



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

JOÃO VITOR PEREIRA DE GODOY

A INFLUÊNCIA DO Ca^{2+} NA CONFORMAÇÃO ESTRUTURAL
DA α -SINUCLEÍNA E EM SUA INTERAÇÃO COM A RAB8A
GTPase ANALISADA POR ESTUDOS BIOFÍSICOS E
CELULARES

CAMPINAS

2021

JOÃO VITOR PEREIRA DE GODOY

**A INFLUÊNCIA DO Ca^{2+} NA CONFORMAÇÃO
ESTRUTURAL DA α -SINUCLEÍNA E EM SUA INTERAÇÃO
COM A RAB8A GTPase ANALISADA POR ESTUDOS
BIOFÍSICOS E CELULARES**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do Título de
Mestre em BIOLOGIA CELULAR E
ESTRUTURAL, na Área de BIOLOGIA
CELULAR*

Orientador: MATHEUS DE CASTRO FONSECA

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA [TESE / DISSERTAÇÃO]
DEFENDIDA [PELO ALUNO / PELA ALUNA]
[NOME DO(A) ALUNO(A)] E ORIENTADA [PELO /
PELA] [NOME DO(A) ORIENTADOR(A)].

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

G548i Godoy, João Vitor Pereira de, 1997-
A influência do Ca^{2+} na conformação estrutural da α -sinucleína e em sua interação com a Rab8a GTPase analisada por estudos biofísicos e celulares / João Vitor Pereira de Godoy. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Matheus de Castro Fonseca.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Alfa-sinucleína. 2. Proteínas rab8 de ligação ao GTP. 3. Doença de Parkinson. 4. Cálcio. I. Fonseca, Matheus de Castro. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The influence of Ca^{2+} on the structural conformation of α -synuclein and its interaction with Rab8a GTPase analyzed by biophysical and cellular studies

Palavras-chave em Inglês:

Alpha-synuclein

Ras-related protein rab-8a

Parkinson disease

Calcium

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Matheus de Castro Fonseca [Orientador]

Daniel Maragno Trindade

Leticia Maria Zanphorlin Murakami

Data da defesa: 06-12-2021

Programa de Pós Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-7808-2611>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6712362460686652>

Campinas, 06 de dezembro de 2021

COMISSÃO EXAMINADORA

Drº Matheus de Castro Fonseca

Drº Daniel Maragno Trindade

Drª Leticia Maria Zanphorlin Murakami

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa (inserir o nome do programa de pós) da Unidade (inserir o nome da faculdade/instituto).

Dedico esta dissertação a minha família,

Andréa, Eliseu e Felipe

AGRADECIMENTOS

Caros leitores desse presente trabalho, peço licença a todos para deixar registradas minhas sinceras palavras de agradecimento a todas as pessoas que estiveram ao meu lado, antes e durante, esses dois anos de trabalho e estudos para a realização desse mestrado. Inicialmente, agradecer a **Deus** e **Nossa Senhora** que sempre estiveram em minhas orações e pensamentos me ajudando a enfrentar momentos difíceis e de dúvida durante todo o caminho. A minha mãe **Andréa**, a mulher mais forte e sensacional que já conheci e o grande amor da minha vida, que sempre me apoiou em minhas decisões e me deu todo o suporte para que conseguisse realizar meus objetivos. Ao meu pai **Eliseu** (*in memoriam*), que sempre esteve em meus pensamentos e sei que está me olhando, protegendo e me dando forças para continuar. Ao meu irmão **Felipe**, grande parceiro e amigo e de um coração imenso disposto a ajudar todos a sua volta. Ao meu tio **Juninho**, o cara que se tornou minha figura paterna de referência e a pessoa mais divertida e alto astral que já tive contato. Aos meus avós **Nelson** e **Malvina**, minhas tias **Heloisa**, **Raquel** e **Beatriz**, meu tio **Juracir**, meus primos **Heloá**, **Gustavo**, **Julia**, **Vinicius** e **Allan** e aos pequenos **Arthur**, **Helena** e **Heitor**, minha família, que a todo momento esteve comigo nos momentos de alegria e tristeza e contribuíram para a pessoa que sou hoje. Aos meus amigos lemnenses **Gisele**, **Fernando**, **Ciro** e **Fer**, pessoas que participaram de alguns dos momentos mais divertidos que já vivi e me proporcionaram experiências memoráveis, sempre dando aquele ombro amigo quando necessário.

Passemos agora a minha família construída em Campinas. Primeiramente ao meu orientador **Matheus**, meu sincero obrigado pelo convite para a realização desse trabalho, um profissional de excelência, dedicado e que tem o mundo para conquistar a partir de agora, um excelente chefe com quem aprendi muito e claro um grande amigo para a vida, sempre disposto a tomar aquelas cervejas e/ou alguns gins. Espero um dia conquistar um pedacinho de todos os seus feitos ainda tão jovem. Em seguida, mas nem um pouco menos importante, a minha coorientadora **Celisa**, a primeira pessoa a confiar em minha formação e me dar uma oportunidade como estagiário, algo que sempre serei grato. Ensinou-me grande parte do que sei hoje como profissional e várias lições para levar para a vida, uma profissional e pessoa que admiro demais. Aos meus irmãos e parceiros de grupo **Beatriz**, **Dionísio**, **Katiane** e **Paula**, as pessoas que estavam o tempo todo deixando o ambiente leve, dando apoio um ao outro, conselhos, até mesmo broncas quando necessário, e claro, grandes guerreiros que me suportavam nos meus momentos de estresse e cara fechada. Só posso deixar a vocês registrado

que o “mestre cabrito gafanhoto” ama todo vocês. Ao **Válber, Givanil e Aninha**, pessoas que tenho muito carinho e que se tornaram pessoas especiais para mim, sempre dispostos a me ajudar e a jogar conversa fora quando necessário, espero levá-los para vida também. Aos meus colegas do LNBio, **Camilla, Paula, Luiza, Daniel, Karina, Yuri, Jack, Bianca, Romênia, Fernanda, Wanderley, Adriana e Renata** e talvez outros que peço desculpas por não ter lembrado seus nomes nesse momento, meu muito obrigado pelas conversas esclarecedoras para realização dos meus experimentos e por me dar suporte para que fosse possível realizar esse trabalho.

