bibliográficas	67
Anexo I	71

Índice de Figuras

Figura 1 Vista ao microscópio óptico da linha celular SK-N-MC	20
Figura 2 Minigel de electroforese bidimensional da proteína total da linha celular SK-N-MC	41
Figura 3 Géis , A,B e C de electroforese bidimensional do proteoma total da linha celular SK-N-MC	44
Figura 4 Géis de electroforese bidimensional do proteoma total da linha celular SK-N-MC Análise comparativa	45
Figura 5 Gel de electroforese bidimensional do proteoma total da linha celular SK-N-MC	47
Figura 6 Imunodeteção em membrana da proteína actina nas fracções FNI- Fracção nuclear I e S-Sobrenadante	49
Figura 7 Imunodeteção em membrana da proteína p53 produzida em coelho	49
Figura 8 Imunodeteção em membrana da proteína p53 produzida em coelho	51
Figura 9 Imunodeteção em membrana da proteína p53 produzida em cabra	51
Figura 10 Imunodeteção em membrana da proteína p53 produzida em cabra	52
Figura 11 Imunodeteção em membrana da proteína ATP5E produzida em cabra	53
Figura 12 Minigel de SDS PAGE das fracções obtidas após o procedimento I	56
Figura 13 Minigel de SDS PAGE das fracções obtidas após realização do procedimento II	57
Figura 14 Minigel de SDS PAGE das fracções obtidas após realização do procedimento I Isoladamente	57
Figura 15 Minigel de SDS PAGE da fracção S (Sobrenadante) e das fracções da linha celular SK-N-MC presentes no gradiente descontínuo	60
Figura 16 Minigel de SDS PAGE da fracção FNI- (Fracção Nuclear I) e das fracções da linha celular SK-N-MC presentes no gradiente descontínuo	61

Índice de esquemas

Esquema 1 Principais etapas do fraccionamento subcelular e técnicas associadas.	16
Esquema 2 Esquema representativo das etapas do procedimento I	30.
Esquema 3 Diagrama representativo das etapas do procedimento II	32
Esquema 4 Esquema que representa as diversas metodologias utilizadas durante o processo de fraccionamento subcelular	66

Índice de tabelas

Tabela I - Exemplos de proteínas utilizadas como marcadoras de organelos	17
Tabela II - Condições utilizadas para a IEF	28

Lista de abreviaturas

2D electroforese bidimensional do Inglês *two dimensional electrophoresis*

2D-PAGE do Inglês *two dimensional -polyacrilamide gel electrophoresis*

AD doença de Alzheimer, do Inglês *Alzheimer disease*

ADP do Inglês *adenosine 5'- diphosphate*

AEBSF (clorohidrato de fluoreto de 4-(2-aminoetil)- benzenosulfonilo)

ATP do Inglês *adenosine 5'- triphosphate*

BSA do Inglês *bovine serum albumin*

CALRED Ácido calconcarboxílico

C_{bis}- concentração de bis acrilamida presente em solução

CHAPS 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1- propanosulfonato

DMSO-dimetilsulfoxido

DNA dextroribonucleic acid

DNase- desoxiribonuclease

DTT ditioneitol

EDTA Do Inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*

EGTA do Inglês *ethyleneglycol-bis-(β-aminoethyl ether)-N,N'-tetraacetic acid*

EMEM do Inglês *eagle mininum essential médium*

FCI Fracção citosólica do procedimento I

FMI Fracção membranar do procedimento I

FNI Fracção Nuclear do Procedimento I

FBS do Inglês *foetal bovine serum*

IEF Focagem isoeléctrica, do Inglês *isoelectric focusing*

MBA do Inglês *Membrane Blocking Agent*

MES do Inglês *2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid*

MM Massa molecular

PBS do Inglês *phosphate buffer saline*

PBST do Inglês *phosphate buffer saline with tween 20*

PD do Inglês *Parkinson disease*

pI ponto isoeléctrico

PSA persulfato de amónio

PVDF do Inglês *Polyvinylidene Fluoride*

S Sobrenadante

SDS do Inglês *sodium dodecyl sulphate*

SDS - PAGE do Inglês *sodium dodecyl sulphate- polyacrilamide gel electrophoresis*

TBP Do Inglês *Tributyl phosphine*

“Análise proteômica das fracções subcelulares de uma linha de neuroblastomas humanos”

TBS Do Inglês *Tris Buffer Saline*

TBST Do Inglês *Tris Buffer Saline with Tween 20*

TEMED N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina

TWEEN 20 monolaurato de polioxilenossorbitano

1. Introdução

1.1. Neurodegeneração

O nosso cérebro é que faz de nós aquilo que somos: como reagimos às diferentes situações, por quem nos apaixonamos, de que é que temos medo, o que recordamos (4). Este órgão possui elevados requisitos energéticos, tem uma concentração lipídica alta (5) e um consumo elevado de oxigénio.

O bom funcionamento do cérebro está criticamente dependente de um fornecimento contínuo de oxigénio. Embora este órgão represente apenas 2% da massa corporal, é responsável por 20% do oxigénio total consumido e pelo equivalente a 25% das reservas energéticas do corpo humano. As características fisiológicas e bioquímicas do cérebro fazem com que este órgão esteja mais susceptível ao stresse oxidativo que a maioria dos outros órgãos, devido ao consumo elevado de oxigénio, aos níveis elevados em ácidos gordos poli-insaturados, aos níveis relativamente elevados de iões metálicos de transição, para além de níveis endógenos relativamente baixos de antioxidantes (6, 7). Como resultado, ocorre a formação de espécies reactivas de oxigénio que são muito reactivas com as biomoléculas, incluindo as proteínas, lípidos, glícidos e ácidos nucleicos, o que origina alterações a nível funcional e estrutural e leva mesmo à disfunção celular (6). O stresse oxidativo está implicado em numerosas doenças, incluindo doenças neurodegenerativas (6). A oxidação das proteínas, a peroxidação lipídica, a formação de espécies reactivas e a oxidação de DNA, entre outros marcadores de stresse oxidativo, estão referidos em doenças neurodegenerativas (8). Comparando com o DNA e os lípidos, as proteínas são os alvos celulares mais abundantes para a oxidação (9). A principal fonte de energia no cérebro é o ATPⁱ, produzido a partir do ADPⁱⁱ. A maioria do ATP que se encontra no cérebro (> 95%) é produzido através da fosforilação oxidativa na mitocôndria (10).

É de salientar que as mitocôndrias não são apenas fonte de energia através da produção do ATP, mas também mantêm o cálcio intracelular dentro da gama de valores necessários para o controlo da excitabilidade neuronal e da função sináptica (11).

Os neurónios são muito vulneráveis a perturbações metabólicas. Por isso, a diminuição da produção de ATP mitocondrial ameaça a viabilidade destes, das células gliais e o funcionamento das redes neuronais, afectando assim a função cerebral normal (11). Portanto, considerando o quanto os neurónios dependem das mitocôndrias, podemos dizer, sem surpresa que existe uma ligação forte entre a disfunção mitocondrial e as doenças que afectam o cérebro (12).

ⁱ do inglês *adenosine 5'- triphosphate*

ⁱⁱ do inglês *adenosine 5'-diphosphate*

As doenças neurodegenerativas são das enfermidades mais debilitantes, pois afectam o pensamento, a capacidade de movimento, os sentimentos, a cognição e a memória (13).

De forma geral, estas doenças são doenças crónicas, progressivas e caracterizadas por depósitos de proteínas agregadas que são facilmente visualizados ao microscópio (14) e pela perda de neurónios nos sistemas motor, sensorial e cognitivo (15).

Este diverso grupo de doenças inclui as doenças neurodegenerativas comuns, como a doença de Parkinson, PDⁱⁱⁱ, a doença de Alzheimer, AD^{iv}, e outras mais raras como a doença de *Hungtinton* e a Esclerose Lateral Amiotrófica (13). Embora as mutações genéticas possam ser responsáveis por uma pequena porção de casos, a maioria dos casos existentes parecem ocorrer esporadicamente na natureza (16).

A teoria mais amplamente aceite sobre a degeneração do encéfalo nas doenças neurodegenerativas propõe que a má conformação das proteínas e a sua agregação fazem com que estas apresentem uma actividade neurotóxica (17). No entanto, o mecanismo pelo qual estes agregados promovem a disfunção sináptica e a morte neuronal permanece desconhecido (13).

1.2. Proteómica

Como se explicou, o estudo das proteínas e das alterações que ocorrem na sua expressão durante os processos neurodegenerativos é de importância primordial.

O campo da proteómica envolve a determinação das entidades proteicas, de uma célula, tecido ou organismo, sob um determinado conjunto de condições (18). Uma análise global das proteínas pelas técnicas de proteómica, não requerendo o conhecimento prévio das proteínas envolvidas e nem a vasta gama das suas componentes moleculares, pode contribuir para um cenário mais completo sobre o sistema em estudo. Nesta base, novas hipóteses podem ser formuladas e novos cenários científicos explorados (19).

Nos dias de hoje, a investigação na área da proteómica é realizada comumente através de duas estratégias complementares. A primeira, conhecida por proteómica de mapeamento celular, tem como principal objectivo definir as interacções proteína-proteína existentes dentro da célula, de modo a ser possível construir o cenário das redes complexas que constituem as vias de sinalização intracelular. A segunda estratégia, a proteómica da expressão proteica, monitoriza a expressão global de um vasto número de proteínas, num determinado tipo de célula ou tecido e, assim

ⁱⁱⁱ do inglês *Parkinson Disease*

^{iv} do inglês *Alzheimer Disease*

identifica quantitativamente como os padrões de expressão se alteram perante diferentes circunstâncias (20), tem sido utilizada na investigação do cancro (20), na investigação de diversas doenças neurodegenerativas (18, 21), no estudo da biologia de organelos (22-24) e também em estudos de plantas (25).

A técnica proteómica mais vulgarmente utilizada para avaliar a expressão diferencial de proteínas é a electroforese bidimensional em gel de poliacrilamida, 2D-PAGE^v (26). Na primeira dimensão desta técnica, as proteínas são separadas por focagem isoeléctrica numa tira que possui um gradiente de pH e migram na tira até ao ponto em que a sua carga global é zero (o seu ponto isoeléctrico). Na segunda dimensão, as proteínas que foram previamente separadas pela carga são expostas ao detergente dodecilo sulfato de sódio, SDS^{vi} sendo os polipéptidos separados de acordo com a sua velocidade de migração molecular através dos poros do gel - esta separação é aproximadamente proporcional ao logaritmo da massa molecular dos polipéptidos (27).

Os géis típicos de electroforese bidimensional podem separar cerca de 1500 a 2000 ou até 3000 polipéptidos se as condições forem favoráveis. Este número pode ser considerado adequado se tivermos em conta o estudo de proteomas procariotas simples, com cerca de 3000 genes, onde o número máximo de polipéptidos presentes nestes géis será apenas ligeiramente superior ao número de genes. Um desafio importante que esta técnica enfrenta é a análise de proteomas eucariotas mais complexos, especialmente quando são estudadas células ou tecidos de mamíferos em que o número de polipéptidos distintos presentes é muito superior aos que se conseguem detectar. O que se quer dizer é que a gama dinâmica desta técnica tem ainda que ser melhorada em alguns graus de magnitude, para que possa ir ao encontro das necessidades existentes, que neste caso é fazer um perfil fidedigno das proteínas de baixa abundância presentes em soluções complexas. Pode dizer-se que gama dinâmica é o termo mais preciso a ser utilizado, visto que esta pode ser influenciada por diversos parâmetros, alguns dos quais podem ser controlados durante a investigação, enquanto outros são inerentes às amostras em análise. A elevada diversidade química das proteínas em conjunto com a sua ampla e divergente expressão é um exemplo do que foi acabado de referir. Outro exemplo de características inerentes é o caso das células humanas padrão, onde a proteína mais abundante é a actina, com mais de 10^8 moléculas por célula, comparativamente com <1000 cópias de alguns de receptores celulares ou de factores de transcrição. Tendo em conta o poder de resolução limitado da electroforese bidimensional, a questão que se coloca é a seguinte: como relacionar as diferenças de expressão das proteínas que estão presentes no gel bidimensional com a

^v do inglês *two-dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

^{vi} do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*

biologia do sistema global, quando apenas vemos uma pequena fracção de todas as proteínas presentes? De forma a dar resposta a este desafio, a investigação proteómica tornou-se extremamente consciente da necessidade de serem implementadas estratégias de enriquecimento e/ou estratégias de pré-fraccionamento, como o fraccionamento subcelular, para que se possa eventualmente quantificar proteínas pouco expressas em células ou tecidos complexos (28).

1.3. Fraccionamento subcelular

Se assumirmos que existem apenas 500 proteínas no plasma, cada uma presente em 20 formas glicosiladas e em 5 tamanhos diferentes, teremos, então, 50. 000 formas moleculares distintas. Considerando a hipótese que existem 50. 000 produtos de genes no proteoma humano cada um tendo , em média, 10 variantes de *splicing*, produtos com clivagem e modificações pós-tradução, então o rendimento seria de 500. 000 formas proteicas (29). Tendo este cenário em consideração e a complexidade deste problema, podemos verificar que o fraccionamento do proteoma em diferentes grupos é um dos caminhos de monitorizar diferenças na expressão proteica (29).

O fraccionamento subcelular foi inicialmente aplicado para separar organelos provenientes de fígado de rato, nomeadamente o núcleo, que foi isolado em 1977 por Berezney, e colaboradores (30). O fraccionamento consiste em dois passos muito importantes (Esquema I): (1) a disrupção da organização celular (homogeneização) e (2) o fraccionamento do homogeneizado para que ocorra a separação das diferentes populações de organelos. Este homogeneizado pode ser resolvido por centrifugação diferencial em diversas fracções (da mais densa para a menos densa) – núcleo, mitocôndrias pesadas, rede do citoesqueleto e membrana plasmática; mitocôndrias leves, lisossomas e peroxissomas; Golgi, endossomas e microssomas, retículo endoplasmático; e, por fim o citosol. Cada população de organelos é caracterizada pela massa, densidade e carga entre outras propriedades em que a separação se baseia (31).

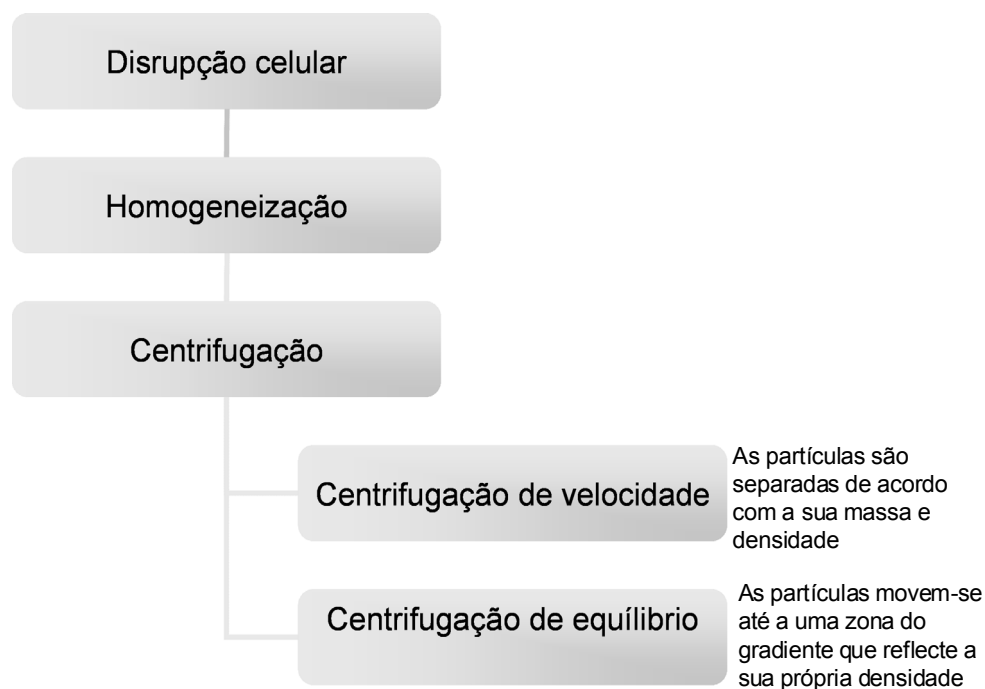
Dois grandes problemas impediram o desenvolvimento de protocolos padronizados prontos a serem colocados em prática na área do fraccionamento subcelular: primeiro, compartimentos subcelulares diferentes têm semelhanças a nível físico, o que faz com que se concentrem nas mesmas fracções de densidade nos gradientes convencionais; segundo, embora as culturas de células ou de tecidos sejam comumente utilizadas para o fraccionamento, pois podem ser manipuladas de uma maneira que é impossível de conseguir com tecidos animais, são mais difíceis de fraccionar que a maioria dos tecidos, presumivelmente devido às diferenças a nível da organização do citoesqueleto. É essencial salientar que a purificação completa é, com algumas

“Análise proteómica das fracções subcelulares de uma linha de neuroblastomas humanos”

excepções, quase impossível. Contudo, esta abordagem é muito poderosa e muitos laboratórios começaram por aplicar o fraccionamento subcelular incluído em estudos de proteómica (32).

Uma das limitações no fraccionamento bem sucedido para amostras oriundas de cultura de células é a obtenção de um homogeneizado ideal, ou seja, a libertação dos organelos e de outros constituintes celulares numa suspensão de componentes individuais e intactos (33). Muito frequentemente, são observados agregados citoplasmáticos, que contêm elementos do citoesqueleto assim como diversos organelos. Consequentemente, os organelos ou permanecem associados aos elementos do citoesqueleto, à volta do núcleo, ou ficam presos em grandes agregados que facilmente sedimentam. Uma das fontes potenciais de agregação é o núcleo, que se desagrega se as condições de homogeneização forem muito duras, com a consequente libertação de DNA. A organização citoplasmática e do citoesqueleto varia imenso entre diferentes culturas de células e de tecidos, sendo por isso é necessário que as condições de homogeneização sejam optimizadas para cada linha celular (22).

A centrifugação é um dos métodos mais antigos e continua ser o método mais efectivo para o



Esquema 1- Principais etapas do fraccionamento subcelular e técnicas associadas.

isolamento de organelos (29), sendo uma das vantagens o facto de esta técnica ser fácil de colocar em prática e de combinar com as técnicas analíticas de proteómica (22).

Utilizando esta técnica é possível isolar de forma razoavelmente pura, organelos subcelulares como o núcleo, as mitocôndrias, os lisossomas e os peroxissomas. Se o objectivo do trabalho for

investigar o proteoma de algum dos organelos acima citados, este é claramente o método mais directo e eficiente para o enriquecimento da fracção proteica em estudo (29)

A separação pode ser conseguida através de dois métodos diferentes de centrifugação: velocidade e equilíbrio. Nas separações de velocidade, as partículas movem-se na direcção da força centrífuga e são separadas de acordo com o seu peso e densidade. Há portanto uma dependência em relação ao tempo (pois, eventualmente tudo vai acabar por sedimentar ou concentrar-se na zona do gradiente correspondente à sua densidade). Nas separações de equilíbrio (isopícnica), as partículas movem-se até à zona do gradiente que reflecte a sua própria densidade (31). Utilizando separações de equilíbrio, podem ser utilizados dois tipos de gradientes: contínuos e descontínuos. Os gradientes descontínuos permitem obter fracções enriquecidas nos diferentes compartimentos que estão na interface de diferentes concentrações do meio utilizado para fazer o gradiente. O material enriquecido pode ser colhido num pequeno volume. Contudo, pequenas diferenças a nível de densidade podem não ser resolvidas. Para uma melhor resolução, as separações de equilíbrio com gradientes contínuos são o método de eleição; nestes gradientes, após a centrifugação, os organelos distribuem-se ao longo do gradiente de acordo com as suas densidades específicas. Uma das desvantagens dos gradientes contínuos é o baixo rendimento em organelos resultando em fracções bastante diluídas (31). Este aspecto deriva do facto de cada tipo de organelo não corresponder a uma dada densidade mas antes a uma gama mais ou menos ampla de densidades. Esta gama exhibe frequentemente um padrão de sobreposição parcial com a gama de outro organelo.

