

PADRONIZAÇÃO E COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE RAFTS DE MEMBRANA E AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DA PROTEÍNA PRECURSORA AMILÓIDE E DA BETA-SECRETASE NOS MICRODOMÍNIOS LIPÍDICOS

Fernanda dos Santos Petry, Fernando Kreutz, Bruna Estefanelo da Rosa, Sabrina Beal Pizzato, Florencia María Barbé-Tuana e Vera Maria Treis Trindade.
(Dep. Bioquímica - ICBS - UFRGS)
fernanda.petry@ufrgs.br

INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer é uma desordem neurodegenerativa que leva à perda progressiva e irreversível da memória e das demais funções cognitivas. Sua patogênese envolve a cascata amilóide, via pela qual a proteína precursora amilóide (APP), ao ser alvo da beta-secretase (BACE1), inicia um processo de clivagem proteolítica através do qual é produzido o peptídeo beta-amilóide (A β). Ao sofrer processo de agregação, este peptídeo, na forma oligomérica ou fibrilada, passa a exercer efeitos neurotóxicos importantes [1].

Os mecanismos que regulariam a cascata amilóide ainda não foram completamente elucidados, porém dados sugerem que a organização lipídica das membranas e a dinâmica de seus microdomínios poderiam modular esta cascata (Figura 1). O início do processamento amiloidogênico da APP por BACE1 estaria condicionado a uma colocação destas proteínas em microdomínios de membrana (*rafts*), ambiente no qual a enzima BACE1 teria maior atividade [2].

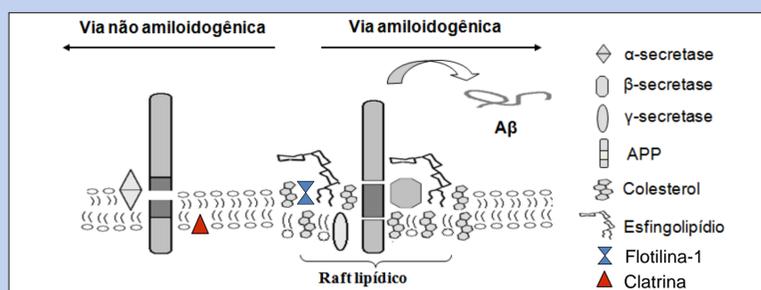


Figura 1. Compartimentalização do processo amiloidogênico nos rafts lipídicos

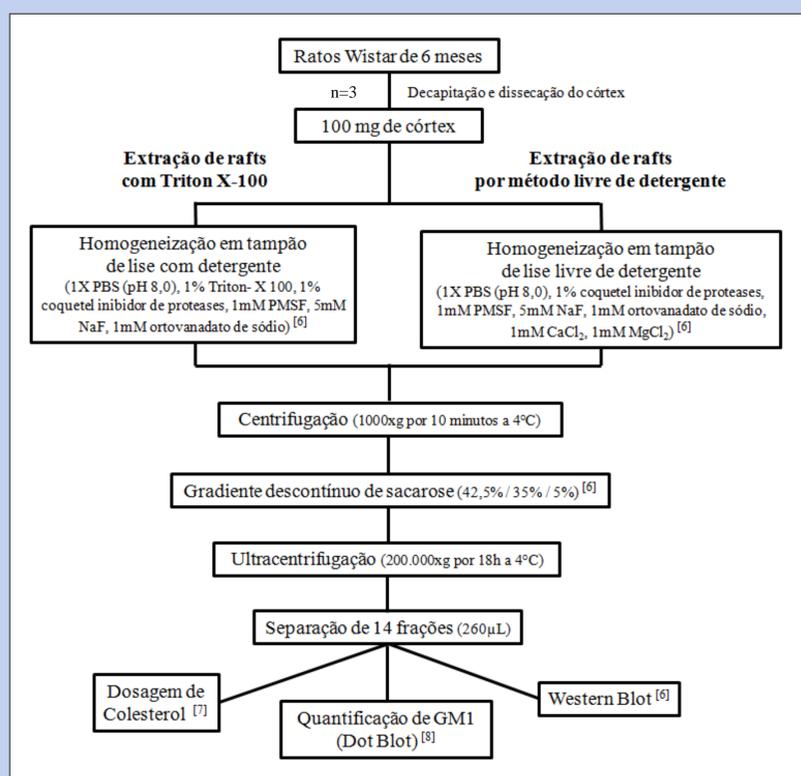
Bioquimicamente caracterizados por seu enriquecimento em colesterol e esfingolípídios, os *rafts* funcionam como plataformas lipídicas especializadas, capazes de compartimentalizar eventos celulares ao nível de membrana, bem como regular a atividade das mais diversas enzimas [3,4]. Os métodos classicamente empregados para a extração e purificação de *rafts* utilizam detergentes não iônicos (Triton X-100), que a baixas temperaturas solubilizam seletivamente os domínios não-*rafts* das membranas, permitindo o posterior isolamento dos microdomínios *rafts* por meio de gradiente de densidade [5,6].

A crítica feita a esta metodologia é a possibilidade de que proteínas originalmente não associadas aos *rafts* poderiam ser recuperadas nestes microdomínios, como efeito artefato da utilização do detergente, gerando, assim, falsas interpretações. Por este motivo, faz-se necessário o estudo comparativo entre técnicas que utilizem ou não detergentes, a fim de determinar o melhor método para extração e purificação dos *rafts* e avaliar a distribuição de proteínas de interesse nos microdomínios de membrana.