Por fim, minha gratidão ao **LNBio**, especialmente ao diretor **Kleber** que deu aval para que eu pudesse realizar meu mestrado. Ao **LEC, LPP e ROBOLAB**, por todo suporte técnico. Ao **CNPEM**, de modo geral, pela excelente instituição de pesquisa que se não existisse nada disso seria possível. As agências de fomento **FAPESP, CNPq e CAPES** por financiarem o projeto. À **UNICAMP**, por oferecer o Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, que infelizmente não pude frequentar e aproveitar como queria por conta da pandemia que passamos. E a todos os **membros da banca de defesa**, por aceitarem o convite, pelas correções e apreciação do trabalho realizado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (**CAPES**) – Código de Financiamento 001

A todos os citados, **muito obrigado!**

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum atualmente, atingindo cerca de 10 milhões de pessoas no mundo. Compromete o sistema nervoso central de forma crônica e progressiva, causando danos e morte dos neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo, especificamente da substância negra, acarretando diminuição de dopamina no organismo. O indivíduo portador dessa deficiência apresenta como principais sintomas a lentidão motora, rigidez nas articulações, desequilíbrio e tremores involuntários durante repouso. A principal hipótese para a morte dos neurônios é a presença de agregados proteicos denominados Corpos de Lewy (LB's) compostos principalmente pela α -sinucleína (α -sin). Essa proteína está intimamente relacionada com mecanismos de transporte de vesícula nas células e se concentra principalmente nos terminais pré-sinápticos dos neurônios, uma região submetida a altos níveis e flutuações de cálcio (Ca^{2+}). Além disso, proteínas da família Rab GTPases (Rab's) tem relação íntima com a α -sin, com destaque para a Rab8a. Estudos recentes demonstram que a desregulação da homeostase de Ca^{2+} em neurônios está intimamente relacionada com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a DP, mas os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não foram elucidados. Neste trabalho, descrevemos que a perda da homeostase de Ca^{2+} em células neuronais SH-SY5Y promove a agregação da α -sin e faz com que a sua interação com a Rab8a seja intensificada. Além disso, estudos biofísicos *in vitro* utilizando a α -sin recombinante mostraram alterações estruturais da proteína de maneira dependente de sua concentração no meio, mas independente de sua interação com diferentes concentrações de Ca^{2+} . Experimentos com a Rab8a recombinante *in vitro*, indicam que a interação entre α -sin e Rab8a ocorre em condições basais e é intensificada na presença de Ca^{2+} , processo análogo ao observado no interior das células. Assim, os dados obtidos mostram relação direta do aumento de Ca^{2+} e o mau funcionamento de ambas as proteínas, indicando ser um dos possíveis mecanismos responsáveis para o desenvolvimento de DP.

Palavras-chaves: α -sinucleína, Rab8a, Doença de Parkinson, cálcio.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease today, affecting about 10 million people worldwide. It affects the central nervous system in a chronic and progressive way, causing damage and death to the dopaminergic neurons of the midbrain, specifically the substantia nigra, leading to a huge decrease in dopamine in the body. The individual with this deficiency presents as main symptoms motor slowness, joint stiffness, unbalance, and involuntary tremors during rest. The main hypothesis for the death of neurons is the presence of protein aggregates called Lewy bodies (LB's), mainly composed of α -synuclein (α -sin). This protein is closely related to vesicle transport mechanisms in cells and is mainly concentrated in the presynaptic terminals of neurons, a region subjected to high levels and fluctuations of calcium (Ca^{2+}). Moreover, the Rab GTPases proteins family (Rab's) are closely related to α -sin, especially Rab8a. Recent studies show that the dysregulation of Ca^{2+} homeostasis in neurons is closely related to the development of neurodegenerative diseases such as PD, but the mechanisms involved in this process have not yet been elucidated. In this work, we describe that disruption of Ca^{2+} homeostasis in SH-SY5Y neuronal cells promotes aggregation of α -sin and causes its interaction with Rab8a to be intensified. Furthermore, in vitro biophysical studies using recombinant α -sin showed structural changes of the protein in a manner dependent on its concentration in the medium but independent of its interaction with different Ca^{2+} concentrations. Experiments with recombinant Rab8a in vitro indicate that the interaction between α -sin and Rab8a occurs under basal conditions and is intensified in the presence of Ca^{2+} , a process analogous to that observed inside the cells. Thus, the data obtained show a direct relationship between increased Ca^{2+} and the malfunction of both proteins, and this is one of the possible mechanisms responsible for the development of PD.

Keywords: α -synuclein, Rab8a, Parkinson's Disease, calcium.

LISTA DE ABREVIACES

1,8-ANS	<i>1-Anilino-naphthalene-8-Sulfonic Acid</i>
6-OHDA	6-hidrxido dopamina
CD	<i>Circular Dichroism</i> (Dicroísmo Circular)
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (DNA Complementar)
CG	Complexo de Golgi
<i>DJI</i>	Gene da proteína DJ-1
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> (Espalhamento Dinmico de Luz)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (cido Desoxirribonucleico)
dNTP	Desoxirribonucleotdeos Tri-fosfatados
DP	Doença de Parkinson
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Soro Fetal Bovino)
GAP's	<i>GTPase Activating Proteins</i>
GDI's	<i>GDP Dissociation Inhibitor</i>
GDP	Difosfato de Guanosina
GEF's	<i>Guanine Nucleotide Exchange Factors</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GTP	Trifosfato de Guanosina
HEPES	cido N-(2-Hidroxietil) Piperazina-N'-2-Etanossulfnico
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
LB	Luria Bertani/Lysogeny Broth
LB's	Corpos de Lewy
<i>LRRK2</i>	Gene da Quinase 2 Rica em Leucina
MAPT	<i>Microtubule Associated Protein Tau</i> (Gene da proteína associada  microtúbulos tau)
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
OMS	Organizao Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (Tampão Fosfato-Salino)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFA	Paraformaldeido
pH	Potencial Hidrogeniônico

<i>PINK1</i>	Gene da proteína quinase 1 induzida por PTEN
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i>
PS	Penicilina e Estreptomicina
<i>RAB8A</i>	Gene da proteína Rab8a
RE	Reticulo Endoplasmático
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécies Reativas de Oxigênio)
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SEC-MALS	<i>Size-Exclusion Chromatography coupled to Multi-angle light scattering</i> (Cromatografia de Exclusão Molecular acoplada a Espalhamento Multiangular de Luz)
SN	Sistema Nervoso
SNARE	<i>Soluble NSF Attachment Receptor</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
<i>SNCA</i>	Gene da proteína α -sin
TBST	Solução Salina Tamponada Com Tris E Polissorbato 20.
UV	Ultravioleta
VC	Volume de coluna
WB	<i>Western Blotting</i>
WT	Selvagem (<i>Wild type</i>)
α -sin	α -sinucleína
β -sin	β -sinucleína
γ -sin	γ -sinucleína