É importante salientar que num processo de isolamento de organelos onde os processos de homogeneização mecânica são pouco vigorosos, as estruturas membranares e os organelos intactos são colhidos dos gradientes de densidade. Por isso, as proteínas do lúmen do retículo endoplasmático e as enzimas dos organelos intactos são preservadas (34, 35).

Para avaliação da integridade mecânica e funcional dos organelos, vários métodos podem ser empregues. Primeiro, imunodeteção em membrana para monitorizar a distribuição de proteínas marcadoras de organelos específicos (31, 34). Segundo, em termos de análise morfológica de todas as fracções, técnicas rotineiras de microscopia óptica ou electrónica podem ser utilizadas (22).

Existem diversos marcadores para os diferentes organelos celulares (Tabela I). Para o núcleo pode ser utilizada a nucleoporina np62 (36), o p53 (37), para o lisossoma pode ser utilizada a catepsina B (36); para a mitocôndria pode ser utilizado citocromo c oxidase (38), o tom 20 (39) e o ATP5E (40, 41).

O resultado obtido através da utilização dos marcadores fornece a informação necessária para que se possa julgar a eficiência do protocolo utilizado para homogeneização e fraccionamento.

“Análise proteômica das fracções subcelulares de uma linha de neuroblastomas humanos”

O fraccionamento subcelular é uma abordagem que tem sido utilizada em diversos estudos, nomeadamente na área da biologia dos organelos (22, 42-44), na investigação de doenças neurodegenerativas (36) ou para estudar diferenças de expressão das proteínas na investigação do cancro (45, 46). Nesta área existem estudos recentes que têm como objectivo melhorar as diversas etapas desta metodologia e comparar as diferentes abordagens que são utilizadas em cada estudo específico (23, 39), pois esta técnica tem sempre que ser optimizada para cada experiência e de acordo com o objectivo pretendido (22) .

Tabela I- Exemplos de proteínas utilizadas como marcadoras de organelos

Organelo	Marcador
Núcleo	p53 (37) nucleoporina np62 (36)
Mitocôndria	ATP5E (40, 41) citocromo c oxidase (38) tom 20 (39)
Lisossoma	catepsina B (36)

1.4. A mitocôndria e o núcleo – A sua importância na célula

A mitocôndria é um dos organelos mais complexos da célula, produzindo a maioria da energia celular (42).

Este organelo possui o seu próprio genoma circular (DNA mitocondrial - mtDNA), com sistemas específicos de transcrição, tradução e de construção proteica (47).

Também existem diversos estudos que relacionam as mitocôndrias com a morte celular, a homeostase de cálcio, a produção de espécies reactivas de oxigénio e com a síntese de ATP (48).

Recentemente, as técnicas baseadas na proteómica têm sido aplicadas na identificação de proteínas mitocondriais, em animais (43) e em diversas linhas celulares (42-44).

Destes estudos foram identificados vários grupos de proteínas mitocondriais e a sua expressão diferencial nas várias condições estudadas, stresses e doenças. Estes resultados levam a uma melhor percepção da biologia e das (dis)funções da mitocôndria (23).

Pelo facto deste organelo ter um papel crucial na produção de energia, as alterações na sua função podem levar ao desenvolvimento de diversas doenças, nomeadamente cancro (49), doenças neurodegenerativas (11, 50), obesidade e diabetes (51).

É necessária uma investigação mais profunda para se saber em que eventos biológicos estão envolvidas as proteínas mitocôndrias. Para isso, é preciso fazer uma análise à mitocôndria através das técnicas de proteómica, em particular uma análise das mitocôndrias das linhas celulares neuronais. Este tipo de estudo é essencial para a investigação relacionada com as doenças do sistema nervoso central e para a descoberta de marcadores de diagnóstico da diminuição neuronal (42).

O núcleo por outro lado, é provavelmente o mais complexo organelo celular (52) e para que seja adquirido o conhecimento abrangente da sua biologia é necessária uma identificação completa do seu proteoma (19).

Neste organelo ocorrem processos enzimáticos-chave e a maioria destes processos é essencial para a homeostase celular: síntese de DNA, transcrição, replicação e reparação, organização da cromatina, silenciamento ao nível dos genes e dos cromossomas (53).

Por isso, a identificação em larga escala das proteínas que compõem este organelo obtido a partir de células humanas e a caracterização das suas características físico-químicas irá fornecer ferramentas para se compreender melhor a biologia do núcleo (53).

Em particular, a proteómica da expressão nuclear permite uma investigação da expressão génica pois identifica os reguladores da manutenção da cromatina e dos genes (19).

Objectivos

O grupo de investigação Biologia da Doença e do Stresse onde foi realizado o presente trabalho tem como um dos objectivos observar diferenças a nível das proteínas do núcleo e da mitocôndria quando as células neuronais da linha celular SK-N-MC são submetidas a agentes naturais antioxidantes, como os polifenóis oriundos das plantas, previamente a um stresse oxidativo. O stresse oxidativo imposto mimetiza, nestas células um modelo de neurodegeneração.

Considerando este objectivo global do laboratório, o presente estágio teve como objectivo principal otimizar o fraccionamento das fracções nuclear e mitocondrial para que futuramente se pudesse fazer a sua caracterização proteómica. Dentro deste objectivo principal, o trabalho apresentado tinha vários objectivos a cumprir:

- 1.** Optimização da obtenção do proteoma total das células SK-N-MC por electroforese bidimensional;
- 2.** Optimização do procedimento de fraccionamento subcelular das células SK-N-MC;
- 3.** Avaliação da eficiência do fraccionamento subcelular das células SK-N-MC por SDS-PAGE;
- 4.** Avaliação da pureza das fracções nuclear e mitocondrial, por imunodeteção em membrana;
- 5.** Obtenção do proteoma das fracções enriquecidas em mitocôndrias e núcleos.

2. Material e Métodos

2.1. Material biológico

A linha celular SK-N-MC é um neuroblastoma humano com actividade dopaminérgica moderada (ECACC 90022302), (Figura 1), cujo lote inicial foi encomendado à *European Collection of Cell Cultures* (ECACC - Porto Down, Reino Unido), na sua 32ª passagem. Durante os ensaios, foi necessário propagar, congelar/descongelar e quantificar a linha celular. Estes procedimentos foram realizados tal como aconselhados no boletim informativo da ECACC para a linha celular em estudo. Todos os ensaios posteriormente descritos com esta linha celular foram realizados em condições de assepsia.

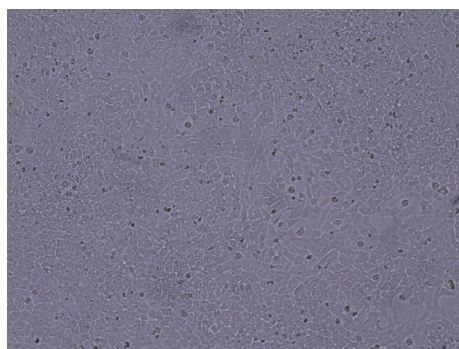


Figura 1 Vista ao microscópio óptico da linha celular SK-N-MC com cerca de 90% de confluência (Ampliação 100X).

2.2. Manutenção da linha celular

A manutenção da linha celular SK-N-MC foi feita através da propagação da mesma em monocamada em T-flasks com área superficial de crescimento de 25 cm² ou de 75 cm², a 37 °C, 5% (v/v) CO₂ contendo 7 mL ou 15 mL de meio de cultura, respectivamente. O meio de cultura é composto por EMEM^{vii} (Sigma), 10% (v/v) FBS^{viii} (GIBCO), 2 mM glutamina (Sigma), 1% (m/v) aminoácidos não essenciais (Sigma) e 1 mM de piruvato de sódio (Sigma).

A propagação desta linha é realizada quando praticamente toda a superfície disponível está ocupada (confluência 80-90%). Para isso, é necessário retirar o meio de cultura, lavar a monocamada

^{vii} Do Inglês *Eagle Minimum Essential Medium*

^{viii} Do Inglês *Foetal Bovine Serum*

celular com 2 mL de PBS^{ix}, pH 7,2, sem Ca²⁺ e Mg²⁺, sendo este constituído por 0,9% (m/v) NaCl, 0,021% (m/v) KH₂PO₄ e 0,048% (m/v) Na₂HPO₄, de modo a remover vestígios de soro que possam inibir a enzima tripsina-EDTA^x (enzima que promove a desagregação das células à superfície do T-flask). O PBS é retirado e é colocado 1 mL de 0,05% (m/v) tripsina-EDTA. É feita uma incubação de alguns minutos a 37 °C, 5% (v/v) CO₂. Após libertação das células, são adicionados 4 mL de meio de cultura de forma a inactivar a enzima, e ressuspende-se cuidadosamente as células. Para realizar os ensaios pretendidos, subcultivaram-se as células em T-flasks de 25 cm², T-flasks de 75 cm² e em placas de 6 poços com 9,6 cm² de área.

2.3. Quantificação celular

A quantificação celular permitiu monitorizar o crescimento celular através da contagem do número total de células viáveis existentes na superfície de crescimento. Para tal, utilizou-se o método de exclusão do azul tripano que se baseia na integridade da membrana celular. A solução utilizada neste método tem a concentração de 0,1% (v/v) do corante azul de tripano (GIBCO) em PBS sem Ca²⁺ e Mg²⁺, e é obtida por diluição da solução *stock* do corante azul de tripano (GIBCO) 0,4% (v/v) seguida de filtração em seringa com um filtro estéril de membrana de acetato de celulose (0,45µm; VWR). Deste modo, após libertação das células como descrito na **secção 2.2**, diluiu-se a amostra, na proporção de 1:20, com uma solução 0,1% (v/v) de azul tripano, sendo a amostra, após homogeneização, colocada nas duas câmaras de contagem do hemacitómetro (Fuchs-Rosenthal), em que cada câmara é composta por 16 quadrados. As células não viáveis são permeáveis ao azul tripano, pois a sua membrana está mais frágil e apresentam cor azul, enquanto que as células viáveis são impermeáveis ao corante, permanecendo incolores ou refractárias. A concentração celular (nº de células viáveis. mL⁻¹ de meio) foi obtida de acordo com a fórmula:

$$\text{Concentração celular} = \frac{\text{Número de células viáveis em cada quadrado} * (5000)^a}{\text{Quadrados contabilizados}}$$

^a - Factor de correcção associado ao hemacitómetro Fuchs-Rosenthal

^{ix} Do Inglês *Phosphate Buffer Saline*

^x Do Inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*

2.4. Congelamento

De modo a criar *stocks* de trabalho de células, procedeu-se ao congelamento das mesmas em “criotubos”, que foram colocados nas arcas congeladoras a -80 °C quando estas apresentaram uma confluência de cerca de 90% ao T-flask. Após libertação das células como indicado na **secção 2.2**, foi efectuada uma contagem, como descrito na **secção 2.3**, para que os *stocks* apresentassem a mesma concentração de células. Centrifugou-se a suspensão celular em tubos estéreis a 200 *g*, 4 °C (Centrifuga Beckman Coulter Modelo X12R) durante 10 min, removeu-se cuidadosamente o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento celular numa solução de congelamento contendo 95% (v/v) de FBS e 5% (v/v) de DMSO^{xi} que, sendo um agente citoprotector, protege as células da formação dos cristais de gelo durante o congelamento; contudo o DMSO é citotóxico à temperatura ambiente. Desta forma, esta solução foi previamente preparada e mantida em gelo. Pipetou-se cerca de 1 mL da suspensão celular para “criotubos”, que se colocaram numa caixa 5100 Cryo 1 °C Freezing Container (Nalgene) e que se armazenou a -80 °C. Esta caixa contém isopropanol no seu interior, o que proporciona um congelamento lento e progressivo das células a uma taxa de arrefecimento de cerca de 1 °C.min⁻¹.

2.5. Descongelamento

O procedimento de descongelamento foi realizado rapidamente de modo a evitar danos celulares devido à toxicidade do DMSO. De acordo com a concentração celular necessária para utilizar no estudo, retiraram-se um ou mais “criotubos” da arca a -80 °C e colocaram-se no banho termostaticado a 37 °C para descongelar. Pipetou-se a suspensão celular do “criotubo” para um tubo estéril com 9 mL de meio de cultura. Centrifugou-se a 200 *g*, 10 min a 22 °C (Centrifuga Beckman Coulter Modelo X12R) para remover o DMSO. Removeu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento celular em 10 mL de meio de cultura, previamente aquecido a 37 °C. Transferiu-se a suspensão celular para um T-flask de 25 cm² de área de cultura.

^{xi} dimetilsulfóxido

2.6. Análise proteómica

Com o intuito de analisar o proteoma total das células SK-N-MC e o proteoma dos organelos em estudo, nomeadamente a mitocôndria e o núcleo, utilizou-se o método de electroforese bidimensional. Esta técnica, apresentada pela primeira vez em 1975 por O’Farrell e Klose (26) e melhorada posteriormente por Görg e colegas (54), tem possibilitado a separação de inúmeras proteínas, dando informação acerca dos seus pontos isoeléctricos e massas moleculares. As técnicas necessárias para esta análise encontram-se descritas em seguida.

a) Extracção proteica

Para se obter o extracto proteico e se preparar as amostras para a focagem isoeléctrica (IEF^{xii}), foi necessário submeter as mesmas a condições de desnaturação, desagregação, solubilização, redução proteica, eliminar componentes como DNA, lípidos, sais e inibir proteases que poderiam interferir com a análise (55). Deste modo, as células SK-N-MC com 80 a 90% de confluência em T-flasks de 25 cm² de área, foram previamente lavadas duas vezes com 2 mL de PBS. O PBS foi retirado e as células foram lisadas com a solução tampão apropriada para uma eficiente extracção e análise do proteoma. Estudos preliminares no laboratório (56) levaram a que fossem testados vários protocolos até se conseguir obter o melhor padrão proteico. A metodologia utilizada foi a de colocar 100 µL de uma solução de lise, cuja composição base é: 7 M ureia, 2 M tiureia, 4% (m/v) CHAPS^{xiii}, 60 mM DTT^{xiv}, 0,4% (v/v) Triton X-100, tendo sido testada a adição de vários componentes como, a DNase^{xv} e um cocktail de inibidores (**vide resultados**), componentes já previamente testados mas cuja eficiência era necessário assegurar. Foi feita uma incubação durante 1 h a 37 °C, na presença de 5% (v/v) CO₂, com o referido tampão de lise e os lisados celulares foram centrifugados a 16000 g, 30 min a 4 °C (Centrifuga Eppendorf modelo 5415 R). Recolheu-se o sobrenadante correspondente à fracção das proteínas solúveis e armazenou-se a -80 °C, até posterior utilização.

^{xii} Do inglês *isoelectric focusing*

^{xiii} 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato

^{xiv} ditioneitol

^{xv} desoxirribonuclease

b) Quantificação proteica das amostras para electroforese bidimensional

A quantificação proteica permitiu obter a informação sobre a concentração proteica existente nas amostras lisadas, para que, dessa forma, se pudesse efectuar uma análise comparativa dos resultados de electroforese bidimensional. Para que fosse feita a quantificação da proteína total existente na amostra foi usado o 2D Quant Kit® (Amersham Biosciences), de acordo com as indicações do fabricante. Este é um método simples, rápido e específico para determinação proteica de amostras a ser submetidas a electroforese bidimensional e que se baseia na precipitação das proteínas com eliminação dos componentes interferentes. Neste método é feita a ressuspensão dos polipéptidos numa solução de cobre, onde ocorre a ligação específica dos iões de cobre às cadeias polipeptídicas, possibilitando assim, através da medição da absorvência a 480 nm, quantificar a proteína existente. Este procedimento apresenta uma resposta linear dentro de certos valores com uma sensibilidade de 0 a 50 µg de proteína, sendo a curva de calibração preparada com a solução de BSA^{xvi} fornecida pelo fabricante na concentração de 2 mg.mL⁻¹.

Assim, em tubos de 2 mL, adicionou-se às amostras e às soluções utilizadas para preparação da recta padrão, 500 µL do reagente “precipitante”, agitando durante 2 a 3min à temperatura ambiente. Adicionou-se posteriormente 500 µL do agente “co-precipitante” e, após 2 a 3 min de incubação, centrifugaram-se os sedimentos proteicos a 10000 g durante 5 min de modo a sedimentar os polipéptidos. Ressuspenderam-se os sedimentos resultantes em 100 µL de solução de cobre e 400 µL de água bidestilada, adicionou-se 1 mL do reagente colorimétrico e, após 15 a 20 min de incubação à temperatura ambiente no escuro, leu-se a absorvência a 480 nm.

Os valores da concentração proteica das amostras obtiveram-se com base nos parâmetros da recta de calibração, pelo método dos mínimos quadrados, a partir do valor médio de absorvências referente aos triplicados de cada concentração de BSA.

^{xvi} do Inglês *Bovine Serum Albumin*

c) Electroforese bidimensional

Este método consiste numa 1ª dimensão que, a partir da IEF possibilita a separação proteica pela carga através do ponto isoeléctrico (pI) e numa 2ª dimensão que separa com base na massa molecular.

i. Focagem isoeléctrica (1ª Dimensão)

As proteínas são moléculas anfotéricas, apresentando carga global positiva, negativa ou nula conforme o pH do meio onde se encontram. Durante a IEF, ao submeter as amostras a gradientes de pH e a campos eléctricos, os polipéptidos são separados de acordo com o seu pI, que representa o valor de pH para o qual a carga global do polipéptido é nula. Antes de se proceder à IEF, foi necessário solubilizar previamente as amostras proteicas numa solução desnaturante e não iónica. Desta forma, incubou-se 300 µg de proteína num volume final de 250 µL durante 1 h na solução de lise (**secção 2.15 a**) contendo 0,5 % (v/v) IPG buffer o qual é composto por anfólitos (GE HealthCare) numa gama não linear de valores de pH de 3 a 10 e de anfólitos numa gama não linear de valores de pH de 3 a 5 (GE HealthCare), na proporção de 1:2. Após esta hora de incubação no aparelho Thermomixer Comfort (Eppendorf), a 25 °C, 350 rpm, centrifugaram-se as amostras durante 5 min, a 16 000 *g* à temperatura ambiente e aplicou-se no sarcófago apenas o sobrenadante. A tira de gel IPG, de 13 cm de comprimento e com um gradiente linear de pH (GE HealthCare) foi colocada sobre a amostra e adicionou-se cerca de 500 µL de óleo mineral de modo a minimizar evaporação e a cristalização da ureia, as condições da IEF estão descritas na Tabela II.

Tabela II- Condições utilizadas para a IEF

Diferença de potencial (V)	Tempo (h)	V.h
30	12	360
250	1	250
500	1,5	750
1000	1,5	1500
2500	1	2500
3000	0,5	1500
gradiente		
8000	4	32000

Registaram-se, no final, as condições finais (tempo de corrida e voltagem atingida) e a tira foi colocada em tubos de vidro tapados com fita aderente e armazenada a -80 °C.

ii. SDS-PAGE (2ª Dimensão)

De modo a preparar as tiras de gel para a separação por SDS-PAGE, realizaram-se duas incubações de 15 min, com agitação orbital, numa solução de equilíbrio com 1% (m/v) DTT e, posteriormente, mais 15 min na solução de equilíbrio contendo em 4% (m/v) de iodoacetamida. A solução de equilíbrio foi preparada com 50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M ureia, 30% (v/v) glicerol, 2% (m/v) SDS e H₂O bidestilada, para um volume final de 250 mL e armazenada a -20 °C.