OBJETIVOS

- 1) Padronizar e comparar duas técnicas de extração e purificação de *rafts* (com e sem o uso de detergente);
- 2) Avaliar a distribuição das proteínas APP e BACE1 nos diferentes microdomínios.

METODOLOGIA



RESULTADOS

Gradiente de sacarose

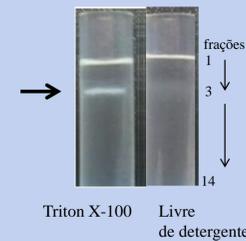


Figura 2. Gradientes de sacarose dos extratos obtidos com ou sem o emprego de detergente Triton X-100. A seta aponta nuvem opaca entre as fases 5% e 35% de sacarose, que indicaria localização da fração *raft*, e que foi obtida apenas no método com emprego de detergente.

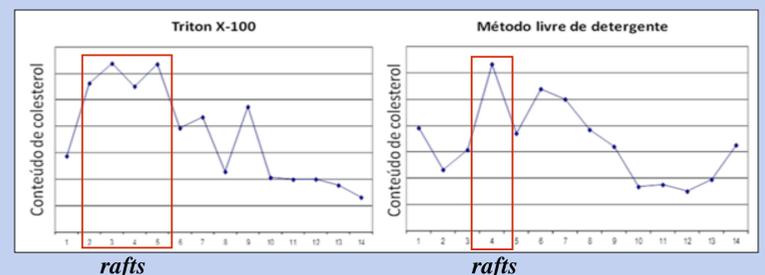


Figura 3. Dosagem de colesterol das 14 diferentes frações dos extratos obtidos com ou sem o emprego de detergente. O método com detergente forneceu melhor resultado quanto a distribuição de colesterol nas diferentes frações, observando-se facilmente uma maior concentração de colesterol nas primeiras frações do gradiente.



Figura 4. Dot blot de GM1 para as 14 frações a partir dos extratos com Triton X-100 (superior) ou sem detergente (inferior). Os resultados para as duas técnicas foram semelhantes quanto a este parâmetro.

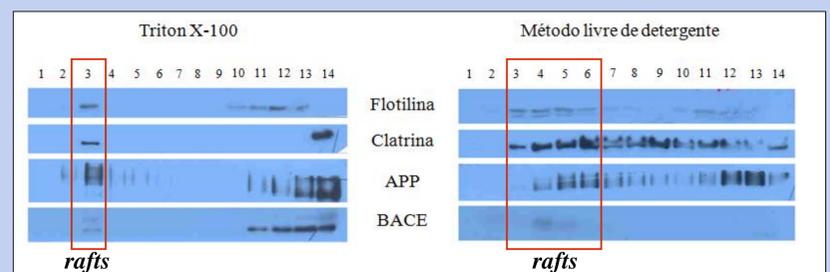


Figura 5. Western-blot das diferentes frações obtidas pelos métodos com Triton X-100 e livre de detergente, respectivamente. A técnica com emprego de detergente permitiu uma melhor purificação dos *rafts*, como pode ser observado pela maior concentração da proteína flotilina (marcadora de domínio *raft*) nas primeiras frações do gradiente; e uma maior concentração de clatrina, proteína majoritariamente presente no domínio não-*raft*, nas últimas frações do gradiente. Ambas as técnicas permitiram a observação de uma fração de APP e de BACE1 nas frações correspondentes aos *rafts*.

CONCLUSÕES

• A técnica com emprego de detergente resultou em melhor extração e purificação dos microdomínios *rafts* (fração 3), uma vez que permitiu o isolamento de frações mais enriquecidas em colesterol, com concentração de GM1 e com melhor distribuição das proteínas marcadoras de domínio *raft* (flotilina) e de domínio não-*raft* (clatrina);

• Ambos os processos extrativos permitiram identificar uma parcela das proteínas amiloidogênicas APP e BACE1 nas frações correspondentes aos microdomínios *rafts* de membrana, indicando que estas localizações não são artefatos do uso de Triton X-100;

• A metodologia, aqui padronizada, representa uma importante ferramenta para a identificação de drogas capazes de modular a distribuição das proteínas amiloidogênicas nos *rafts* lipídicos, e, desta forma, afetar cascata amilóide e possivelmente a progressão da doença de Alzheimer [9].

REFERÊNCIAS

1. Checler, F. *Pharmacol. Rev.* 54, 469-525, 2002.
2. Zinser, Suh, Y., E.G; Hartmann, T. and Grimm, M.O.W. *Biochim. Biophys. Acta* 1768:1991- 2001, 2007.
3. Brown, D.A.; London, E. *J. Biol. Chem.* 275:17221-17224, 2000.
4. Simons, K.; Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572,1997.
5. MacDonald, J.L.; Pike, L.J. *J. Lipid Res.* 46:1061-1067, 2005.
6. Persaud,-Sawin, D.A.; Lightcap, S.; Harry, G.J. *J. Lipid Res.*50:759-767, 2008
7. Zhou, M.; Diwu, Z.; Panchuck-Voloshina, N.; Haugland, R.P. *Anal. Biochem.*253:162-168, 1997. kit Amplex Cholesterol Assay
8. Radeva G., Perabo J., Sharom F.J. *FEBS J.* 272: 4924-4937, 2005.
9. Yanagisawa, K. *Biochim. Biophys. Acta* 1768:1943-1951, 2007.

AGRADECIMENTOS

CNPq, FAPERGS.