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Papel da α -sin no transporte de dopamina	17
Figura 2. Possíveis vias celulares e moleculares causadoras da morte neuronal dopaminérgica na Doença de Parkinson	19
Figura 3. Alinhamento das sequências primárias das sinucleínas humanas	20
Figura 4. Características funcionais da α -sinucleína	22
Figura 5. Mecanismos de agregação da α -sinucleína	23
Figura 6. O ciclo das Rab GTPases	26
Figura 7. Localização subcelular e função das Rab's	27
Figura 8. Clonagem pEGFP-N2-SNCA e pCDNA5-mCherry-RAB8A	42
Figura 9. Clonagem pET21b-SNCA e pET-28a-TEV-Rab8a	44
Figura 10. Células SH-SY5Y sofrem despolarização por estímulo de KCl promovendo aumento dos níveis de Ca^{2+} citosólico e agregação da α -sin	47
Figura 11. Purificação da α -sin recombinante	49
Figura 12. Análises biofísicas da α -sin <i>in vitro</i> indicam mudança de estrutura secundária dependente de concentração, mas sem alteração de seu estado oligomérico	52
Figura 13. Análises biofísicas da α -sin <i>in vitro</i> na presença de Ca^{2+} indicam que o íon não influencia na estrutura secundária e estado oligomérico da proteína	55
Figura 14. Análises biofísicas da α -sin <i>in vitro</i> em condições de temperatura semelhantes a fisiológica indicam mudança de estrutura secundária dependente de concentração, mas sem alteração de seu estado oligomérico na presença ou ausência de Ca^{2+}	57
Figura 15. Altas concentrações de α -sin <i>in vitro</i> levam à exposição de superfícies hidrofóbicas	58
Figura 16. O aumento dos níveis de Ca^{2+} em células SH-SY5Y leva a agregação da α -sin e promove sua co-localização com a Rab8a	61
Figura 17. Purificação da Rab8a recombinante	63

Figura 18. α -sin e Rab8a interagem em condições basais e na presença de Ca^{2+} enquanto a presença de GDP impede esse mecanismo66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes <i>SNCA</i> e <i>RAB8A</i>	33
Tabela 2. Vetores e enzimas de restrição utilizados	34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. A doença de Parkinson	17
1.2. A α -sinucleína	21
1.3. Rab8a.....	26
2. OBJETIVOS	31
2.1. Geral	31
2.2. Específicos	31
3. METODOLOGIA	32
3.1. Cultura celular	32
3.2. Monitoramento da Sinalização intracelular de cálcio	32
3.3. Transfecção transiente.....	32
3.4. Indução de agregados de α -sinucleína e Rab8a.....	32
3.5. Microscopia confocal	33
3.6. Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas.....	33
3.7. Clonagens	33
3.7.1. Amplificação dos genes SNCA e RAB8A	33
3.7.2. Reações de clivagem	34
3.7.3. Reações de ligação.....	35
3.7.4. Transformação em <i>E. coli</i> por choque térmico.....	35
3.7.5. Confirmação dos clones por PCR de colônia	35
3.7.6. Sequenciamento dos clones	36
3.8. Indução da expressão da Hs α -sinucleína e Hs Rab8a	36
3.9. Purificação.....	37
3.9.1. α -sin	37
3.9.2. Rab8a	38
3.10. Caracterização biofísica da α -sin	38
3.10.1. Dicroísmo Circular (CD).....	38

3.10.2.	Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	39
3.10.3.	Cromatografia de Exclusão Molecular com Espalhamento Multiangular de Luz (SEC-MALS)	39
3.10.4.	Ensaio de 1,8-ANS	40
3.11.	Ensaio de interação α -sin e Rab8a	40
3.11.1.	<i>Pull-down</i>	40
3.11.2.	<i>Western blotting</i>	41
3.12.	Análise estatística.....	41
4.	RESULTADOS.....	42
4.1.	Clonagens	42
4.1.1.	Clonagem da α -sin e Rab8a para ensaios <i>in situ</i> em células SH-SY5Y	42
4.1.2.	Clonagem da α -sin e Rab8a para expressão em sistema procarioto	43
4.2.	O Ca^{2+} promove a agregação α -sinucléina em células SH-SY5Y	45
4.3.	A α -sin <i>in vitro</i> possui alteração da sua estrutura secundária de maneira concentração-dependente, mas independente do Ca^{2+}	49
4.4.	O Ca^{2+} promove a co-localização da α -sin e Rab8a em células SH-SY5Y	60
4.5.	A presença de Ca^{2+} proporciona maior interação entre α -sin e Rab8a <i>in vitro</i>	63
5.	DISCUSSÃO.....	68
6.	CONCLUSÃO	72
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
8.	ATIVIDADES ACADÊMICAS	80
8.1.	Artigos publicados.....	80
8.2.	Artigos submetidos para publicação	80
8.3.	Participação em eventos.....	79
8.4.	Resumos publicados em anais de congresso.....	79
9.	ANEXOS	82

1. INTRODUÇÃO

1.1. A doença de Parkinson

Descrita pela primeira vez em 1817 no trabalho “*An essay of the Shaking Palsy*”, por James Parkinson, a Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum atualmente, atingindo cerca de 10 milhões de pessoas no mundo segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (JOST; REICHMANN, 2017; TYSNES; STORSTEIN, 2017). No Brasil, o número exato de portadores não é conhecido ao certo, mas um estudo realizado em Minas Gerais apontou que ~3% da população da região com idade superior a 60 anos possuía o diagnóstico clínico para a doença (BARBOSA et al., 2006). Ao extrapolar esse número para todo o Brasil, estima-se que há cerca de 600 mil parkinsonianos no país. Esse número tende a aumentar, já que a expectativa de vida da população em 2030 deve ser de aproximadamente 78,6 anos e em 2060 de 81,2 anos, levando a um aumento da parcela de idosos na população. O aumento da expectativa de vida é acompanhado pelo aumento do risco de desenvolvimento da DP, trazendo impacto ao setor econômico devido ao maior gasto do sistema de saúde público e privado com tratamento sintomatológico da doença (DORSEY et al., 2007). Vale ressaltar, que na grande maioria das estatísticas encontradas, a faixa etária estudada está entre 50-80 anos, intervalo esse em que é comum o diagnóstico, porém acaba por desconsiderar os casos precoces. Outro fator epidemiológico identificado através desses números é que o acometimento da doença tende a ser duas vezes mais comum em homens do que em mulheres (BALDERESCHI et al., 2000; BENBA; ABDELILAH; HAMMOUCH, 2016).

A DP atinge o sistema nervoso central (SNC) de forma crônica e progressiva, causando danos e morte dos neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo, especificamente da substância negra, o que reduz drasticamente a síntese e liberação de dopamina no organismo, neurotransmissor responsável por modular a realização dos movimentos voluntários do corpo (BENNETT et al., 2005). Os baixos níveis de dopamina levam, portanto, a sintomas motores e não-motores, como lentidão motora, rigidez nas articulações, desequilíbrio e tremores involuntários durante repouso, alterações intestinais, do sono e diminuição do olfato (PERFEITO; REGO, 2012).