De acordo com o proposto por Laemmli (57), utilizaram-se géis de poliacrilamida na presença do detergente aniónico SDS como agente desnaturante. Foram preparados géis de resolução de 10% T, 2,7% C_{bis}^{xvii}, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 1% (m/v) de SDS, 0,05% (m/v) PSA^{xviii} e 0,033% (v/v) de TEMED^{xix}. Deixou-se polimerizar durante 40 min. A solução tamponada catódica foi preparada com 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM glicina e 0,1% (m/v) de SDS. Para se obter melhor resolução dos polipéptidos de baixa massa molecular, a solução tamponada anódica tinha um componente

^{xvii} concentração de bis acrilamida presente em solução

^{xviii} Persulfato de amónio

^{xix} N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina

adicional, 0,1 M de acetato de sódio. Assim, após colocação da tira de IEF sobre o gel de SDS-PAGE polimerizado, o conjunto foi selado com uma solução de agarose 0,5% (m/v) preparada em solução tamponada catódica e contendo o corante *Coomassie brilhante blue coloidal* G-250. Submeteu-se o gel a uma corrente de 7,5 mA/ gel durante aproximadamente 30 min, até o corante que funciona como frente de solvente entrar completamente no gel de SDS-PAGE, seguido de 30 a 40 mA/ gel até ao final do SDS-PAGE, assinalado pela aproximação do corante à extremidade inferior do gel.

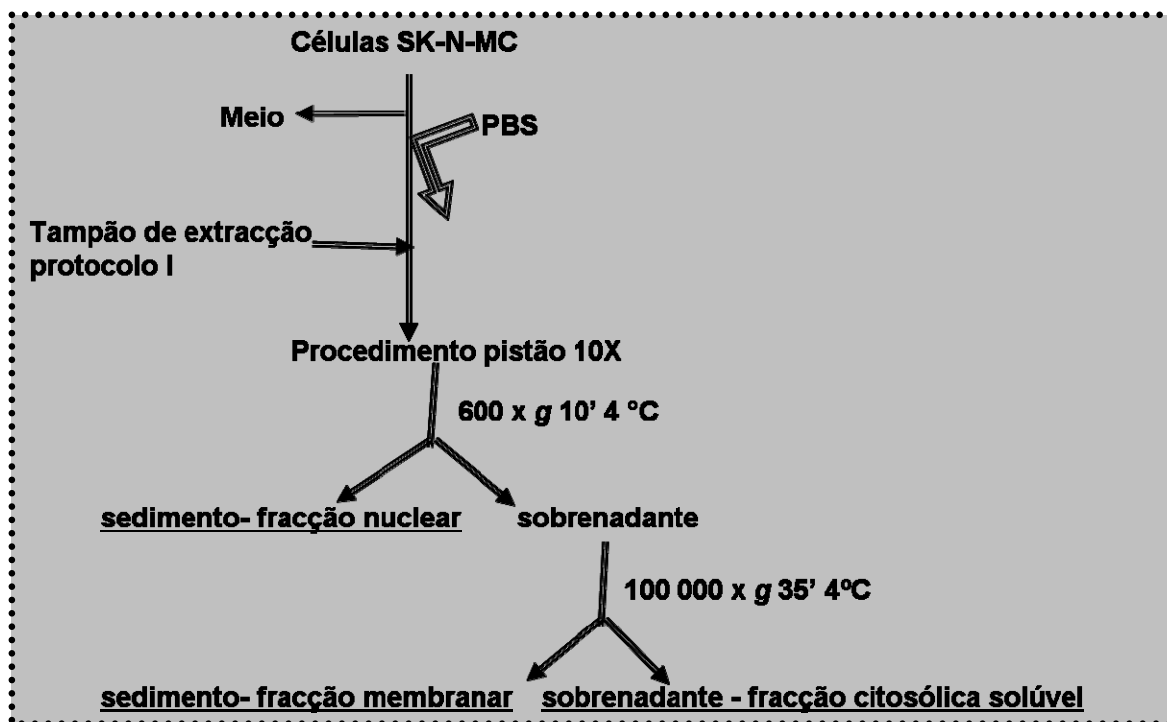
d) Visualização dos spots proteicos

Os polipéptidos separados electroforeticamente foram visualizados pelo método de coloração baseado pelo proposto por Neuhof e colaboradores (58), que envolve o corante orgânico azul de *Coomassie brilhante blue coloidal* G-250, cujo limite inferior de detecção corresponde a cerca de 50 a 100 ng de polipéptido concentrado num *spot* proteico. Devido ao facto deste corante não se ligar com a mesma especificidade a todos os polipéptidos, a densidade de coloração e a quantidade de polipéptido em cada *spot* proteico variam de polipéptido para polipéptido (59). Trata-se, por isso, de um método de detecção qualitativa e não quantitativa. Os polipéptidos foram fixados no gel durante 2 h em 50% (v/v) de metanol e 2% (v/v) de ácido orto - fosfórico, num volume final de 250 mL/ gel. Foram realizadas três lavagens de 30 min cada com água bidestilada; incubou-se durante 1 h com uma solução de 250 mL/ gel contendo 34% (v/v) de metanol, 2% (v/v) de ácido orto -fosfórico, 17% (m/v) de sulfato de amónio e adicionou-se posteriormente 15 mL da solução de coloração composta por 1,1% (m/v) de *Coomassie brilliant blue coloidal* G-250 em 34% de metanol (60). O processo de coloração decorreu durante 24 h e os géis foram descorados em água bidestilada até serem visíveis os *spots* proteicos correspondentes aos polipéptidos separados electroforeticamente para posterior digitalização no Software Labscan.

2.7. Fraccionamento Subcelular

Para se realizar o fraccionamento subcelular na linha celular SK-N-MC foram seleccionados dois procedimentos para serem executados após uma revisão bibliográfica cuidada. Um dos procedimentos, **procedimento I (Esquema 2)**, foi realizado segundo descrito por Hamano e colaboradores em 2005 (3) com a introdução de algumas alterações. As células foram crescidas conforme descrito na **secção 2.1** numa placa de 6 poços com uma superfície de $9,6\text{ cm}^2$, até atingirem entre 80 a 90% de confluência (cerca de $2,9 \times 10^8$ células). Depois, removeu-se todo o meio de cultura e lavou-se a monocamada celular com 1 mL de PBS, pH 7,2, sem Ca^{2+} e Mg^{2+} . O PBS foi retirado e foram colocados 200 μL de tampão de extracção de protocolo I em cada um dos poços da placa, composto por 40 mM Tris-HCl, pH 7,4, 250 mM sacarose, 4 mM CaCl_2 , 20 mM MgCl_2 , 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ DNase (Roche) e 1% (v/v) *cocktail* de inibidor de proteases tipo III^{xx} sem EDTA, 100x concentrado (Calbiochem) (específico para proteases de serina, cisteína, ácido aspártico e aminopeptidases); seguidamente foi feita uma incubação de alguns minutos a 37 °C, na presença de 5% (v/v) CO_2 . Depois da incubação, as células foram removidas da superfície da placa com o auxílio do raspador de células, transferidas para um microtubo e a lise completada com o auxílio de um pistão (o procedimento com o auxílio do pistão é efectuado 10 vezes). O homogeneizado foi centrifugado a 600 g , 5 min, 4 °C (Centrifuga Eppendorf modelo 5415 R). Os sedimentos foram considerados a fracção nuclear, que será posteriormente purificada, pois esta contém além do núcleo (organelo de interesse para o estudo), membranas celulares e outros organelos. O sobrenadante foi centrifugado a 100000 g durante 35 min a 4 °C. Depois desta centrifugação, o sobrenadante foi considerado a fracção citosólica solúvel e o sedimento foi analisado como sendo a fracção membranar. Todas as fracções foram posteriormente armazenadas a -80 °C até serem analisadas.

^{xx} Este cocktail de inibidores é composto por: 1 mM de pepstatina A, 2 mM de leupeptina, 2 mM de Hemissulfato, 1,5 mM de E-64, 5 mM bestatina, 100 mM de AEBSF (clorohidrato de fluoreto de 4-(2-aminoetil)-benzenosulfonilo) e 80 μM de aprotinina.



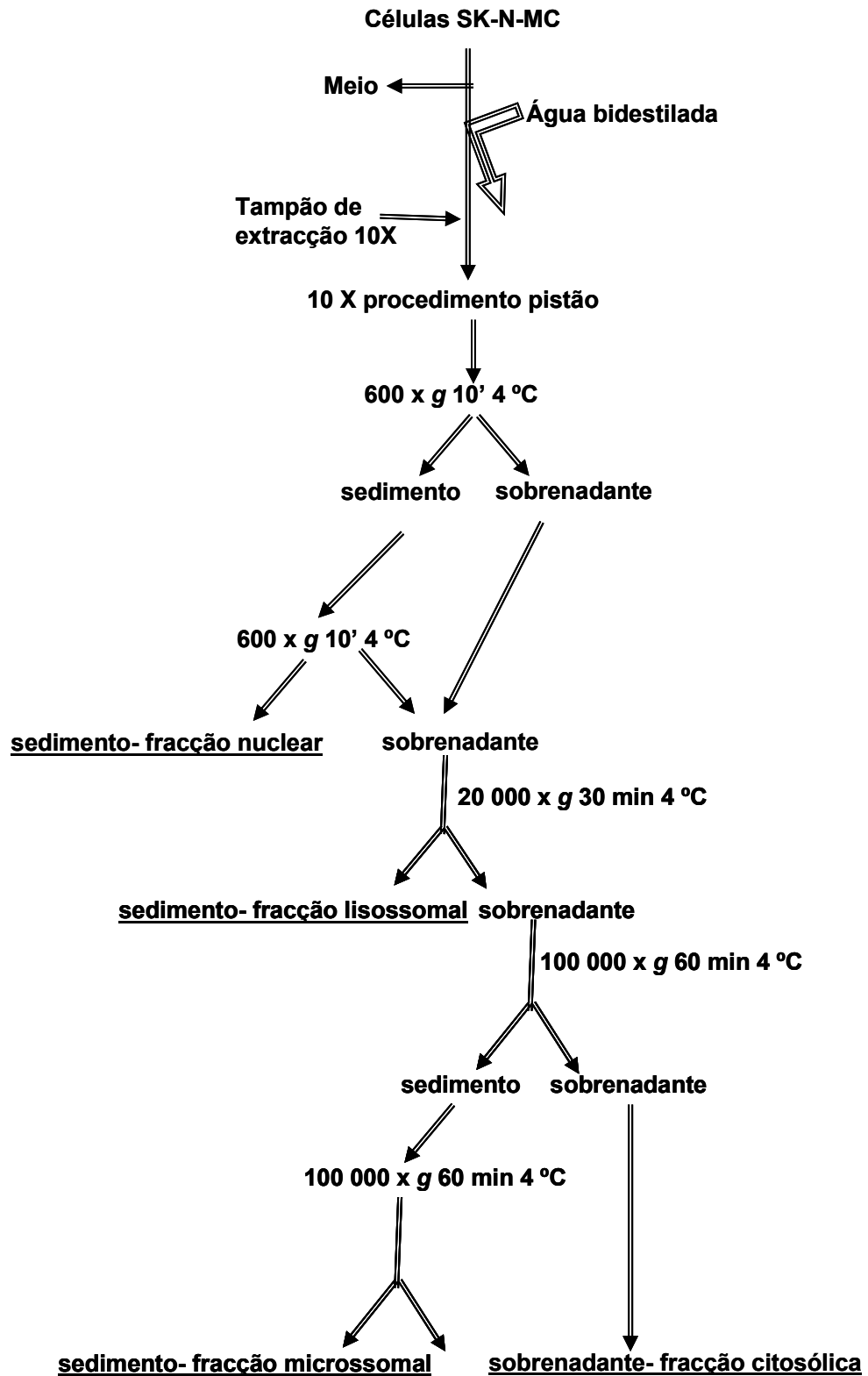
Esquema 2- Esquema representativo das etapas do procedimento I, baseado no estudo realizado por Hamano e colaboradores (3)

O **procedimento II** foi executado segundo descrito por Schulz e colaboradores (2), com algumas modificações. Nesta abordagem, as células foram lavadas com 1 mL de PBS, pH 7,2 sem Ca^{2+} e Mg^{2+} . O PBS foi retirado e adicionaram-se 20 μL de água bidestilada até que, por monitorização ao microscópio, se visualizasse que as células ficaram esféricas. Após colocar 200 μL de tampão de extracção do protocolo II 10X em cada poço da placa, composto por 100 mM NaCl, 100 mM MES^{xxi}, 50 mM EDTA, 1% (m/v) BSA, pH 6,0, 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ DNase (Roche) e 1% (v/v) *cocktail* de inibidor de proteases tipo III sem EDTA, 100x concentrado (Calbiochem), seguidamente as células foram transferidas para um microtubo e a lise foi completada com o auxílio de um pistão, (o procedimento com o pistão é efectuado 10 vezes). Depois da lise, o extracto total foi centrifugado a 600 g, 10 min, 4 °C (Centrifuga Eppendorf modelo 5415 R) e o sobrenadante foi colocado em novos microtubos. Foi feita uma nova centrifugação do sedimento obtido a 600 g, 10 min, 4 °C (Centrifuga Eppendorf modelo 5415 R) e o sobrenadante foi retirado e colocado em gelo; o sedimento resultante desta centrifugação foi ressuspenso em 200 μL de tampão de extracção do protocolo II e de seguida centrifugado a 600 g, 10 min, 4 °C (Centrifuga Eppendorf modelo 5415 R) e o sedimento originado

^{xxi} do Inglês 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid

“Análise proteómica das fracções subcelulares de uma linha de neuroblastomas humanos”

por esta centrifugação foi considerado a fracção nuclear, sendo ressuspenso em 1 mL de tampão de extracção do protocolo II 10X. Foi feita a junção dos sobrenadantes das duas centrifugações anteriores, que de seguida foram centrifugados a 20000 *g*, 30 min, 4 °C (Centrifuga Beckman modelo J2 MI), dando origem ao sedimento, guardado como fracção lisossomal, e ao sobrenadante que foi centrifugado a 100000 *g*, 60 min, 4 °C (Ultracentrifuga XL-100- Beckman). Depois desta ultracentrifugação o sedimento originado foi ressuspenso em 400 µL de tampão de extracção II e considerado a fracção microssomal. O sobrenadante final foi considerado a fracção citosólica solúvel. Todas as fracções foram posteriormente armazenadas a -80 °C até serem analisadas. Este procedimento encontra-se representado no Esquema 3.



Esquema 3-Diagrama representativo das etapas do procedimento II de acordo com a metodologia previamente descrita por Schulz e colaboradores (2)

2.8. Isolamento das frações mitocondrial e nuclear através de ultracentrifugação isopícnica

i. Gradiente descontínuo de sacarose para obtenção da fração mitocondrial

As mitocôndrias foram isoladas utilizando como base os protocolos descritos inicialmente por Storrie e Maden (61) e por Scheffler e seus colaboradores (44); no entanto, foram feitas algumas adaptações para a linha celular em estudo.

A amostra enriquecida em mitocôndrias, ou seja, o sobrenadante após a primeira centrifugação foi aplicado num gradiente de densidade de sacarose descontínuo. Para a preparação dos gradientes foi feita uma solução *stock* de sacarose 70% (m/v) em tampão de gradiente descontínuo, composto por 40 mM Tris-HCl pH 7,4, 4 mM CaCl₂, 20 mM MgCl₂. Para a preparação dos gradientes de sacarose, a partir da solução *stock*, foram feitas diluições com o mesmo tampão de forma a obter soluções com 10, 30 e 50% (m/v) de sacarose. O enchimento dos tubos consistiu na deposição da solução mais densa no fundo do tubo (tubos *ultraclear* para o rotor basculante SW 28 da Beckman). Em cada tubo foram colocados 10 mL de cada diluição, procedimento que foi repetido até a deposição, no topo do gradiente, da solução menos densa, obtendo-se gradientes com um volume final de 30 mL. A amostra, que consiste no sobrenadante contendo a fração mitocondrial enriquecida foi aplicada no topo do tubo e centrifugada a 55000 *g*, durante 15 min, a 4 °C (Ultracentrifuga XL-100, Beckman). Após a centrifugação, os gradientes foram colhidos em alíquotas de 1 mL com o auxílio de uma bomba peristáltica (Pharmacia Biotech Pump P-1). Estas alíquotas foram guardadas a -80 °C para os estudos posteriores.

ii. Gradiente descontínuo de sacarose para obtenção da fração nuclear

Para isolar os núcleos, foi necessário purificar o sedimento (resultante da primeira centrifugação do procedimento I) enriquecido na fração nuclear. Este organelo foi purificado utilizando o protocolo descrito por Malkas e seus colaboradores (62); no entanto foram introduzidas algumas adaptações para a linha celular em estudo. O sedimento foi ressuspensão no tampão de ressuspensão, composto por 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 5 mM EDTA e 5 mM de EGTA^{xxii}, após ressuspender o sedimento de forma aparentemente homogênea, este ficou em

^{xxii} Do inglês ethyleneglycol-bis-(β -aminoethyl ether)-*N,N'*-tetraacetic acid

“Análise proteômica das fracções subcelulares de uma linha de neuroblastomas humanos”

agitação no agitador orbital durante 2 h a 4 °C. Os núcleos foram posteriormente purificados utilizando um gradiente descontínuo.

Para a preparação do gradiente descontínuo foi feita uma solução *stock* de sacarose 70% (m/v) em tampão de ressuspensão. Para a preparação dos gradientes de sacarose, a partir da solução *stock*, foi feita uma diluição com o tampão de ressuspensão de forma a obter uma solução de 15% (m/v) de sacarose.

O enchimento dos tubos consistiu na deposição da solução mais densa no fundo dum tubo (tubos *ultraclear* para o rotor 70Ti da Beckman). Em cada tubo foram colocados 15 mL de cada diluição, procedimento que foi repetido até a deposição, no topo do gradiente, da solução menos densa, obtendo-se gradientes com um volume final de 30 mL.

A amostra foi colocada no topo do tubo e centrifugou-se a 10 000 *g*, durante 1 h, a 4 °C, na Ultracentrifuga XL-100, Beckman. Após a centrifugação, os gradientes foram colhidos em alíquotas de 1 mL com o auxílio de uma bomba peristáltica (Pharmacia Biotech Pump P-1). Estas alíquotas foram guardadas a -80 °C para as experiências seguintes.

iii. Procedimento de dessalinização das amostras

De forma a diminuir a concentração de sacarose das amostras colhidas nos gradientes descontínuos e estas pudessem ser subsequentemente submetidas a um gradiente contínuo de sacarose, houve necessidade de se proceder a uma dessalinização em coluna das amostras que foram retiradas das fracções enriquecidas da mitocôndria e núcleo dos gradientes descontínuos a fim de poderem ser, posteriormente submetidas a um gradiente contínuo de sacarose. Visto que a mitocôndria apresenta uma densidade de cerca de 1,1 g.cm⁻³, será necessário retirar do gradiente descontínuo a fracção que se encontra na interface entre os 25% (m/v) e os 35 % (m/v) de sacarose e, no caso do núcleo, a fracção que se encontra na interface da camada de 15% com a de 70%. Para isso, estas fracções foram colocadas numa coluna Econo-Pac 10DG (Biorad), seguindo as instruções do fabricante, para que fosse feita uma dessalinização. Na dessalinização, a matriz que esta coluna possui é capaz de retardar a eluição dos elementos com tamanho inferior a 6 kDa, excluindo os componentes com valor superior, que são mais rapidamente recuperados.

iv. Gradiente contínuo de sacarose para obtenção das fracções nuclear e mitocondrial

“Análise proteômica das frações subcelulares de uma linha de neuroblastomas humanos”

As frações dos gradientes descontínuos enriquecidas em núcleos e mitocôndrias após o processo de dessalinização foram submetidas a ultracentrifugação num gradiente contínuo de sacarose. Estas frações foram purificadas em tubos distintos. Para a preparação do gradiente contínuo de sacarose foi preparada uma solução *stock* de sacarose 70% (m/v) em tampão de gradiente contínuo, composto por 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM DTT, 5 mM EDTA. Foram preparadas soluções com concentração de 20, 30, 40, 50, 60 e 70% (m/v) de sacarose. Em cada tubo (tubo *ultraclear* da Beckman) foram colocados sequencialmente, do fundo do tubo para o topo e das soluções mais concentradas para as menos densas, 5 mL de cada diluição, congelando-se de seguida em azoto líquido entre cada diluição, procedimento que foi repetido até à deposição, no topo do gradiente, da solução menos densa, obtendo-se gradientes com um volume final de 30 mL.

Os gradientes foram armazenados a -80 °C. Antes de serem utilizados foram descongelados, em repouso, durante 24 h, a 4 °C (63), para que pudesse ser estabelecido o gradiente contínuo linear. Depois de estes estarem descongelados, a amostra (mitocondrial ou nuclear) foi colocada no topo do tubo e centrifugou-se a 50 000 *g*, durante 22 h, a 4 °C, na Ultracentrifuga XL-100, Beckman.

O gradiente contínuo da mitocôndria foi colhido em alíquotas de 1 mL e as frações que se considerava conterem as mitocôndrias foram centrifugadas a 14000 *g*, 20 min, 4 °C. O sedimento considerado como a fração mitocondrial purificada, foi ressuspenso em 0,5 volumes de uma solução de 0,25 M de sacarose e guardado a -80 °C até ser utilizado.

No caso do núcleo, o gradiente foi colhido em frações de 1 mL que foram preservadas a -80 °C até serem utilizadas.

2.9. Quantificação proteica: método de Lowry modificado

Para que se pudesse ter uma ideia da quantidade de proteína existente nas frações que foram colhidas ao longo das diferentes etapas de fraccionamento e para que nos estudos posteriores se pudesse saber a quantidade de proteína a aplicar de forma a normalizar o estudo, foi feita uma quantificação proteica destas frações. Para esta quantificação foi utilizado o método de Lowry modificado (64), que se passa a descrever.

O método de Lowry (64) modificado baseia-se na redução do íão de Cobre, de Cu^{2+} a Cu^{+} . Em microtubos de 1,5 mL, adicionou-se 50 μL de desoxicolato de sódio 1% (m/v) e 1 mL de ácido tricloroacético 10% (m/v) às amostras e às soluções usadas para a construção da recta padrão, deixando-se incubar 10 min à temperatura ambiente. Após este tempo de incubação, centrifugaram-se as soluções a 11000 *g*, 10 min, 22 °C. Descartou-se o sobrenadante e secou-se o sedimento

resultante à temperatura ambiente, que se dissolveu depois em 1 mL do reagente colorimétrico composto por uma mistura A:B (100:1), em que a solução A corresponde a 0,2% (m/v) de NaOH, 0,16% (m/v) de tartarato de sódio e 1% (m/v) de SDS, e a solução B a 0,4% (m/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Deixou-se incubar à temperatura ambiente durante 10 min, adicionou-se 0,1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu, diluído com água bidestilada (1:1), e deixou-se em repouso à temperatura ambiente durante 30 min, na ausência de luz. Os valores de absorvência foram lidos a 750 nm. A curva de calibração foi preparada com BSA, numa gama de 0 a 25 μg . Os valores da concentração proteica das amostras obtiveram-se com base nos parâmetros da recta de calibração, pelo método dos mínimos quadrados, a partir do valor médio de absorvências referentes aos triplicados de cada concentração de BSA.

2.10. Electroforese em géis de poliacrilamida SDS – PAGE

Após a quantificação proteica das amostras, foi feita uma precipitação das proteínas em acetona, a 4 °C, durante a noite, de forma a reduzir o volume que seria aplicado no gel. Estas amostras foram centrifugadas a 16000 g, 30 min, 4 °C (Centrifuga Eppendorf modelo 5415 R) para separar as proteínas da acetona. O sedimento resultante foi solubilizado num volume apropriado de tampão de amostra para electroforese, para que todas as amostras tivessem a mesma concentração proteica. Este tampão é composto por 0,7% (v/v) β -mercaptoetanol, 2% (m/v) SDS, 8% (v/v) Tris-HCl 1 M, pH 6,8, 0,01% (m/v) *m*-cresol púrpura e glicerol 87% (v/v); seguidamente antes de adicionar este tampão às amostras proteicas a analisar, é necessário fazer uma diluição 1:4 do tampão, ou seja juntar três volumes de amostra a um volume de tampão de amostra. Depois da solubilização, estas foram aquecidas a 100 °C durante 3 min. Utilizaram-se, neste trabalho, dois conjuntos de marcadores de massa molecular: o conjunto Colorburst™ Electrophoresis Marker (C1992) da Sigma, que é composto por oito polipéptidos: miosina (220 kDa), albumina de soro bovino (100 kDa), glutamato desidrogenase (60 kDa), álcool desidrogenase (45 kDa), anidrase carbónica (30 kDa), inibidor da tripsina de soja (20 kDa), lisozima (12 kDa) e aprotinina (8 kDa); o conjunto de marcadores Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range da Biorad, que é também composto por oito polipéptidos: miosina (194,6 kDa), β -galactosidase (116,5 kDa), albumina de soro bovino (97,2 kDa), ovalbumina (50 kDa), anidrase carbónica (37,6 kDa), inibidor da tripsina de soja (29,2 kDa), lisozima (20 kDa) e aprotinina (7,15 kDa). Para a corrida utilizaram-se géis de poliacrilamida, com 73 mm x 84 mm x 1,5 mm. Os géis eram compostos por gel concentrador com 4% T, 2,7% C_{bis} , 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,01% (m/v) de

SDS, 0,05% (m/v) de PSA e 0,1% (v/v) de TEMED. O gel de resolução era composto por 8% T, 2,7% C_{bis}, 25% (v/v) 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 1% (m/v) de SDS, 0,5% (m/v) de PSA e 0,05% (v/v) de TEMED. Outro dos géis utilizado tinha um gel concentrador com a composição 10% T 2,7% C_{bis}, 25% (v/v) 1,5 M pH 8,8, Tris-HCl, 1% (m/v) de SDS, 0,5% (m/v) de PSA e 0,05% (v/v) de TEMED.

Deixou-se polimerizar durante 40 min. A solução tamponada catódica foi de acordo com a descrição na secção 2.6.c.ii. A corrida decorreu durante 40 min, a uma voltagem constante de 200 V (Fonte de alimentação Biorad, modelo Mini Protean II). A electroforese foi realizada de acordo com o método proposto por Laemmli (57).

2.11. Coloração com CALRED™

Para que se pudessem visualizar todos os polipéptidos que estavam presentes no gel após a electroforese, foi feita a coloração com o corante CALRED^{xxiii}™, que pode detectar até 10 ng de BSA. Descrito por Choi e colaboradores (65), este método consiste na imersão do gel numa solução de 0,05% (m/v) de CALRED™ na solução descorante composta por 40% (v/v) de metanol e 7% (v/v) de ácido acético glacial. O gel foi deixado na solução corante, em agitação, durante a noite. Para descorar, utilizou-se a mesma solução anterior sem o corante CALRED™, até se obter um bom contraste entre as bandas e a superfície do gel.

2.12. Coloração com nitrato de prata

Para visualizar os polipéptidos presentes no gel após a electroforese, naqueles casos em que não era possível detectar bandas com o método de CALRED™ por ser menos sensível, fez-se a coloração com o método desenvolvido por Blum e colaboradores (66). A coloração com nitrato de prata, proposta por estes autores, consegue detectar entre 1 a 10 ng de proteína por banda no gel. Os polipéptidos foram fixados com uma solução constituída por 50% de metanol (v/v), 12% (v/v) de ácido acético e 0,05% (v/v) de formaldeído durante, pelo menos, 20 min. Seguiram-se três lavagens, de 10 min cada, com 50% (v/v) de etanol e um pré-tratamento, por incubação, com uma solução de tiosulfato de sódio 200 mg.mL⁻¹ durante 60 s. Após três lavagens de 20 s cada, com água bidestilada, os géis foram incubados durante 10 min com a solução corante 0,2% (m/v) de nitrato de prata contendo 0,075% (v/v) de formaldeído. O excesso de corante foi removido por lavagem dos géis em água bidestilada, duas vezes durante 20 s, sendo as bandas dos polipéptidos reveladas até à

^{xxiii} ácido calconcarboxílico

intensidade desejada com uma solução com 6% (m/v) de carbonato de sódio contendo 4 mg.L⁻¹ de tiosulfato de sódio e 0,05% (v/v) de formaldeído. Quando atingida a coloração desejada dos polipéptidos, os géis foram lavados duas vezes, durante 2 min, com água bidestilada e mergulhados numa solução de paragem da reacção contendo 50% (v/v) de metanol e 12% de ácido acético (66).

2.13. Electrotransferência de polipéptidos

Para que seja feita a análise de imunodeteção em membrana, é necessário transferir os polipéptidos presentes no gel para uma membrana que seja capaz de os manter ligados inespecificamente. Para isso foi executado o protocolo desenvolvido por Swerdlow e colaboradores em 1986 (67).

Depois de terminar a electroforese, o gel foi incubado em tampão de transferência composto por 0,1% (m/v) de SDS, 20% (v/v) metanol, 190 mM glicina e 25 mM Tris-HCl, pH 8,3, durante 15 min conjuntamente com uma membrana de PVDF^{xxiv} (Hybond-P, GE Healthcare) para onde irá ser feita transferência. Antes de ser utilizada, a membrana necessita de ser incubada com metanol devido ao seu carácter hidrofóbico, seguida de imersão em água bidestilada e incubação em tampão de transferência. Depois desta incubação, é feita uma “sanduíche” que é composta por duas folhas de papel de cromatografia 3MM (Whatman), a membrana, o gel e novamente duas folhas de papel de cromatografia 3MM. A transferência dos polipéptidos do gel para a membrana é então realizada na câmara fria a 70 V durante 2 h no aparelho da BioRad, modelo Mini Protean II.

2.14. Imunodeteção em membrana

O procedimento utilizado baseou-se no método descrito por Ferreira e Shaw (68). Antes de se proceder à imunodeteção de polipéptidos em membranas é necessário proceder à sua fixação para se eliminar, ou minimizar, a capacidade que alguns polipéptidos têm para se eluir das membranas, durante as incubações seguintes com soluções aquosas. Esta fixação consistiu em autoclavagem a 120 °C durante 30 min. Após o processo de fixação dos polipéptidos à membrana, esta foi inicialmente bloqueada durante 1 h a temperatura ambiente em 5% (m/v) de MBA^{xxv} (GE, HealthCare) preparado em PBST^{xxvi} tampão composto por 137 mM NaCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,1 mM

^{xxiv} do inglês *Polyvinylidene Fluoride*

^{xxv} Do inglês *Membrane Blocking Agent*

^{xxvi} Do inglês *Phosphate Saline Buffer with Tween-20*

Na_2HOP_4 , 2,7 mM KCl e 0,1% (v/v) Tween 20^{xxvii}. Após este período a membrana foi lavada 10 min com PBST e de seguida foi incubada com o anticorpo primário (usando as seguintes diluições 1:500 e 1:1000 e 1:2500 em 2,5% de MBA/PBST) a temperatura ambiente durante 1 h. Os anticorpos primários utilizados foram anticorpo policlonal anti-proteína p53 de coelho, anticorpo policlonal anti-proteína p53 de cabra e o anticorpo policlonal anti-ATP5E de cabra, todos os anticorpos foram fornecidos pela Santa Cruz Biotechnology, Inc. Todos os anticorpos anti- proteína p53 foram utilizados como marcadores da fracção nuclear e o anticorpo anti-ATP5E foi utilizado como marcador da fracção mitocondrial. Foi também utilizado o anticorpo policlonal anti-actina, de coelho (Pierce) este anticorpo foi utilizado como controlo interno da concentração de proteína utilizada nos géis. O excesso do primeiro anticorpo foi retirado com duas lavagens de 5 min com PBST e duas lavagens de 5 min com a solução SAIS composta por 1 M de NaCl, 0,01 M Na_2HPO_4 e 0,5% (v/v) Tween 20 . Seguidamente é efectuada uma lavagem durante 15 min com PBST. Após esta lavagem os anticorpos foram incubados com os anticorpos secundários, conjugados com peroxidase e produzidos especificamente contra as IgG do animal do anticorpo primário utilizado e de acordo com as instruções do fabricante. Estas diluições foram feitas em PBST com 2,5% de MBA. Após a incubação da membrana com os anticorpos secundários foram feitas duas lavagens de 5 min com PBST, uma lavagem de 10 min com a solução SAIS, três lavagens de 5 min com PBST e, por fim uma lavagem final com PBS durante 1 min.

No método utilizado, para que se possam visualizar as bandas, é necessário adicionar um substrato apropriado (Lumigen™ TMA-6). Este substrato irá dar origem ao produto quimioluminiscente por acção da peroxidase e que será responsável pela emissão do sinal associado ao método de detecção seleccionado. As membranas foram visualizadas no aparelho Molecular Imager ChemiDoc XRS da BioRad com o software Quantity One®, em que as condições de visualização foram as seguintes: exposições com intervalos de 30 em 30 s perfazendo um total de 1200 s com um total de 40 imagens obtidas.

^{xxvii} monolaurato de polioxilenossorbitano

2.15. Coloração dos polipéptidos em membrana com Ponceau S

O método de coloração baseado no corante Ponceau S, é um método de coloração de proteínas em membranas inespecífico e reversível (69). As membranas foram imersas numa solução de 0,2% (m/v) de Ponceau S em 3% (m/v) de ácido tricloroacético e 3% (m/v) de ácido sulfossalicílico, até as bandas serem visualizadas. Depois foram feitas várias lavagens até que o excesso de solução corante seja removido e se obtenha um bom contraste entre as bandas e a membrana. A coloração desaparece após lavagem continuada com água

3. Resultados e Discussão

3.1. Optimização das condições de extracção proteica para electroforese bidimensional

Para a análise proteómica, foi necessário estabelecer as condições de extracção proteica e da sua separação pela electroforese 2D, para obter o proteoma total dos neuroblastomas humanos SK-N-MC. Para esta linha celular foram já conduzidos alguns estudos do proteoma total, como por exemplo os realizados por Pluder e colaboradores (70) no estudo do efeito proliferativo do gene codificante da calcitonina e por Chang e colaboradores (1) na análise da resposta destes neuroblastomas à infecção pelo vírus Nipah. Também foi feito um estudo preliminar no nosso laboratório baseado nos métodos descritos. Verificou-se no entanto alguma falta de reprodutibilidade no padrão obtido, o que justifica ter-se optado por repetir, de uma forma sistemática, os parâmetros mais básicos. Com base nestes estudos e em de todas as condições descritas por Gorg (55) para obter uma resolução eficaz de espécies proteicas em géis bidimensionais, testou-se uma solução de tampão de extracção, para obtenção de um padrão do proteoma total das células SK-N-MC, próximo do já publicado e que não conduz a fenómenos de interferências. No anexo I apresenta-se o gel bidimensional das células SK-N-MC obtido pelo estudo de Chang e colaboradores (1), o qual serviu como análise comparativa da eficácia na optimização da extracção proteica. Com o intuito de obter uma boa resolução nos géis bidimensionais e de assegurar que cada *spot* possa corresponder a um único polipéptido, submeteram-se as amostras a condições de desnaturação, desagregação, redução e solubilização de modo a extrair as proteínas e a assegurar a quebra das interacções moleculares. Também foi necessário eliminar componentes não proteicos presentes nas células SK-N-MC e que poderiam interferir com a análise proteómica, nomeadamente: os sais, pois quando a sua concentração é elevada podem aumentar a condutividade da IEF e provocar riscas horizontais/verticais; os lípidos que podem interagir com as proteínas membranares; os ácidos nucleicos, por se visualizarem *spots* nos géis correspondentes aos seus fragmentos e por interagirem com os anfólitos e proteínas, levando ao aparecimento de riscas nos géis, e as proteases de modo a evitar a degradação proteica, da qual poderia resultar perda de proteínas de massa molecular elevada (55, 71). O primeiro ensaio de electroforese bidimensional a ser realizado foi a repetição do método previamente implementado no laboratório por Pontes (56). Registou-se que não se obtinham quaisquer *spots* nas várias repetições realizadas, o que fez com que equacionássemos parâmetros associados à qualidade dos intervenientes (tiras e soluções previamente congeladas) como responsáveis por tão estranho resultado. Após refazermos todas as

soluções *stock*, a variável seguinte a ser testada foi a qualidade das tiras de IEF que estavam a ser utilizadas. Para testar esta hipótese, foi realizado um gel bidimensional recorrendo a outro lote de tiras de IEF de 7 cm de comprimento, com o mesmo gradiente de pH, utilizando a mesma amostra com menor quantidade de proteína para ser proporcional ao tamanho e não haver risco de o excesso de amostra sedimentar na primeira dimensão. Estas tiras são, na segunda dimensão corridas num sistema mini-gel com 73 mm x 84 mm x 1,5 mm, que se apresenta na Figura 2. Como se pode verificar foi possível visualizar a existência de diversos *spots*, bastante bem focados, não se visualizando neste gel nenhum tipo de precipitação de amostra, nem riscas horizontais e/ou verticais.

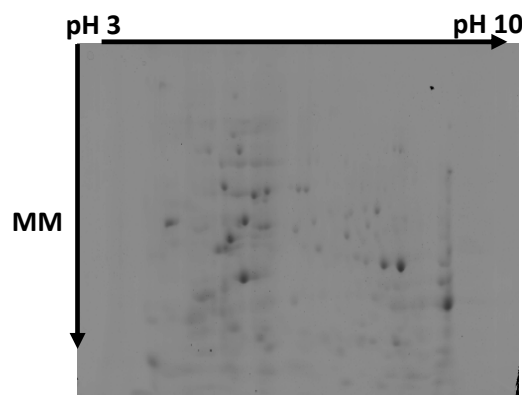


Figura 2 - Minigel de electroforese bidimensional da proteína total da linha celular SK-N-MC. A proteína total foi extraída de acordo com o descrito na secção 2.3a e submetida a 2D tal como descrito anteriormente (vide secção 2.3c).

Após estes resultados e com o propósito de maximizar a resolução do proteoma desta linha celular, tentando reproduzir o que já foi publicado anteriormente, voltou-se aos géis de IEF em tiras de 13 cm de outro lote. Devido à falta de reprodutibilidade registada anteriormente, que poderia aparentemente estar apenas associada com um problema técnico nas tiras de IEF, optou-se nesta fase em voltar a aferir a eficácia dos componentes do tampão de lise. A optimização baseou-se, assim, em alternativas na solução de tampão de extracção de modo a assegurar um padrão representativo e reprodutível do proteoma celular. Assim, testou-se a adição ao tampão de lise descrito anteriormente (vide **secção 2.3a**, 7 M ureia, 2 M tiureia, 4% (m/v) CHAPS, 60 mM DTT, 0,4% (v/v) Triton X-100, designado tampão A) de:

- 1 mg.mL⁻¹ DNase (Roche), para se eliminar o DNA que iria interferir com a migração electroforética dos polipéptidos. Estudos preliminares realizados no laboratório indicaram que esta linha celular é muito rica em DNA. Os ácidos nucleicos originam, nos géis, *spots* correspondentes aos

seus fragmentos e interagem com os anfólitos e as proteínas, levando ao aparecimento de riscas nos géis. No entanto, alguns géis 2D previamente realizados no laboratório não indicavam reprodutivelmente a eficiência da adição da DNase;

- 1% (v/v) cocktail de inibidor de proteases tipo III^{xxviii} sem EDTA, 100x concentrado (Calbiochem) (específico para proteases de serina, cisteína, ácido aspártico, e aminopeptidases). Nas células animais, ricas em proteases, é normalmente indicada a adição de inibidores das mesmas, de forma a evitar a degradação proteica, a qual poderia resultar na perda de proteínas de massa molecular alta. Em face disto, analisou-se a pertinência da sua adição. Optou-se pelo uso de uma mistura de inibidores, excluindo o EDTA já que os iões divalentes são necessários à actividade da DNase anteriormente adicionada.