Na grande maioria dos casos de DP, a morte neuronal ocorre devido à presença de agregados proteicos em seu citoplasma, denominados de Corpos de Lewy (LB's), compostos principalmente pelo acúmulo aberrante da proteína α -sinucleína (α -sin).

A α -sin é uma proteína pequena (~14kDa) encontrada majoritariamente nos terminais pré-sinápticos de neurônios onde tem participação sugerida no ciclo de vesículas sinápticas, incluindo as vesículas que transportam a dopamina (Figura 1) (SPILLANTINI et al., 1997). Apesar de inúmeros trabalhos na literatura acerca desta proteína, sua função exata na fisiologia celular ainda não é completamente elucidada. Além disso, os iniciadores e os mecanismos moleculares/celulares que levam a proteína a se agregar estão longe de ser esclarecidos por completo.

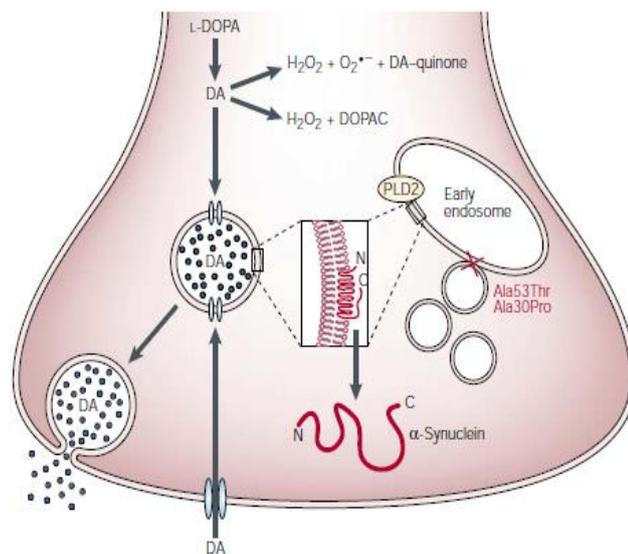


Figura 1. Papel da α -sin no transporte de dopamina. A dopamina é sintetizada no citoplasma dos neurônios dopaminérgicos a partir de seu precursor L-DOPA. Rapidamente, o neurotransmissor recém-formado necessita ser estocado em vesículas, uma vez que a dopamina livre no citoplasma é prontamente oxidada, formando espécies reativas de oxigênio prejudiciais à célula. Para a formação dessas vesículas, o α -sin passa a se associar a fosfolípidios de membrana de forma a conseguir armazenar, de forma estável, a dopamina, até que seja necessária sua liberação. Algumas mutações como A53T e A30P (ressaltadas na figura) na sequência primária da α -sin não permitem que essas vesículas sejam formadas de forma efetiva. (Fonte: Adaptado de (LOTHARIUS; BRUNDIN, 2002)).

Classicamente, e de acordo com sua etiologia, a DP pode ser classificada em Parkinson genético ou familiar, responsável por cerca de 10% dos casos, ou Parkinson esporádico/idiopático, ou seja, sem causa conhecida, responsável por cerca de 90% dos casos totais (BRAAK et al., 2003). Dentre as formas familiares da DP, é descrito que a superexpressão ou mutações presentes nos genes *PINK1*, *DJ1*, *LRRK2*, *SNCA* entre outros são responsáveis

pelo aparecimento da desordem. Tais mutações levam a modificações nos aspectos estruturais e/ou funcionais das proteínas traduzidas em cada um dos casos, interferindo assim, em vias celulares chave, o que levaria a morte neuronal dopaminérgica e desencadeamento da DP (Figura 2) (FARRER, 2006).

Com relação aos casos esporádicos de DP, já se sabe que o ambiente em que o indivíduo está inserido muitas vezes pode ocasionar o desenvolvimento da doença, como por exemplo, trabalhadores rurais que estejam frequentemente expostos a agrotóxicos contendo princípios ativos como a rotenona, o paraquat e o maneb estão propensos a desenvolver da DP (FEI; ETHELL, 2008; JAVITCH et al., 1985; SHIMIZU et al., 2001; ZHANG et al., 2003). Dentre os compostos químicos causadores da DP não-familiar, também encontramos o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), um dos metabólitos presentes na heroína, e a 6-hidróxido dopamina (6-OHDA), uma molécula análoga a dopamina que possui a capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio responsáveis pela morte neuronal (CHIBA; TREVOR; CASTAGNOLI, 1985; DARDEN, 2007; JAVOY et al., 1976). É importante ressaltar que alguns casos esporádicos de DP podem ser decorrentes de outras mutações genéticas, mas por ainda não terem sido identificadas, são tratadas como formas idiopáticas da doença (MODI et al., 2016). Além disso, casos relacionados com o aumento de metais no ambiente intracelular, como ferro, cálcio (Ca^{2+}), manganês e outros íons metálicos já foram apontados como causadores da DP (GORELL et al., 1997; MERGLER; BALDWIN, 1997). De forma intrigante, grande parte dos casos esporádicos ou familiares da DP apresentam como característica principal a deposição de agregados de α -sin nos neurônios remanescentes. No entanto, a extensão precisa do número de casos em que a α -sin está envolvida ainda não é clara. Desta maneira, compreender e redirecionar as funções tóxicas conferidas por esta proteína quando desregulada pode levar a novas estratégias terapêuticas nos casos de DP cuja agregação da α -sin é um elemento presente. A partir disso, é necessário entender, de fato, qual o comportamento biofísico dessa proteína em condições normais e quando submetidas a alguma situação de estresse e/ou anormalidade que poderia levar a alterações em sua estruturação secundária e/ou modificar seus parceiros de interação intracelular.