Os restantes componentes são os indicados como os mais adequados para a obtenção de um proteoma estável e reprodutível. Segundo Gorg (55), a ureia, numa gama de 5 a 7 M, é eficiente para quebrar ligações bissulfito, levando à desagregação e desnaturação. Contudo, para quebrar interacções hidrofóbicas é recomendada a tiureia 2 M. O CHAPS e o Triton X-100 são detergentes não iónicos, que previnem o estabelecimento de interacções hidrofóbicas e evitam a agregação e a precipitação proteicas. No entanto, o Triton X-100 não está indicado como o mais eficaz a solubilizar proteínas hidrofóbicas membranares. Para este efeito, alguns autores recomendam a adição do detergente zwitteriónico Asb-14 que, em combinação com o CHAPS, tem revelado um aumento da capacidade de solubilizar diferentes classes proteicas do cérebro humano (72). Trabalho desenvolvido previamente no laboratório e já referido, avaliou a eficiência do Asb-14 para a linha celular em estudo, tendo-se verificado uma diminuição muito significativa do rendimento da extracção com aparecimento de muitos interferentes, o que levou ao abandono desta abordagem. O DTT é um agente redutor escolhido para reduzir e prevenir a re-oxidação proteica e para promover a clivagem das ligações bissulfito intra- e intermoleculares das proteínas, assegurando a sua desagregação. O mesmo trabalho anterior também avaliou o uso de TBP^{xxix} em alternativa ao DTT, já que este era recomendado nas condições de extracção do conteúdo proteico das células SK-N-MC por Pluder e colaboradores (73), abordagem igualmente ineficiente comparativamente à inicial. Neste ensaio foi então avaliado o padrão que se obtém com os seguintes tampões de lise e para os quais se obtiveram os géis apresentados:

^{xxviii} Este cocktail de inibidores é composto por: 1 mM de pepstatina A, 2 mM de leupeptina, 2 mM de Hemissulfato, 1,5 mM de E-64, 5 mM de bestatina, 100 mM de AEBSF (clorohidrato de fluoreto de 4-(2-aminoetil)- benzenosulfonilo) e 80 µM de aprotinina.

^{xxix} Do inglês *Tributhyl phosphine*

“Análise proteômica das fracções subcelulares de uma linha de neuroblastomas humanos”

- 7 M ureia, 2 M tiureia, CHAPS 4% (m/v), 60 mM DTT, Triton X-100 0,4% (v/v), designado tampão A, na Figura 3.A;

- Tampão A com DNase adicionada, na Figura 3.B;

- Tampão A com DNase e *cocktail* de inibidores de proteases adicionados, na Figura 3.C.

Como se pode constatar pela análise da Figura 3 obtêm-se padrões do proteoma que já são considerados muito próximos do publicado por Chang e colaboradores (1). Na Figura 4 apresenta-se uma análise comparativa de algumas regiões dos géis anteriores para se evidenciarem algumas diferenças.

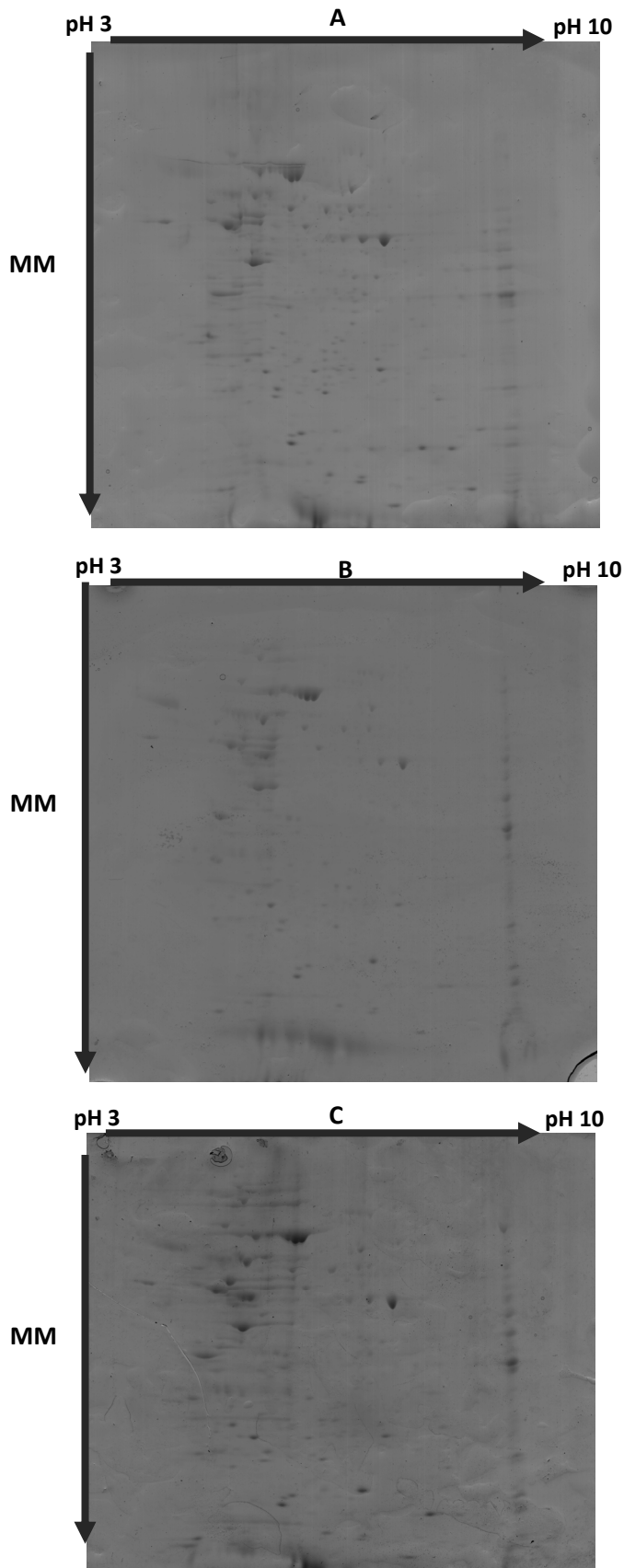


Figura 3- Géis de electroforese bidimensional do proteoma total da linha celular SK-N-MC. No gel A- proteína total extraída com tampão de lise (tampão A) composto por: 7 M ureia, 2 M tiureia, CHAPS 4% (m/v), 60 mM ⁴⁶ DTT, Triton X-100 0,4% (v/v); no gel B- a proteína total foi extraída com tampão A com adição de DNase; no gel C- a proteína total foi extraída com tampão A, com adição de DNase e cocktail de inibidores de proteases.

Como se pode constatar na Figura 3 obtêm-se padrões do proteoma que já são considerados muito próximos do publicado por Chang e colaboradores (1). Fazendo-se uma análise mais cuidada, com maior detalhe percebe-se qual das três opções é a mais vantajosa, ou seja, a que corresponde ao gel da Figura 3.C. Na Figura 4 apresenta-se uma análise comparativa de algumas regiões dos géis anteriores, para se evidenciar algumas diferenças.

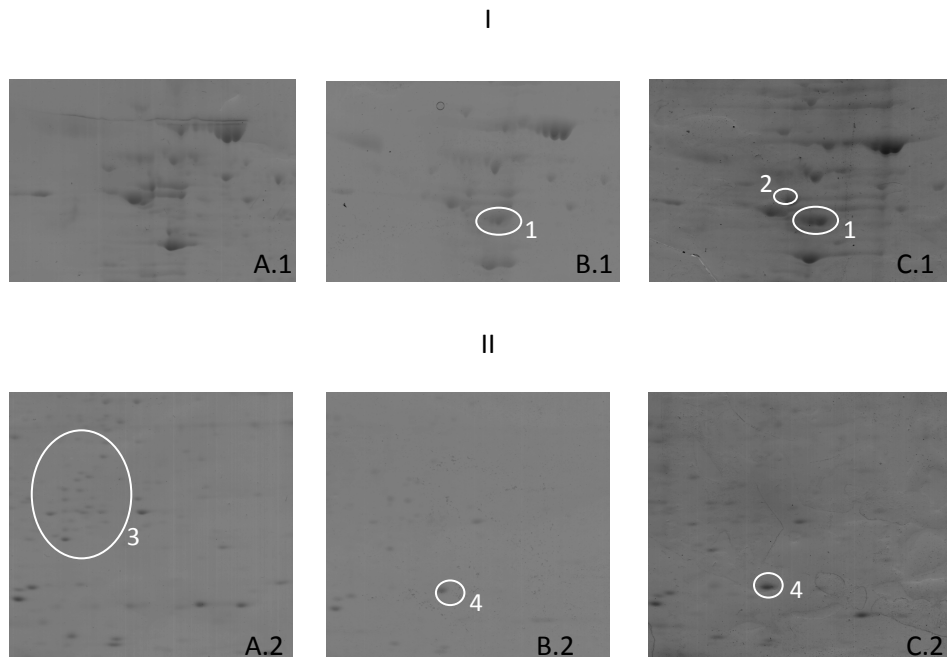


Figura 4 Géis de electroforese bidimensional do proteoma total da linha celular SK-N-MC. Análise comparativa da mesma região nos três géis A, B e C da Figura 3, representadas na figura por A.1, B.1 e C.1, respectivamente. Região que evidencia diferença a nível da intensidade dos *spots* 1 e 2 representados nas imagens B.1 e C.1; II- Géis de electroforese bidimensional do proteoma total da linha celular SK-N-MC. A.2 zona de pH ácido no gel A da Figura 3 (zona evidenciada pelo nº 3); análise comparativa da mesma região nos géis B e C da Figura 3, que evidencia diferenças a nível da intensidade do *spot* 4 representado nas Figuras B.2 e C.2.

Com esta análise comparativa evidencia-se que a detecção de alguns *spots* é mais intensa, casos do *spot* 1 e do *spot* 4 na situação do tampão de lise com adição de DNase e cocktail de inibidores de proteases. Nesta mesma situação, temos também existência de *spots* que não foram detectados no gel A e B e, como exemplo disso, temos o *spot* 2, reforçando assim os ensaios anteriores da necessidade da adição destes componentes em conjunto, já que apenas com DNase o mesmo não se verifica. É curioso salientar que a zona ácida do gel A (zona 3 da Figura 4.II.A.2) aparenta estar melhor resolvida apenas com o tampão A, do que na situação em que se adicionou a DNase e o *cocktail* de inibidores. Verificou-se, mesmo após várias repetições do gel da Figura 4 IIC.2, que nesta zona de pH os *spots* nunca ficavam bem focados. Com o intuito de melhorar a resolução,

experimentámos colocar além dos anfólitos (GE HealthCare) numa gama não linear de valores de pH de 3 a 10, também anfólitos num pH de 3 a 5 (GE HealthCare), para verificar se tínhamos uma melhor visualização das proteínas presentes na nossa amostra. Depois de termos colocado os anfólitos para a zona ácida verificamos que a resolução nesta zona melhorou, tendo sido esta alteração um contributo importante para a optimização da técnica (Figura 5). No entanto, na zona básica verifica-se que se detectam poucos polipéptidos, sendo por isso as proteínas básicas pouco representadas, situação que é uma das grandes limitações desta técnica (74). Esta é uma das limitações desta abordagem, para a qual o fraccionamento subcelular pode contribuir na sua resolução. Por outro lado e de forma sistemática regista-se sempre uma risca vertical, factor que se tem vindo a atribuir a uma falha técnica nas tiras de 13 cm fornecidas pela empresa (Rita Francisco, Laboratório de Ecofisiologia Molecular, ITQB, comunicação pessoal). Podemos portanto dizer que para a linha celular SK-N-MC, o protocolo que foi optimizado é um bom ponto de partida para que futuramente seja feita a identificação de cada um dos *spots* proteicos que estão presentes no gel. Sendo a obtenção do proteoma total desta linha celular o primeiro objectivo deste trabalho, pode afirmar-se que foi atingido.

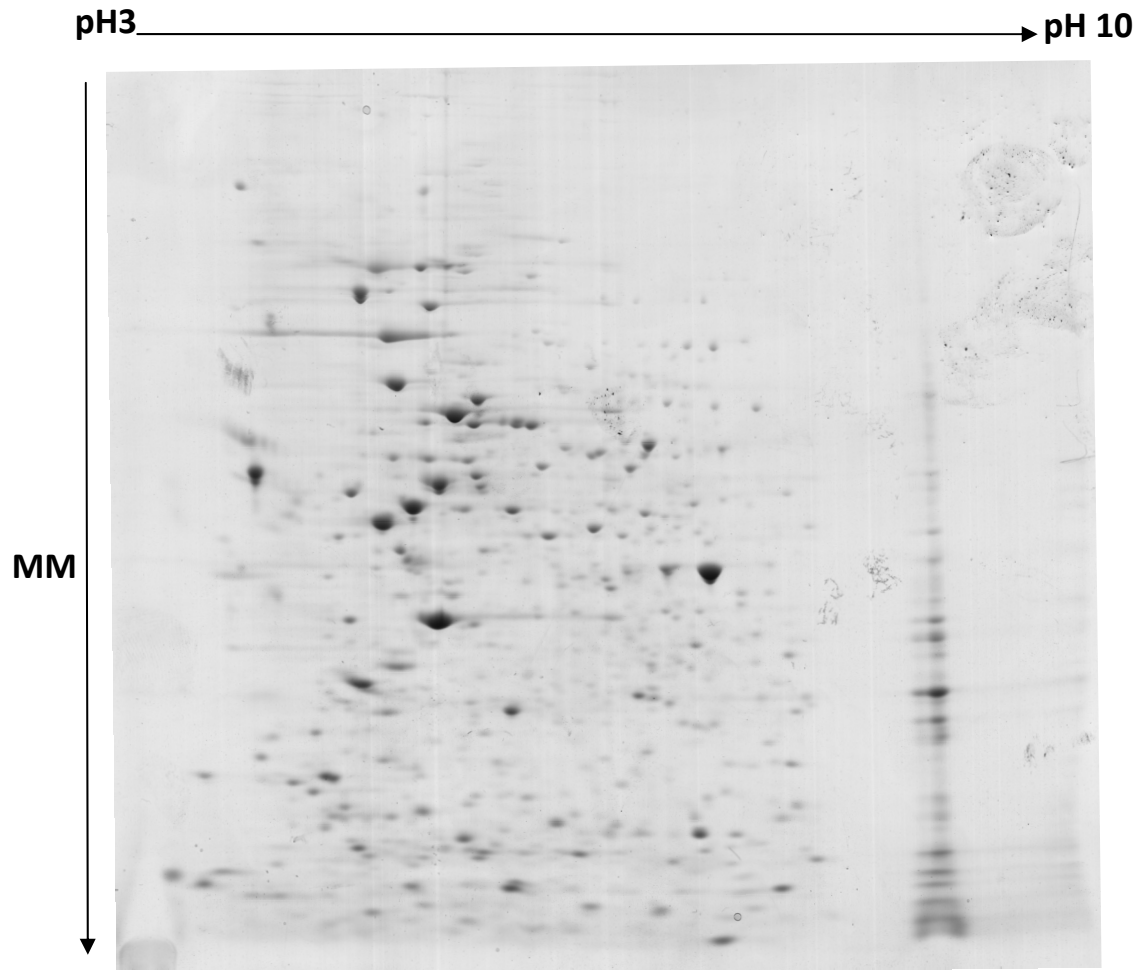


Figura 5- Gel de electroforese bidimensional do proteoma total da linha celular SK-N-MC. A proteína total foi extraída com tampão de lise composto por: 7 M ureia, 2 M tiureia, 4% (m/v) CHAPS, 60 mM DTT , 0,4% (v/v) Triton X- 100, 1% (v/v) *cocktail* de inibidor de proteases tipo III sem EDTA, 100x concentrado (Calbiochem) (específico para proteases de serina, cisteína, ácido aspártico e aminopeptidases) e 1 mg.mL⁻¹ DNase (Roche). A proteína total foi submetida a electroforese bidimensional tal como descrito na secção 2.6 c.

3.2. Detecção dos polipéptidos por imunodetecção em membrana para avaliação da eficiência do fraccionamento

O método escolhido para monitorização da eficiência e pureza das fracções obtidas no fraccionamento subcelular foi a imunodetecção em membrana de polipéptidos considerados marcadores dos organelos em estudo. Este método é frequentemente recomendado como controlo de qualidade nas experiências de fraccionamento subcelular (31, 34).

As amostras contendo os antígenos, ou seja, os extractos proteicos obtidos das células SK-N-MC utilizadas para este estudo de optimização, foram as fracções iniciais do fraccionamento descrito na secção 2.7, ou seja, o sobrenadante (S) e a sedimento (fracção nuclear (FNI)), obtidos após a primeira centrifugação do procedimento I.

. Depois, escolheram-se, então, dois anticorpos referentes a duas proteínas consideradas marcadoras das duas fracções em estudo, nomeadamente o núcleo e a mitocôndria. Foi também utilizado o anticorpo da anti-actina, proteína que é usada como controlo interno da quantidade de proteína total utilizada na experiência. Antes de iniciar o uso desta técnica como ferramenta de controlo de qualidade do fraccionamento subcelular, foi necessário verificar e/ou optimizar a detecção, pelos anticorpos das respectivas proteínas em fracções/extractos celulares, nomeadamente proceder-se aos necessários ajustes no protocolo de imunodetecção, assim como definir a diluição a utilizar de cada anticorpo.

a) Imunodetecção da proteína actina

Inicialmente, foram feitas detecções com anticorpo anti-actina, onde foram testadas três diluições: 1:500, 1:1000 e 1:2500. Estes resultados foram obtidos utilizando o método de imunodetecção tal como descrito na secção 2.14 que usa as soluções de PBS/PBST nas lavagens e nas incubações necessárias.

Na Figura 6 apresentam-se os resultados obtidos para as várias diluições testadas relativamente ao anticorpo anti-actina. Com a menor diluição observam-se duas bandas nítidas, mas o nível de intensidade destas bandas decresce à medida que a diluição aumenta. A diluição mais baixa é demasiado forte para ser utilizada nesta técnica. Optámos, por isso, pela diluição 1:1000 com este anticorpo. Fazendo a comparação desta proteína entre a fracção nuclear (FNI) e o sobrenadante (S)

na diluição 1:500 e na diluição 1:1000, é possível verificar que o sobrenadante aparenta ter maior quantidade desta proteína que o sedimento.

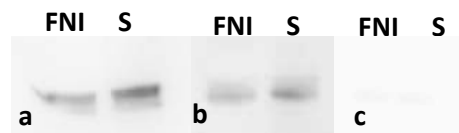


Figura 6- Imunodeteção em membrana da proteína actina nas fracções FNI- Fracção nuclear I e S- Sobrenadante como descrito na secção 2.7. Foram utilizadas nestas experiências três diluições do anticorpo primário (anti-actina): a. 1:500; b. 1: 1000 e c. 1:2500.

b) Imunodeteção da proteína p53

No caso do anticorpo policlonal para a proteína p53, também foram realizadas diversas repetições com as diluições 1:500, 1:1000 e 1:2500 com o procedimento descrito anteriormente. Nunca se obteve qualquer detecção específica desta proteína e, em muitos ensaios não se detectava qualquer banda. A Figura 7 é ilustrativa de alguns dos resultados obtidos. Ao visualizarmos as imagens, é possível verificar que havia proteína presente nas amostras. Ou seja, a questão do resultado final não ser o esperado não estava relacionada com o facto da electroforese ter sido ineficiente ou da transferência não ter corrido da melhor forma, pois em ambos os casos não visualizaríamos bandas na membrana após revelação. O protocolo englobava, numa fase inicial, a fixação das proteínas que se encontravam na membrana por autoclavagem. Este passo foi posteriormente retirado pois podia estar a comprometer os resultados mas não se verificou alteração no padrão de bandas detectado.

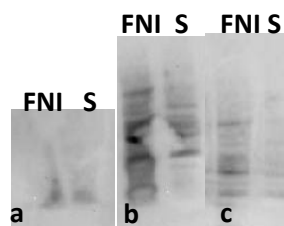


Figura 7 - Imunodeteção em membrana da proteína p53 nas fracções FNI- Fracção nuclear I e S- Sobrenadante provenientes da secção 2.7. Foram utilizadas nestas experiências três diluições do anticorpo primário (anti-proteína p53) : a. 1:500; b. 1: 1000 e c. 1:2500.

Como os resultados eram sempre negativos, contactámos os serviços técnicos da Santa Cruz (empresa fornecedora do anticorpo) que se prontificou a ajudar fornecendo outros anticorpos para a mesma proteína. Assim foram-nos fornecidos vários anticorpos: anticorpos policlonais anti- proteína p53 produzidos em coelho e em cabra mas de outros lotes e um anticorpo monoclonal anti- proteína p53 produzido em rato. Ainda por sugestão do suporte técnico da Santa Cruz, a quantidade de proteína a ser colocada em cada poço no gel passou a ser 50 µg, em vez de 30 µg e o procedimento da imunodeteção foi alterado de acordo com o descrito por Medvedev e colaboradores (75). Assim, neste procedimento, cada membrana foi inicialmente bloqueada durante 1 h à temperatura ambiente, em 5% (m/v) de MBA^{xxx} (GE, HealthCare) preparado em TBST^{xxxi}, tampão composto por 2,42 g.L⁻¹ Tris, pH 7,4, 29,28 g.L⁻¹ NaCl e 0,05% (v/v) Tween 20. Seguidamente, a membrana foi incubada com o anticorpo primário (usando a diluição 1:200 em 2,5% de MBA/TBS^{xxxii}) a 4 °C durante a noite. O tampão TBS era constituído por 2,42 g.L⁻¹ Tris, pH 7,4, 29,28 g.L⁻¹ NaCl. Os anticorpos primários utilizados foram o anticorpo policlonal anti-proteína p53 de coelho, o anticorpo policlonal anti-proteína p53 de cabra e o anticorpo policlonal de cabra anti-ATP5E; todos estes anticorpos foram fornecidos pela Santa Cruz Biotechnology, Inc. Todos os anticorpos anti-p53 foram utilizados como marcadores da fracção nuclear e o anticorpo anti-ATP5E foi utilizado como marcador da fracção mitocondrial. Foi também utilizado o anticorpo policlonal anti-actina, produzido em coelho (Pierce). Após três lavagens de 5 min com TBST, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários, conjugados com peroxidase e produzidos especificamente contra as IgG do animal do anticorpo primário utilizado e de acordo com as instruções do fabricante. Estas diluições foram feitas em TBS com 2,5% de MBA. Após incubação da membrana com os anticorpos secundários, foram feitas três lavagens de 5 min com TBST e uma lavagem final com TBS durante 5 min. No método utilizado, para que se possam visualizar as bandas, é necessário adicionar um substrato apropriado (Lumigen™ TMA-6). Este substrato irá dar origem ao produto quimioluminiscente por acção da peroxidase e que será responsável pela emissão do sinal associado ao método de detecção seleccionado. As membranas foram visualizadas no aparelho Molecular Imager ChemiDoc XRS da BioRad com o software Quantity One®, em que as condições de visualização foram as seguintes: exposições com intervalos de 30 em 30 s perfazendo um total de 1200 s com um total de 40 imagens obtidas.

^{xxx} Do inglês *Membrane Blocking Agent*

^{xxxi} Do inglês *Tris Buffer Saline with Tween*

^{xxxii} Do inglês *Tris Buffer Saline*

“Análise proteómica das fracções subcelulares de uma linha de neuroblastomas humanos”

Nesta fase apenas se testou a diluição mais baixa, pois a questão nesta altura não era ainda otimizar a diluição, mas garantir que estávamos a detectar a proteína certa para que o método de fraccionamento pudesse ser validado por esta técnica. Deste modo, foi utilizada a diluição de 1:200 para o anticorpo primário. Com o anticorpo anti-p53 produzido em coelho e de um lote diferente do inicialmente testado, visualizámos uma banda distinta e bastante concentrada. No entanto, quando colocámos, lado a lado a disposição dos marcadores de massa molecular (depois da membrana ter sido corada inespecificamente com Ponceau S), verificámos que a banda que aparentava ser bastante específica não deveria ser o p53 pois, de acordo com a sua massa molecular, a banda representada na membrana corresponde a uma massa molecular de cerca de 35 kDa (Figura 8) que não é o tamanho esperado para a proteína em análise.

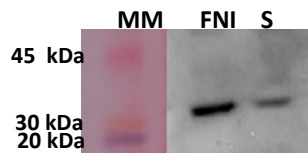


Figura 8- Imunodeteção em membrana da proteína p53 com o anticorpo anti-p53 produzido em coelho, nas fracções FNI- Fracção nuclear I e S- Sobrenadante provenientes da secção 2.7. Foi utilizada a diluição de 1:200. Comparação da sua posição com os marcadores marcados inespecificamente com Ponceaus S (coluna MM), cuja massa molecular está indicada em kDa.

Depois de terem sido utilizados dois anticorpos de coelho, foi feita uma nova tentativa com anticorpo anti-p53 em que o hospedeiro foi rato. Nesta abordagem não nos foi possível visualizar bandas, em nenhuma das vezes em que repetimos este procedimento. Foi feita uma nova experiência utilizando um anticorpo diferente, neste caso o p53 em que o hospedeiro foi a cabra. Para este anticorpo tínhamos a informação que estava a funcionar em imunodeteção em membrana, já que nos tinha sido gentilmente cedido pelo grupo Toxicologia e Farmacologia Mitochondrial do Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra) que o estava a usar. Os primeiros resultados obtidos com este anticorpo indicavam a existência de uma ligação do anticorpo a um polipéptido. No entanto esta banda surgiu, de novo, na localização com uma massa molecular aparente errada, como se pode visualizar na Figura 9.

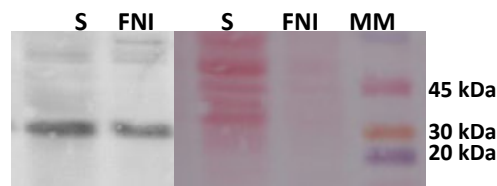


Figura 9- Imunodeteção em membrana da proteína p53 com o anticorpo produzido em cabra nas fracções FNI- Fracção nuclear I e S- Sobrenadante provenientes da secção 2.7. Foi utilizada a diluição de 1:200 do anticorpo primário (anti-proteína p53), estando a massa molecular registada em kDa.

Nesta fase e sabendo antecipadamente que este anticorpo estava a funcionar e a identificar o especificamente antígeno em causa, reavaliou-se a situação e decidiu-se investigar outros parâmetros da metodologia empregue. Levantou-se a questão da qualidade e fiabilidade dos marcadores de massa molecular, já que parecia pouco provável que o anticorpo pudesse estar a detectar sistematicamente uma proteína incorrecta, uma vez que já tinha sido utilizado, sendo conhecido que se ligava à proteína correcta. Neste caso foi feita uma nova experiência com um novo conjunto de marcadores de massa molecular (Precision Plus protein WesternC Standards) e com um gel de acrilamida de acordo com a metodologia utilizada no artigo de Sardão e colaboradores (76), trabalho onde foi utilizado o mesmo anticorpo.

Utilizando o anticorpo policlonal de cabra, e com as alterações empregues foi possível verificar a correcta localização da proteína p53 (Figura 10). Podemos ainda verificar que esta proteína se encontra com maior abundância na zona da fracção enriquecida em núcleos fracção de onde mais tarde será purificada a fracção nuclear indiciando que após a primeira centrifugação já existe um enriquecimento da fracção nuclear, já que a proteína marcadora deste organelo originou um sinal mais intenso nessa fracção em comparação com o obtido com a fracção (S) de onde será a purificada a mitocôndria.

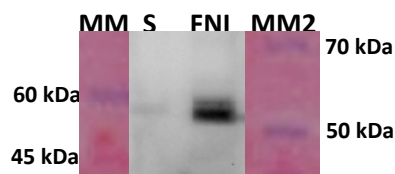


Figura 10 Imunodeteção em membrana da proteína p53 com o anticorpo produzido em cabra nas fracções FNI- Fracção nuclear I e S- Sobrenadante provenientes da secção 2.7. Foi utilizada a diluição de 1:200 e dois marcadores de massa molecular, MM - Colorburst™ Electrophoresis Marker e MM2- de Precision Plus protein WesternC Standards II.

c) Imunodeteccção da proteína ATP5E

Também foi necessário proceder à optimização da detecção da proteína ATP5E pelo anticorpo anti-ATP5E. Também para este anticorpo foram feitas diversas tentativas, tendo apenas sido detectado um sinal da ligação do antígeno a um polipéptido também utilizando o procedimento recomendado pela Santa Cruz, com incubação com o anticorpo durante a noite e utilizando o Tris como solução tampão nas lavagens e incubações. Na Figura 11 podemos ver que a banda da proteína em estudo aparece no local correcto, e que o sinal obtido é muito intenso. Após obtenção deste resultado foi ainda testado o aumento da diluição do anticorpo para 1:500, mas neste caso o resultado não foi positivo, por alguma questão técnica não compreendida. Em várias repetições posteriores não foi possível visualizar o resultado obtido inicialmente. Nesta situação, e devido à massa molecular da proteína, ainda se considerou a hipótese de a proteína estar na fase da electrotransferência do gel para a membrana de PVDF ou ter sido perdida, já que, por vezes proteínas de massa molecular baixa são mais eficientemente transferidas podendo mesmo atravessar a membrana e aparecer na sua face oposta ou perder-se para a solução circundante. Um caso semelhante já foi detectado em trabalhos anteriores para proteínas de baixa massa molecular no laboratório (Santos, C., Laboratório da Biologia da Doença e do Stress, ITQB comunicação pessoal). Uma forma de averiguar esta última hipótese é colocar mais membranas de transferência sobrepostas e realizar a imunodeteccção para todas. Em nenhuma destas experiências foi possível repetir o resultado obtido da primeira vez. Não se prosseguiu o estudo com este anticorpo, pois não seria, assim, possível validar o processo de fraccionamento das mitocôndrias.

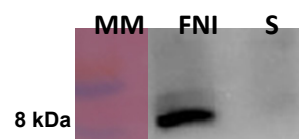


Figura 11 - Imunodeteccção em membrana da proteína ATP5E, com o anticorpo primário anti-ATP5E na diluição de 1:200, nas fracções FNI- Fracção Nuclear I e S- Sobrenadante provenientes da secção 2.4 MM- Marcador Molecular na mesma membrana corada com Ponceau S. Nesta figura o tamanho da banda corresponde ao tamanho esperado para a proteína em estudo que será de 7 kDa.

O tempo dispendido na optimização das imunodeteccções com os dois anticorpos foi bastante longo e não se conseguiu optimizar a mesma para todos. Esta etapa comprometeu seriamente o uso desta metodologia como controlo de qualidade do fraccionamento celular. Outra abordagem que poderia ter sido utilizada para validar o fraccionamento era a medição da actividade enzimática de enzimas considerados marcadores dos organelos celulares em estudo, como, por exemplo, para a

fracção de onde seria retirada a mitocôndria, utilizar a enzima fumarato hidratase ou o citocromo *c* (44). No entanto, para esta técnica, seria necessário muito mais material celular. Por esta razão não foi implementada esta metodologia logo de início que por certo necessitaria também de um período de optimização.

3.3. Optimização do fraccionamento subcelular

O objectivo deste trabalho era optimizar o fraccionamento das fracções nuclear e mitocondrial da linha celular de neuroblastomas humanos, SK-N-MC para que futuramente se pudesse fazer a sua caracterização proteómica. De forma a proceder à sua optimização, o fraccionamento subcelular foi executado utilizando diversas técnicas, de forma sequencial, nomeadamente: a centrifugação diferencial, a ultracentrifugação em gradiente descontínuo e a ultracentrifugação em gradiente contínuo. Foram utilizados gradientes contínuos, pois estes ajudam a distinguir diferenças de densidade que não é possível resolver com os gradientes descontínuos (31). Nas secções seguintes, estão descritas as experiências realizadas para a optimização do processo de extracção e os resultados obtidos ao longo do processo de fraccionamento.

3.3.1. Optimização do procedimento de extracção para o fraccionamento subcelular

De maneira a realizar a extracção dos organelos da linha celular SK-N-MC, foram estudados dois procedimentos experimentais para extracção que estão descritos detalhadamente na secção 2.7 (material e métodos), no entanto, serão aqui descritos resumidamente. Assim, os dois procedimentos foram inicialmente realizados em placa de 6 poços. O procedimento I engloba a lise celular com o tampão composto por 40 mM Tris-HCl, pH 7,4, 250 mM sacarose, 4 mM CaCl_2 , 20 mM MgCl_2 , 1 mg.mL^{-1} DNase (Roche) e 1% (v/v) *cocktail* de inibidor de proteases tipo III^{xxxiii} sem EDTA, 100x concentrado (Calbiochem). Depois são realizadas diversas centrifugações: O homogeneizado foi centrifugado a 600 *g*, 5 min, 4 °C. Os sedimentos foram considerados a fracção nuclear, que será

^{xxxiii} Este cocktail de inibidores é composto por: 1 mM de pepstatina A, 2 mM de leupeptina, 2 mM de Hemissulfato, 1,5 mM de E-64, 5 mM bestatina, 100 mM de AEBSF (clorohidrato de fluoreto de 4-(2-aminoetil)-benzenosulfonilo) e 80 μM de aprotinina.

posteriormente purificada. O sobrenadante foi centrifugado a 100000 *g* durante 35 min a 4 °C. Depois desta centrifugação, o sobrenadante foi considerado a fracção citosólica solúvel e o sedimento foi analisado como sendo a fracção membranas; no procedimento II, a lise das células é realizada com o tampão composto por 100 mM NaCl, 100 mM MES, 50 mM EDTA, 1% (m/v) BSA, pH 6,0, 1 mg.mL⁻¹ DNase (Roche) e 1% (v/v) *cocktail* de inibidor de proteases tipo III sem EDTA, 100x concentrado (Calbiochem), seguidamente as células foram transferidas para um microtubo e a lise foi completada com o auxílio de um pistão. O extracto total foi centrifugado a 600 *g*, 10 min, 4 °C e o sobrenadante foi colocado em novos microtubos. Foi feita uma nova centrifugação do sedimento obtido a 600 *g*, 10 min, 4 °C e o sobrenadante foi retirado e colocado em gelo; o sedimento resultante desta centrifugação foi ressuspensão em 200 µL de tampão de extracção do protocolo II e de seguida centrifugado a 600 *g*, 10 min, 4 °C e o sedimento originado por esta centrifugação foi considerado a fracção nuclear, sendo ressuspensão em 1 mL de tampão de extracção do protocolo II 10X. Foi feita a junção dos sobrenadantes das duas centrifugações anteriores, que de seguida foram centrifugados a 20000 *g*, 30 min, 4 °C, dando origem ao sedimento, guardado como fracção lisossomal, e ao sobrenadante que foi centrifugado a 100000 *g*, 60 min, 4 °C. Depois desta ultracentrifugação o sedimento originado foi ressuspensão em 400 µL de tampão de extracção II e considerado a fracção microssomal. O sobrenadante final foi considerado a fracção citosólica solúvel. Depois de terem sido realizados os procedimentos I e II as amostras foram submetidas a SDS- PAGE num gel de 12 %. Seguidamente, o gel referente a cada um dos protocolos foi submetido a coloração com CALRED™ como descrito na secção 2.11. Pela análise da Figura 12, podemos ver que na fracção FNI estão representados seis polipéptidos principais, de massas moleculares estimadas em 101,5 kDa, 90 kDa, 69,3 kDa, 47,3 kDa, 42,2 kDa e 24,7 kDa. No perfil obtido para a fracção FMI, podemos visualizar três polipéptidos de massas moleculares estimadas em 69,3 kDa, 47,3 kDa e de 24,7 kDa. Os polipéptidos obtidos para a fracção FCI são aparentemente os mesmos que foram obtidos para a fracção FMI, sendo que a banda que vemos representada com 69,3 kDa é mais intensa para esta fracção. A fracção FN1 (fracção nuclear do protocolo I), apresenta um perfil pouco nítido, ou seja, não existe uma boa resolução entre polipéptidos, o que pode estar relacionado com algum componente no tampão de extracção ou da homogeneização que interfira com a migração electroforética. Na fracção membranas (FMI) do protocolo I, distinguem-se três bandas que aparentemente são comuns à fracção do citosol (FCI). Comparando o perfil electroforético obtido para as três fracções com este protocolo, pode dizer-se que este protocolo está claramente a fraccionar os componentes da linha celular em estudo, pois os perfis obtidos entre as fracções nuclear e citosólica são aparentemente distintos entre si.

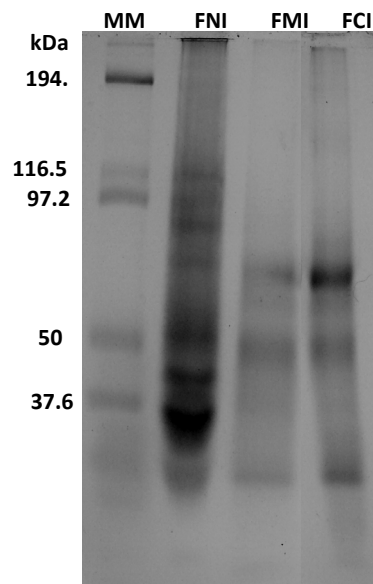


Figura 12- Minigel de SDS PAGE das fracções obtidas após o procedimento I: FNI- Fracção Nuclear do procedimento I; FMI- Fracção membranas do procedimento I; FCI - Fracção citosólica do procedimento I obtidas da linha celular SK-N-MC de acordo com o procedimento I descrito na secção 2.7. O gel foi corado com o corante CALRED™ de acordo com o procedimento descrito anteriormente (secção 2. 11).

No gel que representa as fracções obtidas com o procedimento II (Figura 13), os polipéptidos representados têm massas moleculares estimadas em 58,4 kDa, 119,4 kDa, dois polipéptidos de massa molecular muito próxima com cerca de 186 kDa e da banda com maior massa molecular com cerca de 200 kDa. É possível visualizar que existe uma grande semelhança entre todas as linhas do gel, o que seria expectável já que ao adicionar-se albumina no tampão de lise como agente estabilizante, esta proteína iria necessariamente “contaminar” todas as fracções. Os polipéptidos na zona entre os 50 e os 97,4 kDa, bem como uma outra banda logo acima dos 116,5 kDa, deverão estar associados à adição desta proteínas.