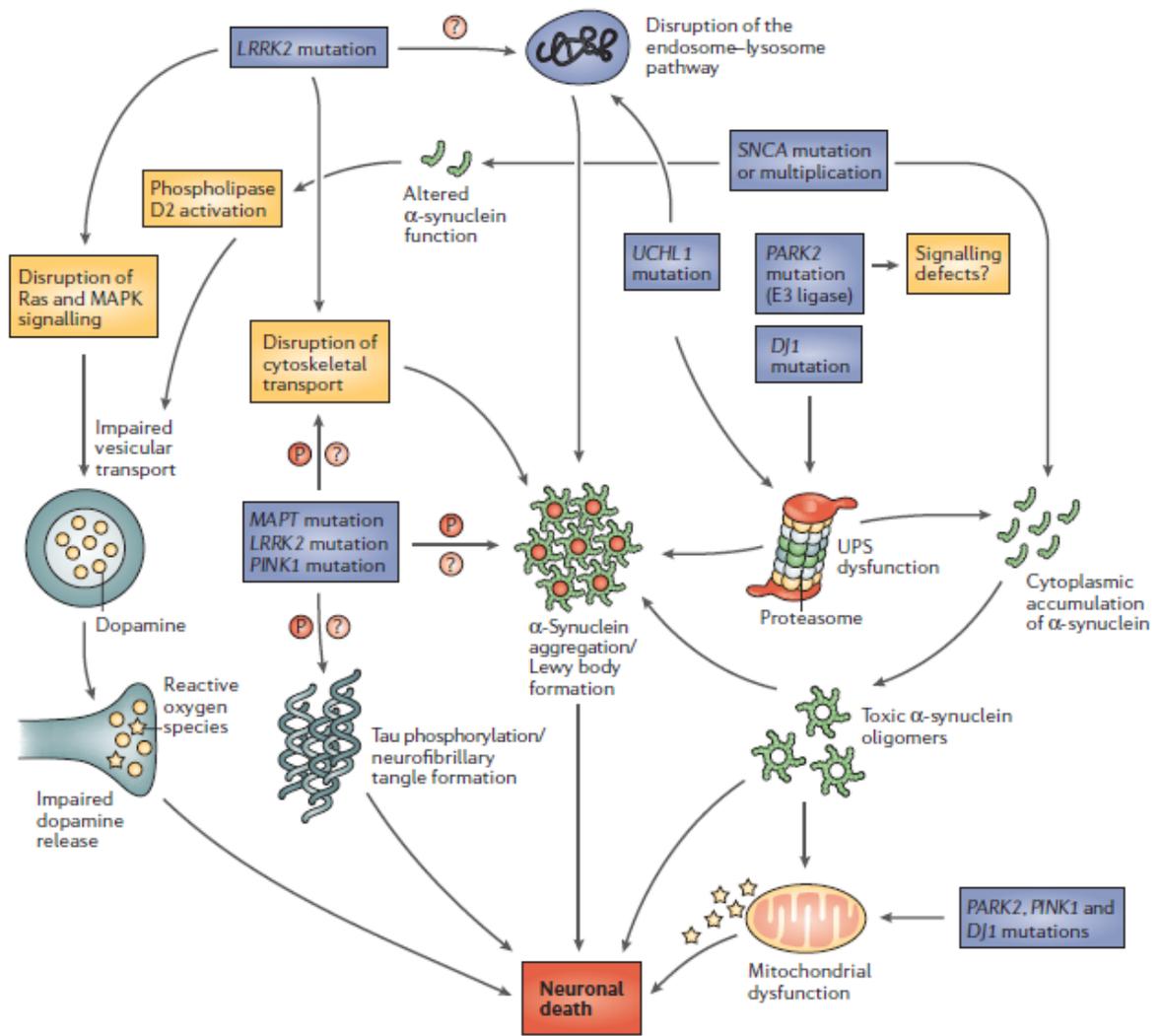


Figura 2. Possíveis vias celulares e moleculares causadoras da morte neuronal dopaminérgica na Doença de Parkinson. A superexpressão e mutações no gene *SNCA* desencadeiam o aumento e acúmulo da proteína α -sin monomérica no citoplasma das células neuronais, promovendo sua oligomerização. Tal evento é responsável pela geração de toxicidade celular via prejuízo de transporte celular e bloqueio da enzima tirosina hidroxilase (TH), por exemplo, afetando assim a síntese, armazenamento e liberação de dopamina. Além disso, agregados de α -sin são responsáveis pelo aumento na biossíntese de espécies reativas de oxigênio que levam a morte neuronal. Como mecanismo neuroprotetor, o neurônio afetado pode encaminhar o excesso de α -sin para degradação via proteassomos e/ou via sistema endossômico/lisossômico. Essas vias de degradação podem ainda ser afetadas e inibidas por mutações nos genes *UHCL1* e *DJ1*, levando, também, ao acúmulo de α -sin no citoplasma. Além disso, mutações que afetam a fisiologia mitocondrial, como em casos de mutantes de *PINK1*, também afetam o funcionamento correto do sistema de degradação de proteínas mal-enoveladas dentro do neurônio. Outro fator que pode levar a DP é a má formação do citoesqueleto neuronal, característica, por exemplo, de mutações no gene *MAPT*, que levam a modificações na proteína tau associada a microtúbulos prejudicando a estrutura dos microtúbulos e consequentemente alterando as vias de transportes de vesículas e sinalização celular. (Fonte: Adaptado de (FARRER, 2006)).

1.2. A α -sinucleína

Em 1988, um estudo publicado com o objetivo de desvendar os mecanismos moleculares envolvidos na comunicação neuronal, com foco nas sinapses químicas do sistema nervoso, trouxe a identificação de uma nova família de proteínas que tinham funções determinantes nesse evento, sendo denominadas de sinucleínas (MAROTEAUX; CAMPANELLI; SCHELLER, 1988). Essa família de proteínas é composta por três macromoléculas: α -, β - e γ -sinucleína. Essas proteínas são encontradas majoritariamente no tecido neuronal e correspondem a cerca de 0,1 % do conteúdo de proteínas total presente no cérebro (VARGAS; CHANDRA, 2014). Ao nível celular, todas elas se concentram principalmente em regiões pré-sinápticas dos neurônios, com papel sugerido na formação das vesículas sinápticas responsáveis pelo transporte dos neurotransmissores (TOTTERDELL; HANGER; MEREDITH, 2004) (Figura 1). Quanto a estrutura, as sinucleínas não possuem organização secundária ou terciária, ou seja, são naturalmente desestruturadas de forma que a função que desempenham na célula está relacionada apenas com a sequência primária de aminoácidos que as compõem. Essa ausência de estrutura é sugerida como responsável por deixá-las aptas a se ligarem com maior facilidade aos lipídios de membrana que formam as vesículas sinápticas (VARGAS; CHANDRA, 2014). Outro ponto característico compartilhado pela α -, β - e γ -sinucleína é a presença de uma região N-terminal bastante conservada, enquanto a região C-terminal apresenta maiores modificações responsáveis pelas diferentes funções destas isoformas (Figura 3).