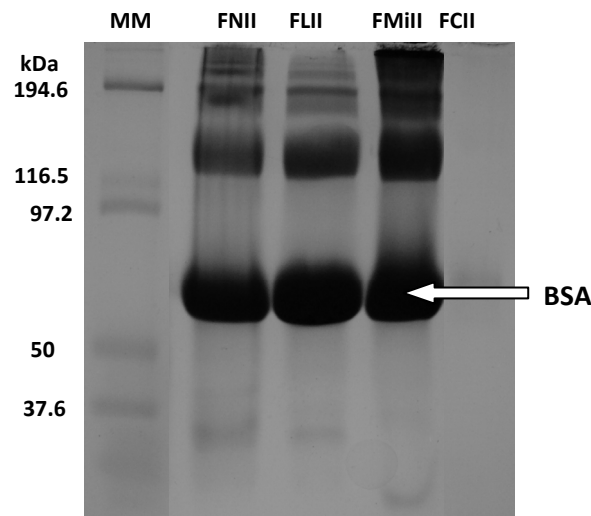


Figura 13- Minigel de SDS PAGE das fracções obtidas após realização do procedimento II: FNII- Fracção nuclear do procedimento II; FLII - Fracção lisossomal do procedimento II; FMII- Fracção microssomal do procedimento II obtidas da linha celular SK-N-MC de acordo com o procedimento II descrito na secção 2.7.

Depois de terem sido realizados os dois procedimentos simultaneamente, concluiu-se que a nível de execução laboratorial, o procedimento I é mais fácil de executar pois não tem tantas etapas. Também é verdade que, com o procedimento II, é possível obter mais fracções subcelulares que no procedimento I; por isso, faz sentido que seja mais elaborado. No entanto, e como o objectivo global será a análise posterior do proteoma das fracções mitocondrial e nuclear não poderíamos ter proteínas “contaminantes” (Figura 13). Assim o procedimento I foi seleccionado para avançar, pois além de ser mais rápido na forma de separação dos organelos, era também aquele mais fácil de executar em termos laboratoriais. Deste modo o procedimento I foi realizado apenas até à centrifugação diferencial onde foram obtidas as fracções FNI - Fracção enriquecida em núcleos e a fracção S que está enriquecida em mitocôndrias e outros organelos Figura 14, fracções que serão posteriormente purificadas por ultracentrifugação isopícnic.

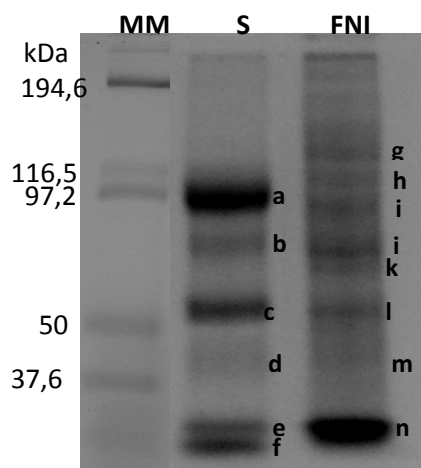


Figura 14- Minigel de SDS PAGE das fracções obtidas após realização do procedimento I isoladamente: S- Sobrenadante; FNI - Fracção nuclear do procedimento I obtidas da linha celular SK-N-MC de acordo com o descrito na secção 2.7. O gel foi corado com o corante CALRED™ de acordo com o procedimento I descrito anteriormente (secção 2. 11).

Na fracção de onde será purificada a fracção mitocondrial (S) podemos visualizar seis polipéptidos, de massas moleculares estimadas em 78,3 kDa (a, Figura 14), 57,2 kDa (b), 38 kDa (c), 28,3 kDa (d) e os polipéptidos de massa molecular mais baixa 20 kDa (e) e 18 kDa (f). Na fracção FNI temos representados vários polipéptidos que estão pouco resolvidos e mal “focados”. No entanto, pela análise da Figura 14, vemos que existem oito polipéptidos principais: uma banda bastante distinta com cerca de 103 kDa (g); outra com 88 kDa (h); um polipéptido com cerca de 69,6 kDa (i); outro polipéptido com 55 kDa (j) outro polipéptido com 48,9 kDa (k); outra banda com cerca de 37,9 kDa (l) um polipéptido com cerca de 28,3 kDa. A banda mais intensa tem uma massa molecular estimada em 18 kDa (n). O padrão obtido para estas duas fracções é claramente distinto. Parecem existir, no entanto polipéptidos que estão representados nas duas fracções: caso das bandas (d) e (m), já os polipéptidos (c) e (j) apresentam-se na mesma zona, no entanto na fracção S, a banda (c) está mais intensa.

Depois de ter sido realizado apenas o procedimento I, notou-se que fazendo crescimento em placa de seis poços o rendimento em organelos no final seria baixo, assim foi necessário fazer algumas alterações. O crescimento das células passou a ser em T-flask de 75 cm². Outro aspecto que foi alterado, relativamente ao procedimento inicial foi o procedimento do pistão para promover o rebentamento das células, pois verificou-se que a repetição deste procedimento teria que ser mais prolongada, pois as 10x inicialmente programadas não eram suficientes para garantir que entre 80 a 90% das células fossem rebentadas. Por isso esta etapa foi realizada 50 x em cada um dos microtubos. Deste modo, ao procedimento I descrito por Hamano e colaboradores (3), foram introduzidas algumas alterações: as células foram propagadas, conforme descrito na secção 2.1

“Análise proteômica das frações subcelulares de uma linha de neuroblastomas humanos”

(material e métodos), em cinco T-flasks de 75 cm², até atingirem cerca de 80 a 90% de confluência. Depois, removeu-se todo o meio de cultura e lavou-se a monocamada celular com 3 mL de PBS pH 7,2 sem Ca²⁺ e Mg²⁺. O PBS foi retirado e foram colocados 3 mL de tampão de extração do procedimento I composto por 40 mM Tris-HCl pH 7,4, 250mM sacarose, 4 mM CaCl₂, 20 mM MgCl₂, 1 mg.mL⁻¹ DNase (Roche) e 1% (v/v) cocktail de inibidor de proteases tipo III sem EDTA 100x, concentrado (Calbiochem). Seguidamente foi feita uma incubação de alguns minutos a 37 °C e na presença de 5% (v/v) CO₂.

Depois da incubação, as células foram removidas da superfície do T-flask com o auxílio do raspador de células, sendo distribuídas em microtubos de 1,5 mL de volume em alíquotas de 1 mL onde foram se promoveu o rebentamento das células com o auxílio de um pistão, repetindo este procedimento 50 vezes, este número de repetições foi obtido após visualizar as células ao microscópio usando o azul de tripano (GIBCO) 0,1 % (v/v). Este procedimento deve ser levado a cabo até 80 a 90% das células estarem lisadas. O homogeneizado obtido foi centrifugado a 600 g, 5 min, 4 °C (Centrifuga Eppendorf modelo 5415 R). Os sedimentos foram considerados a fração nuclear (FNI), que será posteriormente purificada, pois esta contém além do núcleo (organelo de interesse para o estudo), membranas celulares e outros organelos. O sobrenadante (S) de onde será obtida a fração mitocondrial foi colhido e transferido para novos microtubos. O processo de extração e o passo de lise celulares são das etapas mais importantes no fracionamento, se a extração não for eficiente e a quantidade de material não for suficiente há risco de as restantes etapas ficarem comprometidas.

3.3.2. Ultracentrifugação das fracções enriquecidas em mitocôndrias em gradiente descontínuo de sacarose

Para isolar as mitocôndrias dos restantes organelos que também se encontram na fracção S, ou seja, o sobrenadante obtido depois da centrifugação diferencial, foi necessário proceder à técnica de ultracentrifugação isopícnica em gradiente descontínuo de sacarose.

Depois da centrifugação os gradientes foram colhidos em alíquotas, conforme descrito na secção 2.8.i (material e métodos). De acordo com a bibliografia, a densidade da mitocôndria encontra-se entre os 25 e os 35% (m/v) de sacarose (44). Assim as fracções que foram posteriormente analisadas foram as que se encontravam nesta gama no gradiente. Após termos realizado a quantificação proteica das fracções de interesse(presentes na gama entre 25 e 35% de sacarose), verificamos que a sua concentração proteica era baixa. Por isso foi necessário sedimentar as proteínas com acetona antes de as aplicar no gel. Pela análise da Figura 15, onde estão representados os perfis electroforéticos obtidos para a fracção S e para as fracções que de interesse foram retiradas do gradiente vemos que não há diferenças significativas entre o padrão obtido para a fracção que entrou no gradiente e o padrão obtido para as fracções. Assim mais uma vez se pode verificar que a técnica de imunodeteccção em membrana teria sido uma boa abordagem, para que se pudessem fazer distinções que a nível da coloração com CALRED™ não foram possíveis. Pela análise do perfil electroforético obtido na Figura 15 das fracções que se encontravam entre os 25 e os 35% (m/v) de sacarose, não foi possível concluir em qual delas está a fracção enriquecida em mitocôndrias.

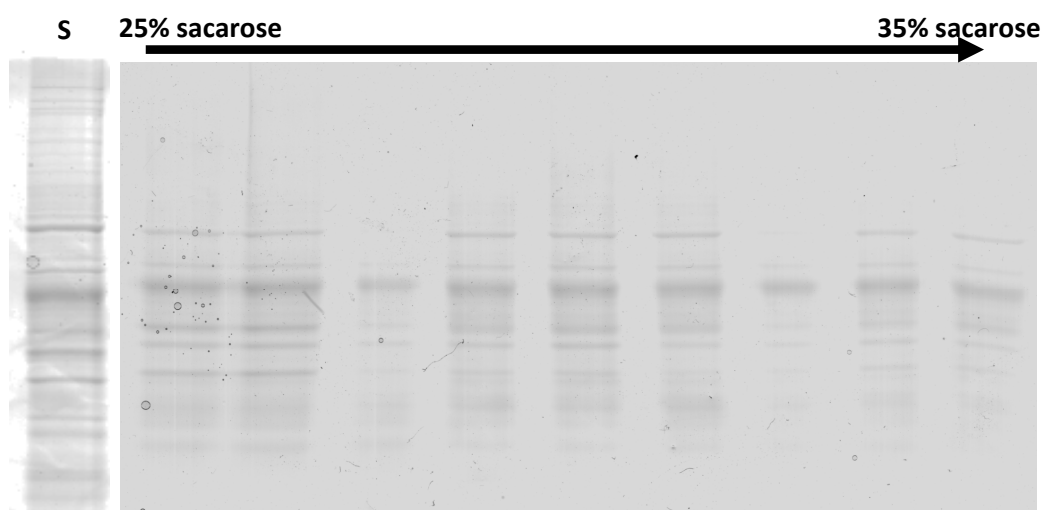


Figura 15 - Minigel de SDS PAGE da fracção S (Sobrenadante) e das fracções da linha celular SK-N-MC presentes no gradiente descontínuo na gama entre 25 e 35% (m/v) de sacarose, obtidas de acordo com a secção 2.8a. O gel foi corado com o corante CALRED™ de acordo com o procedimento descrito anteriormente (vide secção 2.11).

3.3.3. Ultracentrifugação das fracções enriquecidas em núcleos em gradiente descontínuo de sacarose

A fracção FNI (fracção nuclear do procedimento I), de onde será purificado o núcleo foi sujeita a ultracentrifugação isopícnica num gradiente descontínuo de sacarose. Depois de ser realizada a ultracentrifugação, os gradientes foram colhidos em alíquotas de 1 mL. Considerando que a densidade do núcleo se encontra na interface das camadas 15 e 70% (m/v) de sacarose (44), as fracções analisadas posteriormente, foram as que se encontravam nesta gama do gradiente. Tanto a fracção FNI como as fracções que se encontravam na interface das camadas 15 e 70 % (m/v) de sacarose foram submetidas a uma quantificação proteica pelo método de Lowry (vide secção 2.9 material e métodos). Após a quantificação proteica, verificamos que as amostras tinham uma concentração proteica baixa, por isso foi necessário sedimentar as proteínas com acetona antes de as aplicar no gel SDS-PAGE. O perfil electroforético obtido, após coloração com nitrato de prata (secção 2.12 material e métodos) pode ver-se na Figura 16, ao analisarmos esta figura, é possível visualizar que não há diferenças significativas entre a o perfil de bandas obtido para fracção (FNI) que entrou no gradiente e o perfil de bandas as restantes fracções que foram colhidas após a centrifugação. Com este resultado não foi possível fazer a distinção e a identificação de qual destas fracções teria a fracção nuclear enriquecida. Assim, mais uma vez se pode verificar que a técnica de imunodeteção em membrana teria sido uma boa abordagem, para identificar a fracção enriquecida.

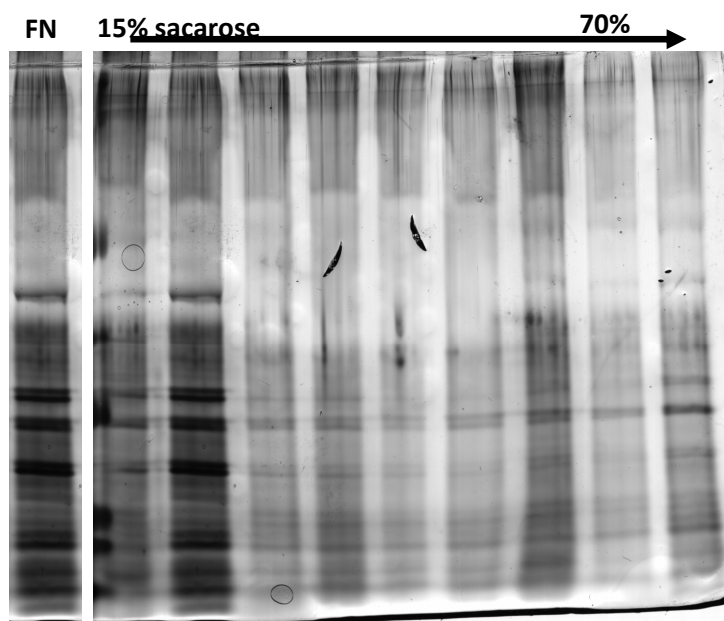


Figura 16 - Minigel de SDS PAGE da fracção FNI- (Fracção Nuclear I) e das fracções da linha celular SK-N-MC presentes no gradiente descontínuo na gama entre 15 e 70% de sacarose obtidas de acordo com a secção 2.8b. O gel foi corado com o corante nitrato de prata de acordo com o procedimento descrito anteriormente (vide secção 2.11). 63

3.3.4. Ultracentrifugação das fracções enriquecidas em mitocôndrias em gradiente contínuo de sacarose

Considerando que não foi possível verificar a distribuição da proteína ATP5E para saber quais as fracções enriquecidas em mitocôndrias. Foram submetidas a ultracentrifugação em gradiente contínuo de sacarose, as fracções que correspondiam à zona de densidade do organelo em estudo (entre os 25 e os 35 % (m/v) de sacarose). As amostras foram submetidas a uma quantificação proteica pelo método de Lowry (vide secção 2.9). Após a quantificação proteica, verificou-se que as amostras tinham uma concentração proteica baixa, significando que o rendimento final dos organelos foi muito baixo (31), sendo esta uma das grandes desvantagens dos gradientes contínuos.

3.3.5. Ultracentrifugação das fracções enriquecidas em núcleos em gradiente contínuo de sacarose

Para que os núcleos fossem relativamente purificados, foi também realizada ultracentrifugação em gradiente contínuo de sacarose. No entanto, ao fazer a quantificação proteica das fracções deste gradiente, os valores obtidos para a concentração proteica eram muito baixos e não foram visualizadas bandas quando foram realizados géis com coloração CALRED™ e assim não foram prosseguidos os estudos com estas fracções, pois o rendimento final deste organelo também foi muito baixo, esta situação está descrita a literatura como sendo uma das desvantagens dos gradientes contínuos (31).

4. Conclusões e perspectivas futuras

No presente trabalho foi possível obter um padrão do proteoma da linha celular SK-N-MC, demonstrando que a técnica de electroforese bidimensional é, de facto, uma ferramenta poderosa para se estudar o proteoma de uma determinada linha celular, tendo sempre em conta que é necessário fazer uma optimização de forma que se possa obter um proteoma estável e reproduzível. Seguidamente seria interessante prosseguir para a detecção e identificação dos *spots*, por espectrometria de massa, que correspondem a polipéptidos que são diferencialmente expressos quando comparamos o perfil proteico obtido em condições normais com o perfil obtido quando as células desta linha são submetidas a agentes naturais antioxidantes, como os polifenóis oriundos das plantas, previamente a um stresse oxidativo. A técnica de imunodeteção em membrana é utilizada com sucesso em inúmeros estudos. No entanto, no presente trabalho, o facto de a sua optimização ter demorado muito tempo e de termos tido vários problemas técnicos comprometeu a avaliação do fraccionamento subcelular.

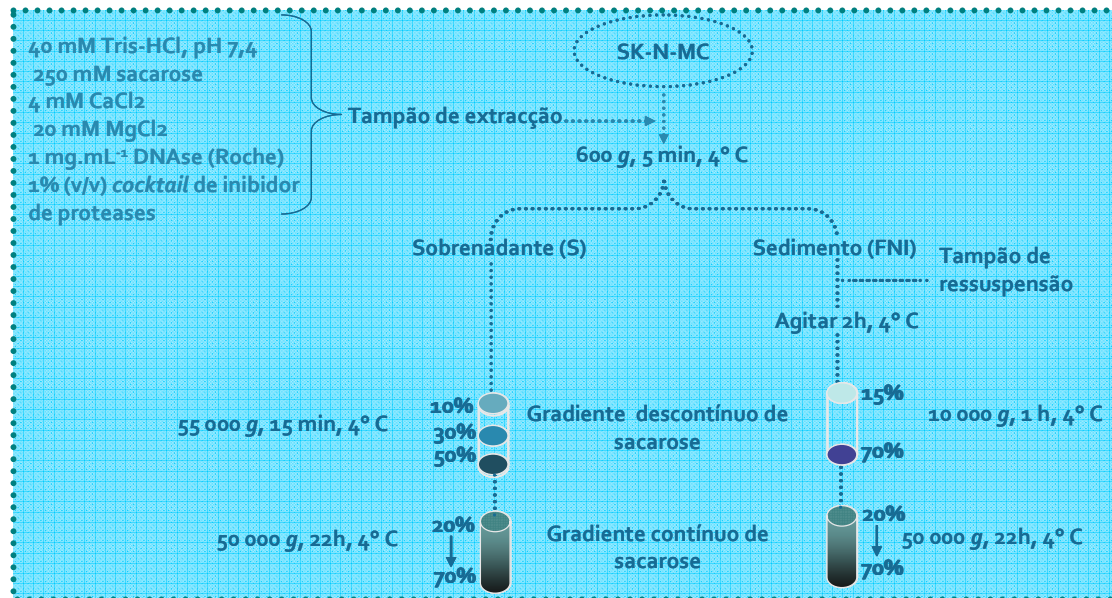
Outro factor que é importante salientar é que a proteína p53, embora se apresente no núcleo não está exclusivamente localizada neste organelo. A localização desta proteína pode ser influenciada por diversas vias (77). Assim, esta não será a melhor para estudos de fraccionamento subcelular pois não pode ser adereçada a um único compartimento celular como acontece com a ATP5E que apenas se encontra na mitocôndria. Deste modo, para estudos de fraccionamento em que o organelo de interesse seja o núcleo, as histonas são uma alternativa para os estudos de imunodeteção, pois apenas se encontram no núcleo.

O fraccionamento subcelular é, claramente, uma técnica exigente e que necessita de mais tempo de optimização.