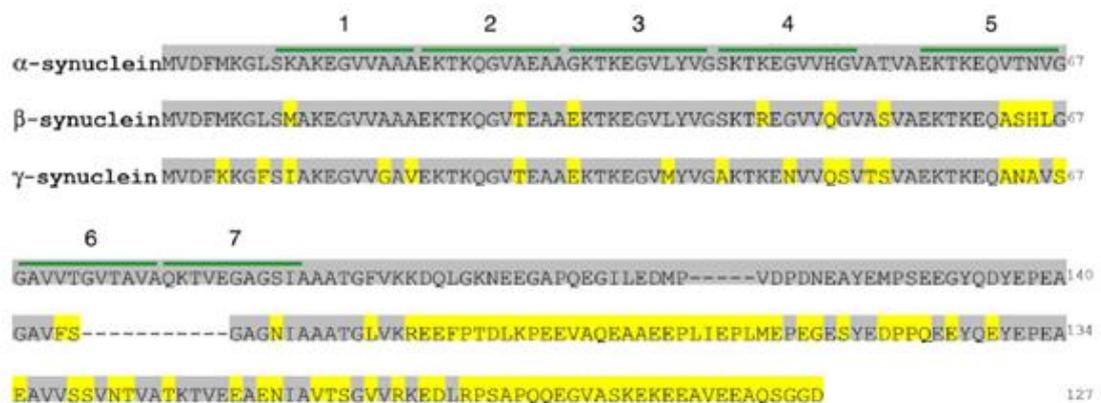


Figura 3. Alinhamento das sequências primárias das sinucleínas humanas. Todas as sinucleínas apresentam um tamanho muito próximo entre si, com a α -sin possuindo 140 aminoácidos, a β -sin 134 resíduos e a γ -sin 127. A região N-terminal é altamente conservada, sendo exemplificada pelos aminoácidos destacados em cinza e sete regiões com sequências praticamente idênticas entre si, destacadas pelas linhas verdes. (Fonte: Adaptado de (VARGAS; CHANDRA, 2014)).

No entanto, quando se trata de neurodegeneração, em especial a causada pela DP, apenas a α -sin foi identificada como peça-chave no desenvolvimento da patologia. Essa pequena proteína ácida de apenas 14,46 kDa, contendo 140 aminoácidos e altamente resistente a altas temperaturas, apresenta grande dinamicidade, sendo esta uma característica fundamental para desempenhar seu papel no processo de transporte vesicular (BENDOR; LOGAN; EDWARDS, 2013; BURRÉ et al., 2013; BUTLER; SAMBO; KHOSHBOUEI, 2017). No citoplasma, a α -sin se encontra totalmente desestruturada e, através da sua porção N-terminal, consegue interagir com os fosfolipídios de membrana, como por exemplo, aqueles que formam a vesícula a ser transportada. Uma vez interagindo com estes lipídios, a estrutura da proteína adquire a curvatura análoga à membrana e majoritariamente composta por α -hélices (BELLUCCI et al., 2016). Esta mudança conformacional permite que a região C-terminal livre interaja com as proteínas que formam o complexo SNARE (acrônimo de SNAP - *Soluble NSF Attachment Protein - Receptor*) (BURRÉ et al., 2010). Esse complexo é o responsável, junto com outra família de proteínas denominadas Rab's, por promover o endereçamento correto dessas organelas membranosas, além de auxiliar no processo de fusão das vesículas quando atingem seu destino (CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2013). Através dessas interações, a α -sin está presente em diversas etapas do complexo mecanismo de transporte vesicular, com papel sugerido no auxílio da captação dos neurotransmissores presente no citoplasma até a vesícula, no processo de exocitose das vesículas previamente formadas e no mecanismo de reciclagem ou degradação dos complexos SNARE após desempenharem seu papel na exocitose vesicular (Figura 4) (LASHUEL et al., 2013).

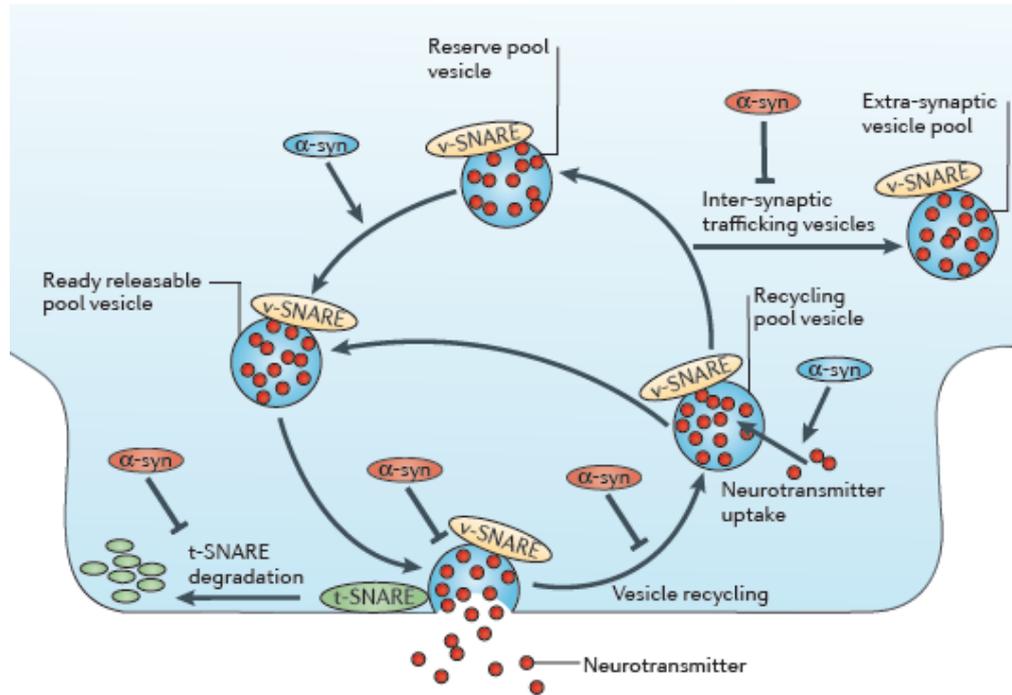


Figura 4. Características funcionais da α -sinucleína. Esquema representado um terminal pré-sináptico no qual a α -sin se encontra ativa em praticamente todos os eventos necessários para que ocorra a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica, desde a regulação do tráfego de vesícula por si só (α -sin; azul), como também sua interação direta com os complexos SNARE's (α -sin; vermelha) (Fonte: Adaptado de (LASHUEL et al., 2013)).

Ainda no que diz respeito à essa proteína, deve ser levado em consideração os aspectos relacionados à sua plasticidade, atributo que pode proporcionar um aspecto negativo e que pode se tornar patogênico para a célula. De maneira mais detalhada, a α -sin monomérica livre no citoplasma e desordenada, ou associada à membrana com conformação majoritária de α -hélice, pode sofrer modificações indesejadas devido a fatores externos ou mutações na sequência de aminoácidos de sua estrutura primária. Assim, as estruturas monoméricas que desempenham sua função corretamente começam a adquirir aspectos e estados oligoméricos aberrantes, originando estruturas tóxicas para a fisiologia celular. Exemplo disso é a capacidade desses monômeros livres no citoplasma formarem dímeros instáveis que rapidamente podem se tornar oligômeros desordenados. Além disso, a estrutura monomérica em α -hélice da α -sin pode iniciar um processo de conversão em uma espécie molecular rica em folhas- β que também pode se tornar parte desses oligômeros (Figura 5) (ELIEZER et al., 2001; LASHUEL et al., 2013; UVERSKY et al., 2002). Quando formados, esses oligômeros possuem a capacidade de se agregarem ainda mais entre si, desencadeando o processo de fibrilação da α -sin. Esse microambiente rico em pequenas fibras desloca o equilíbrio da célula, fazendo com que as

fibras do tipo β -amiloide comecem a surgir e, por sua vez, consigam captar diretamente estruturas monoméricas de α -sin e outras proteínas citoplasmáticas ali presentes, até a formação dos LB's maduros (LUK et al., 2009, 2012; NONAKA et al., 2010). Esses agregados tóxicos podem ser exocitados para o meio extracelular e serem endocitados pelas células adjacentes, sendo pontos de nucleação para novas fibras, desencadeando o processo de morte dos neurônios dopaminérgicos e ocasionando o desenvolvimento da DP (ABOUNIT et al., 2016). Em síntese, a α -sin mal enovelada inicia o *misfolding* (estruturação incorreta) da α -sin monomérica nativa. Isto faz com que a DP seja considerada uma doença priônica, ou seja, uma doença que resulta do enovelamento incorreto de uma proteína cerebral normal de superfície celular iniciado por uma proteína com estruturação incorreta (em referência a proteína “prion”). Assim a α -sin estruturalmente incorreta em uma dada célula poderia iniciar o processo de agregação de proteínas intracelulares e se espalhar para células vicinais. (ABOUNIT et al., 2016).

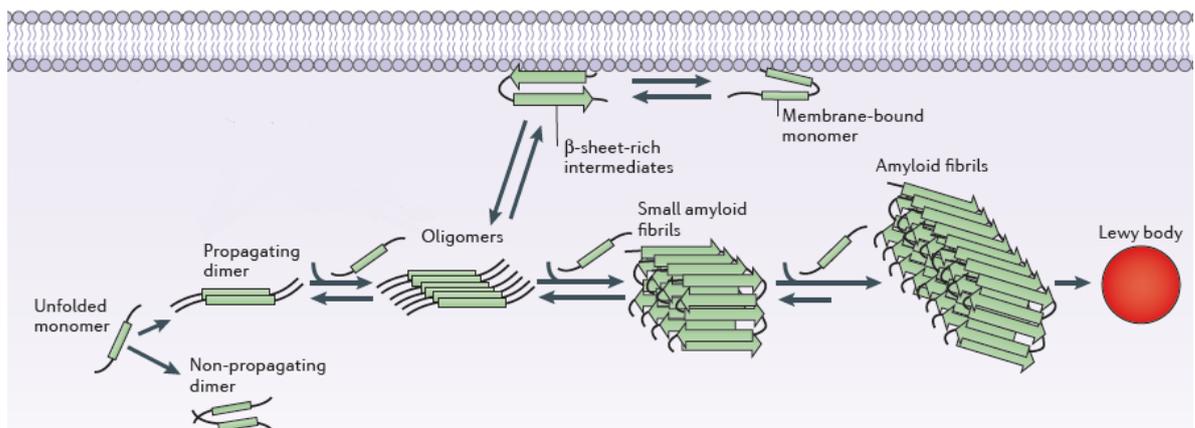


Figura 5. Mecanismos de agregação da α -sinucleína. A α -sinucleína pode passar por processos de agregação estando livre no citoplasma ou quando associada a membrana plasmática. O processo de oligomerização ocorre entre o equilíbrio dos monômeros da proteína e o processo de adição desses monômeros em pequenos agregados que servem como pontos de nucleação para a formação de fibras do tipo β -amiloide até a formação dos corpos de Lewy maduros. (Fonte: Adaptado de (LASHUEL et al., 2013)).

Dentro desse contexto de alteração de função e conformação da α -sin, um ponto chave recentemente investigado por Lautenschläger e colaboradores (2018), mostraram que a presença do íon Ca^{2+} teria influência sobre os mecanismos e funções que a α -sin desempenha durante o transporte vesicular (LAUTENSCHLÄGER et al., 2018). Tal observação se baseou no fato de que durante o processo de excitose de vesículas, o terminal pré-sináptico dos

neurônios permite um grande influxo de Ca^{2+} do meio extracelular para o seu citoplasma gerando um microambiente contendo grande concentração deste íon (LLINÁS; SUGIMORI; SILVER, 1992; R; NEUROGLIA; HARBOR, 2000). Além disso, a porção C-terminal da α -sin, negativamente carregada, tem interação direta com o cátion, sendo esse processo necessário para que essa região da proteína interaja com as vesículas pré-sinápticas e permita a realização da exocitose (LAUTENSCHLÄGER et al., 2018). Relatos observados por nosso grupo e de outros, também corroboram que a indução da agregação da proteína α -sin ocorre em casos em que a homeostase do Ca^{2+} é prejudicada (PEDRO AMORIM NETO et al., 2021; RCOM-H'CHEO-GAUTHIER; GOODWIN; POUNTNEY, 2014).

Essa interação entre α -sin e Ca^{2+} tem sido reportada desde a publicação do trabalho realizado por Nielsen e colaboradores (2001), onde foi observado o primeiro indício de que o íon possuía influência na oligomerização e função da α -sin (NIELSEN et al., 2001). Com o decorrer dos anos, esse fenômeno passou a ser descrito com maiores detalhes. Estudos que visavam manipular os canais de Ca^{2+} das células mostraram que o aumento da concentração do íon no ambiente intracelular fazia com que essas células apresentassem grânulos de α -sin em seu interior, enquanto que o uso de quelantes de Ca^{2+} , nessas condições de estresse, faziam com que esse efeito de agregação fosse mais brando ou até mesmo não ocorresse (CHAN et al., 2007; FOLLETT et al., 2013; RCOM-H'CHEO-GAUTHIER et al., 2016; SINGH et al., 2016). Alguns relatos ainda mostram que a própria α -sin, em determinadas condições, a partir da sua estrutura monomérica pode formar poros que se ligam a membrana e que também facilitam a entrada de Ca^{2+} para o interior da célula (MELACHROINOI et al., 2013; MIRONOV, 2015; POUNTNEY; VOELCKER; GAI, 2005).

Esse fenômeno de agregação por conta da quebra da homeostase de Ca^{2+} também foi relacionada com aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) no citoplasma, sendo esse fenômeno relacionado principalmente com as mitocôndrias. Essas organelas tendem a captar o excesso do metal presente no citoplasma. Caso essa captação ocorra em excesso, ocorre a produção de ROS mitocondrial, que quando difundido para o citosol, pode levar à agregação da α -sin (DALFÓ; FERRER, 2008; GOODWIN et al., 2013; LUTH et al., 2014; PEDRO AMORIM NETO et al., 2021). Já estudos de microscopia eletrônica e de força atômica com a α -sin recombinante *in vitro* mostram que presença de Ca^{2+} faz com que a proteína forme diferentes tipos de oligômeros com morfologias esférica, anelar e até mesmo a formação de fibrilas (LOWE et al., 2009; NATH et al., 2011). Porém, diferente dos estudos realizados em

células, ainda se sabe pouco sobre a influência do Ca^{2+} no enovelamento da α -sin *in vitro*, e quais mudanças estruturais levam a formação desses oligômeros.