No presente trabalho foram realizados as diversas metodologias que compõem a maioria dos estudos de fracionamento. No esquema 4 estão representadas as diversas etapas que compõem o processo de fraccionamento subcelular que foi realizado, nomeadamente a ruptura celular e a homogeneização, estas duas etapas foram realizadas utilizando um pistão. Em estudos posteriores será importante promover a desagregação celular com o Dounce Homogeneizer para ver se há diferenças nos resultados obtidos e se estes melhoram com este novo instrumento; a homogeneização, foi feita com o auxílio do tampão que é adicionado logo no início da experiência, que sendo isotónico promove a entrada de água nas células facilitando a sua ruptura e a posterior homogeneização dos organelos. Neste tampão foi adicionada DNase pois a linha celular utilizada é bastante rica em DNA e este poderia interferir com os resultados obtidos, o cocktail inibidor de

“Análise proteómica das fracções subcelulares de uma linha de neuroblastomas humanos”

proteases também é um componentes importante pois sendo um dos objectivos deste trabalho obter o proteoma dos organelos em estudo, a existência de proteases iria diminuir o rendimento da extracção por isso este é um componente crucial em estudos desta natureza.



Esquema 4 – Esquema que representa as diversas metodologias utilizadas durante o processo de fraccionamento subcelular, para isolamento e purificação das mitocôndrias (S- sobrenadante) e núcleos (Fracção Nuclear I) da linha celular SK-N-MC. As células SK-N-MC, foram extraídas de acordo com o descrito na secção de materiais e métodos. Depois foram submetidas a centrifugação diferencial, ultracentrifugação em gradiente descontinuo e ultracentrifugação em gradiente contínuo.

Para avaliar a eficiência do fraccionamento por SDS-PAGE, foram utilizados dois métodos de coloração que se distinguem pela sensibilidade, nomeadamente o método de coloração com nitrato de prata e o método de coloração com CALRED. A coloração com nitrato de prata é um dos métodos mais sensíveis de coloração pois consegue detectar entre 1 a 10 ng de proteína. Mesmo com este método no final do procedimento não foram observadas bandas, indiciando que a concentração proteica estava fora do limite de detecção deste método. Assim, de forma a prevenir que esta situação volte a acontecer, decorrem no laboratório estudos de forma que se possa aumentar a escala do material de partida para assegurar que no final possa haver material suficiente para prosseguir com a análise, nomeadamente a análise proteómica por electroforese bidimensional das fracções. O facto de terem sido utilizadas duas fracções distintas também foi um factor que poderá ter influenciado o resultado final. Assim, neste momento, no laboratório, além de estarmos a ajustar vários pormenores do fraccionamento, também focaremos a nossa atenção especificamente na mitocôndria. Temos em curso uma investigação que não só envolve a identificação do seu proteoma como também análises a nível da proteómica redox deste organelo.

5. Referências bibliográficas

- [1] CHANG L, ALI A, HASSAN S, ABUBAKAR S. Human neuronal cell protein responses to Nipah virus infection. *Virology*. 2007;**4**:54.
- [2] SCHULZ I, ZEITSCHEL U, RUDOLPH T, et al. Subcellular localization suggests novel functions for prolyl endopeptidase in protein secretion. *J Neurochem*. 2005;**94**:970-9.
- [3] HAMANO T, MUTOH T, TABIRA T, et al. Abnormal intracellular trafficking of high affinity nerve growth factor receptor, Trk, in stable transfectants expressing presenilin 1 protein. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005;**137**:70-6.
- [4] MORRIS R, FILLENZ M. Neuroscience The Science of the Brn. Liverpool: The British Neuroscience Association, 2003.
- [5] DAWSON V, DAWSON T. Deadly conversations: nuclear-mitochondrial cross-talk. *J Bioenerg Biomembr*. 2004;**36**:287-94.
- [6] BUTTERFIELD DA, REED T, NEWMAN SF, SULTANA R. Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radic Biol Med*. 2007;**43**:658-77.
- [7] WANG JY, WEN LL, HUANG YN, CHEN YT, KU MC. Dual effects of antioxidants in neurodegeneration: direct neuroprotection against oxidative stress and indirect protection via suppression of glia-mediated inflammation. *Curr Pharm Des*. 2006;**12**:3521-33.
- [8] BUTTERFIELD D, GNJEK A, POON H, et al. Redox proteomics identification of oxidatively modified brain proteins in inherited Alzheimer's disease: an initial assessment. *J Alzheimers Dis*. 2006;**10**:391-7.
- [9] DAVIES MJ. The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta*. 2005;**1703**:93-109.
- [10] ERECIŃSKA M, SILVER IA. ATP and brain function. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1989;**9**:2-19.
- [11] FOSTER KA, GALEFFI F, GERICH FJ, TURNER DA, MULLER M. Optical and pharmacological tools to investigate the role of mitochondria. *Progress in Neurobiology*. 2006;**79**:136-71.
- [12] KNOTT A, BOSSY-WETZEL E. Impairing the mitochondrial fission and fusion balance: a new mechanism of neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;**1147**:283-92.
- [13] SOTO C, ESTRADA L. Protein misfolding and neurodegeneration. *Arch Neurol*. 2008;**65**:184-9.
- [14] HOL E, SCHEPER W. Protein quality control in neurodegeneration: walking the tight rope between health and disease. *J Mol Neurosci*. 2008;**34**:23-33.
- [15] MARTIN J. Molecular basis of the neurodegenerative disorders. *N Engl J Med*. 1999;**340**:1970-80.
- [16] SZETO H. Development of mitochondria-targeted aromatic-cationic peptides for neurodegenerative diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;**1147**:112-21.
- [17] SOTO C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2003;**4**:49-60.
- [18] SOWELL R, OWEN J, BUTTERFIELD D. Proteomics in animal models of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ageing Res Rev*. 2009;**8**:1-17.
- [19] SALZANO A, PARON I, PINES A, et al. Differential proteomic analysis of nuclear extracts from thyroid cell lines. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2006;**833**:41-50.
- [20] RIGHETTI P, CASTAGNA A, ANTONUCCI F, et al. Proteome analysis in the clinical chemistry laboratory: myth or reality? *Clin Chim Acta*. 2005;**357**:123-39.
- [21] PIENAAR I, DANIELS W, GÖTZ J. Neuroproteomics as a promising tool in Parkinson's disease research. *J Neural Transm*. 2008;**115**:1413-30.

- [22] HUBER L, PFALLER K, VIETOR I. Organelle proteomics: implications for subcellular fractionation in proteomics. *Circ Res*. 2003;**92**:962-8.
- [23] CHAIYARIT S, THONGBOONKARD V. Comparative analyses of cell disruption methods for mitochondrial isolation in high-throughput proteomics study. *Anal Biochem*. 2009.
- [24] KISLINGER T, COX B, KANNAN A, et al. Global survey of organ and organelle protein expression in mouse: Combined proteomic and transcriptomic profiling. *Cell*. 2006;**125**:173-86.
- [25] ABDALLA K, THOMSON J, RAFUDEEN M. Protocols for nuclei isolation and nuclear protein extraction from the resurrection plant *Xerophyta viscosa* for proteomic studies. *Anal Biochem*. 2009;**384**:365-7.
- [26] O'FARRELL P. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*. 1975;**250**:4007-21.
- [27] KLOSE J, KOBALZ U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis*. 1995;**16**:1034-59.
- [28] HAMDAN M, RIGHETTI P. Assessment of protein expression by means of 2-D gel electrophoresis with and without mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*. 2003;**22**:272-84.
- [29] RIGHETTI P, CASTAGNA A, ANTONIOLI P, BOSCHETTI E. Prefractionation techniques in proteome analysis: the mining tools of the third millennium. *Electrophoresis*. 2005;**26**:297-319.
- [30] BEREZNEY R, COFFEY D. Nuclear matrix. Isolation and characterization of a framework structure from rat liver nuclei. *J Cell Biol*. 1977;**73**:616-37.
- [31] PASQUALI C, FIALKA I, HUBER L. Subcellular fractionation, electromigration analysis and mapping of organelles. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1999;**722**:89-102.
- [32] HUBER L. Is proteomics heading in the wrong direction? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;**4**:74-80.
- [33] GRUENBERG J, HOWELL K. Fusion in the endocytic pathway reconstituted in a cell-free system using immuno-isolated fractions. *Prog Clin Biol Res*. 1988;**270**:317-31.
- [34] FIALKA I, PASQUALI C, LOTTSPEICH F, AHORN H, HUBER L. Subcellular fractionation of polarized epithelial cells and identification of organelle-specific proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 1997;**18**:2582-90.
- [35] PASQUALI C, FIALKA I, HUBER L. Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins. *Electrophoresis*. 1997;**18**:2573-81.
- [36] TRIBL F, MARCUS K, BRINGMANN G, MEYER H, GERLACH M, RIEDERER P. Proteomics of the human brain: sub-proteomes might hold the key to handle brain complexity. *J Neural Transm*. 2006;**113**:1041-54.
- [37] DE ROOIJ K, DORSMAN J, SMOOR M, DEN DUNNEN J, VAN OMMEN G. Subcellular localization of the Huntington's disease gene product in cell lines by immunofluorescence and biochemical subcellular fractionation. *Hum Mol Genet*. 1996;**5**:1093-9.
- [38] BROOKES P, PINNER A, RAMACHANDRAN A, et al. High throughput two-dimensional blue-native electrophoresis: a tool for functional proteomics of mitochondria and signaling complexes. *Proteomics*. 2002;**2**:969-77.
- [39] HARTWIG S, FECKLER C, LEHR S, et al. A critical comparison between two classical and a kit-based method for mitochondria isolation. *Proteomics*. 2009;**9**:3209-14.
- [40] WALKER J, LUTTER R, DUPUIS A, RUNSWICK M. Identification of the subunits of F1F0-ATPase from bovine heart mitochondria. *Biochemistry*. 1991;**30**:5369-78.
- [41] ANTIBODIES A. (2008) Subcellular markers-mitochondrial Markers. [www document] www.abcam.com [accessed on 09-10-2008 2009]
- [42] FOUNTOULAKIS M, SCHLAEGER E. The mitochondrial proteins of the neuroblastoma cell line IMR-32. *Electrophoresis*. 2003;**24**:260-75.
- [43] HANSON B, SCHULENBERG B, PATTON W, CAPALDI R. A novel subfractionation approach for mitochondrial proteins: a three-dimensional mitochondrial proteome map. *Electrophoresis*. 2001;**22**:950-9.

- [44] SCHEFFLER N, MILLER S, CARROLL A, et al. Two-dimensional electrophoresis and mass spectrometric identification of mitochondrial proteins from an SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *Mitochondrion*. 2001;**1**:161-79.
- [45] ESCOBAR M, HOELZ D, SANDOVAL J, HICKEY R, GROSFELD J, MALKAS L. Profiling of nuclear extract proteins from human neuroblastoma cell lines: the search for fingerprints. *J Pediatr Surg*. 2005;**40**:349-58.
- [46] BÖRNER A, WARNKEN U, SCHNÖLZER M, et al. Subcellular protein extraction from human pancreatic cancer tissues. *Biotechniques*. 2009;**46**:297-304.
- [47] MCDONALD T, VAN EYK J. Mitochondrial proteomics. Undercover in the lipid bilayer. *Basic Res Cardiol*. 2003;**98**:219-27.
- [48] BROOKES P, YOON Y, ROBOTHAM J, ANDERS M, SHEU S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;**287**:C817-33.
- [49] MODICA-NAPOLITANO J, SINGH K. Mitochondrial dysfunction in cancer. *Mitochondrion*. 2004;**4**:755-62.
- [50] SCHON E, MANFREDI G. Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction. *J Clin Invest*. 2003;**111**:303-12.
- [51] HØJLUND K, MOGENSEN M, SAHLIN K, BECK-NIELSEN H. Mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes and obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008;**37**:713-31, x.
- [52] GORSKI S, MISTELI T. Systems biology in the cell nucleus. *J Cell Sci*. 2005;**118**:4083-92.
- [53] HWANG S, LUNDGREN D, MAYYA V, et al. Systematic characterization of nuclear proteome during apoptosis: a quantitative proteomic study by differential extraction and stable isotope labeling. *Mol Cell Proteomics*. 2006;**5**:1131-45.
- [54] GÖRG A, OBERMAIER C, BOGUTH G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 2000;**21**:1037-53.
- [55] GÖRG A, ET AL.. Two Dimensional Electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis. A Laboratory manual. Technical University of Munich, 2007: 1-16.
- [56] PONTES V. Estudo de plantas endêmicas com actividade antioxidante na neurodegeneração. Lisboa: Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 2008: 50.
- [57] LAEMMLI U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;**227**:680-5.
- [58] NEUHOFF V, AROLD N, TAUBE D, EHRHARDT W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*. 1988;**9**:255-62.
- [59] BRADFORD M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;**72**:248-54.
- [60] NEUHOFF VA, ET AL.. Electrophoresis. 1988;**9**:255-62.
- [61] STORRIE B, MADDEN E. Isolation of subcellular organelles. *Methods Enzymol*. 1990;**182**:203-25.
- [62] LIN S, HICKEY R, MALKAS L. The isolation of a DNA synthesome from human leukemia cells. *LEUKEMIA RESEARCH*. 1997;**21**:501-12.
- [63] FERREIRA R, FRANCO E, TEIXEIRA A. Calcium- and magnesium-dependent aggregation of legume seed storage proteins. *J Agric Food Chem*. 1999;**47**:3009-15.
- [64] LOWRY O, ROSEBROUGH N, FARR A, RANDALL A. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;**193**:265-75.
- [65] CHOI JK, HONG HY, YOO GS. Protein staining with calconcarboxylic acid in polyacrylamide gels. In: WALKER JM, ed. The Protein Protocols Handbook. Second Edition edn. Protein Protoc. Handb: Humana Press, 1996: 259-63.
- [66] BLUM H, BEIER H, GROSS HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 1987: 93-99.

- [67] SWERDLOW P, FINLEY D, VARSHAVSKY A. Enhancement of immunoblot sensitivity by heating of hydrated filters. *Anal Biochem*. 1986;**156**:147-53.
- [68] FERREIRA RB, SHAW NM. Effect of osmotic stress on protein turnover in *Lemna minor* fronds. *Planta*. 1989;**179**:456-65.
- [69] SALINOVICH O, MONTELARO R. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*. 1986;**156**:341-7.
- [70] PLUDER F, SINZ A, BECK-SICKINGER A. Proliferative effect of calcitonin gene-related peptide is induced by at least five proteins as identified by proteome profiling. *Chem Biol Drug Des*. 2007;**69**:14-22.
- [71] BERKELMAN TS, ET AL.. 2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients: Principles and Methods: Amersham Pharmacia Biotech, 1998.
- [72] MARTINS D, ET AL.. The use of ASB-14 in combination with CHAPS is the best for solubilization of human brain proteins for two-dimensional gel electrophoresis. *Briefings in functional genomics and proteomics*. 2007;**6**:70-75.
- [73] PLUDER F. Proliferative Effect of Calcitonin Gene-related Peptide is Induced by at least Five Proteins as Identified by Proteome Profiling. *Chem Biol Drug Des* 2007;**69**:14-22.
- [74] BAE S, HARRIS A, HAINS P, et al. Strategies for the enrichment and identification of basic proteins in proteome projects. *Proteomics*. 2003;**3**:569-79.
- [75] MEDVEDEV A, LENTSCHAT A, WAHL L, GOLENBOCK D, VOGEL S. Dysregulation of LPS-induced Toll-like receptor 4-MyD88 complex formation and IL-1 receptor-associated kinase 1 activation in endotoxin-tolerant cells. *J Immunol*. 2002;**169**:5209-16.
- [76] SARDÃO V, OLIVEIRA P, HOLY J, OLIVEIRA C, WALLACE K. Doxorubicin-induced mitochondrial dysfunction is secondary to nuclear p53 activation in H9c2 cardiomyoblasts. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009;**64**:811-27.
- [77] LIANG S, CLARKE M. Regulation of p53 localization. *Eur.J.Biochem*. 2001;**268**:2779-2783.

Anexo I

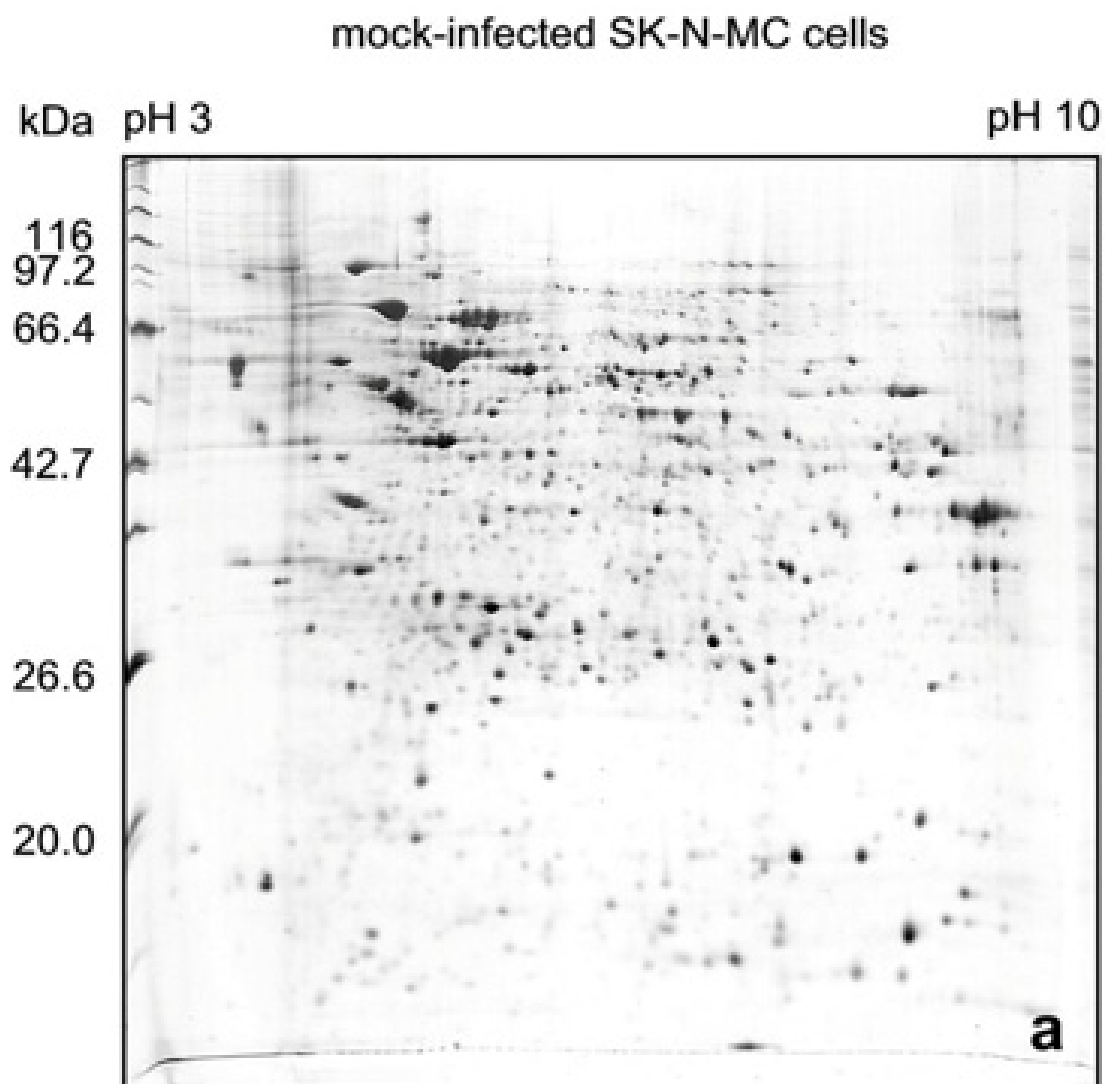


Figura 3- Gel de electroforese bidimensional do proteoma total da linha celular SK-N-MC , segundo Chang e colaboradores (1), no estudo da resposta dos neuroblastomas à infecção pelo vírus Nipah.