Além da participação do Ca^{2+} , foi demonstrado em modelos celulares e animais de DP que a indução da agregação da α -sin mediante a superexpressão desta proteína foi capaz de gerar déficits no transporte vesicular do retículo endoplasmático (RE) para o complexo de Golgi (CG) (COOPER et al., 2006). Sabe-se que dentre a coleção de proteínas celulares, um grupo tem papel fundamental no transporte de vesículas entre estas organelas: as Rab GTPases. Além disso, foi demonstrado em específico que a Rab8a interage, com a região C-terminal da α -sin (YIN et al., 2014). Considerando que a região C-terminal da α -sin é também a responsável pela ligação ao Ca^{2+} , o papel deste íon na interação entre essas proteínas é algo que ainda necessita ser investigado.

1.3. Rab8a

Composta por mais de 60 macromoléculas em humanos, a família das proteínas Rab GTPases está presente em diversos tipos celulares e em interação com as membranas intracelulares constituintes das vesículas que transitam por todo citoplasma (PEREIRA-LEAL; SEABRA, 2001; ZERIAL; MCBRIDE, 2001). As Rab's são proteínas relativamente pequenas com cerca de 200 a 250 aminoácidos em suas sequências, e que possuem um sítio de ligação e hidrólise de trifosfato de guanina (GTP). Graças a isso, as Rab's se apresentam de duas formas majoritárias dentro da célula, sendo a primeira ativa quando ligada a GTP e a segunda inativa quando ligada a difosfato de guanina (GDP) (GABE LEE; MISHRA; LAMBRIGHT, 2009; GROSSHANS; ORTIZ; NOVICK, 2006). Essa diferença funcional está intimamente relacionada a mudança conformacional que a estrutura dessas proteínas sofre dependendo do nucleotídeo ligado, gerando domínios denominados de *Switch I* e *Switch II* (PFEFFER, 2005) (Figura 6).

Ambos os domínios possuem suas particularidades dentro de cada uma das mais de 60 Rab's existentes no organismo humano devido a sua sequência e/ou conformação que assumem quando ligadas ao GTP/GDP. Isso é um dos fatores determinantes para atribuir a função e localização subcelular específica de cada uma dessas proteínas. Além disso, existem proteínas auxiliares as Rab's, denominadas de efetoras de Rab's, que também contribuem para determinar em qual local cada uma dessas proteínas irá atuar. Dentro desse grupo de efetoras de Rab's, destacam-se as do tipo GAP's (*GTPase activating proteins*) com papel no processo

de hidrólise do GTP; as GEF's (*guanine nucleotide exchange factors*) que realizam a retirada do GDP e permitem que o GTP livre no citosol se ligue novamente as Rab's; e as GDI's (*GDP dissociation inhibitor*) que mantem o GDP ligado ao sítio ativo deixando a proteína em seu estado inativo quando necessário (Figura 6). É preciso ressaltar que ainda não se sabe exatamente todos os motivos que levam a compartimentalização de cada umas da Rab's em determinada região da célula, porém essa grande variedade estrutural dos domínios *Switch I* e *Switch II*, junto aos vários tipos de efetoras de Rab's, permitem que essa família de proteínas atue por todo o citoplasma (Figura 7).

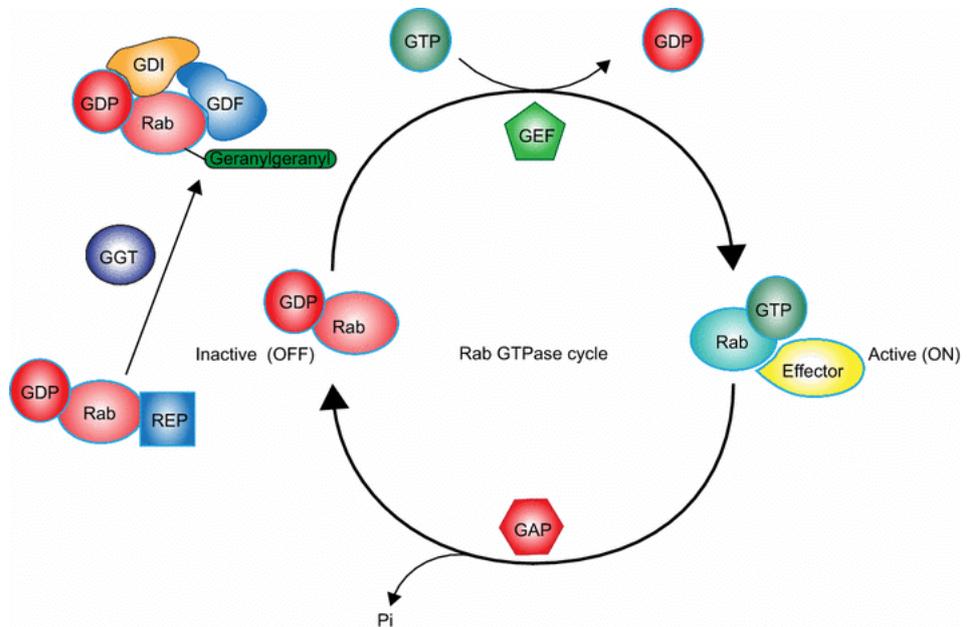


Figura 6. O ciclo das Rab GTPases. A conversão da forma inativa das Rab's ligada a GDP para seu estado ativo ligado a GTP é realizada pela efetora de Rab denominada GEF (*guanine nucleotide exchange factors*). Nesse estado ativo a Rab está apta a se ligar a outros efetores para realizar suas funções, mas para isso realiza a hidrólise do GTP à GDP por possuir intrinsicamente essa atividade catalítica, mas que também recebe a ajuda de outra efetora chamada de GAP (*GTPase activating proteins*). Voltando ao estado inativo ligado a GDP, as Rab's são transportadas pelo auxílio de uma chaperona denominada de REP (*Rab escort protein*) até uma enzima geranylgeranyl transferase (GGT) que modifica cisteínas localizadas na região C-terminal da Rab para que possa ser reconhecida pela efetora GDI (*GDP dissociation inhibitor*) que mantém as Rab's em seu estado inativo, até o momento que a proteína necessite realizar sua função e passar por todo o ciclo novamente. (Fonte: Adaptado de (STENMARK, 2009)).

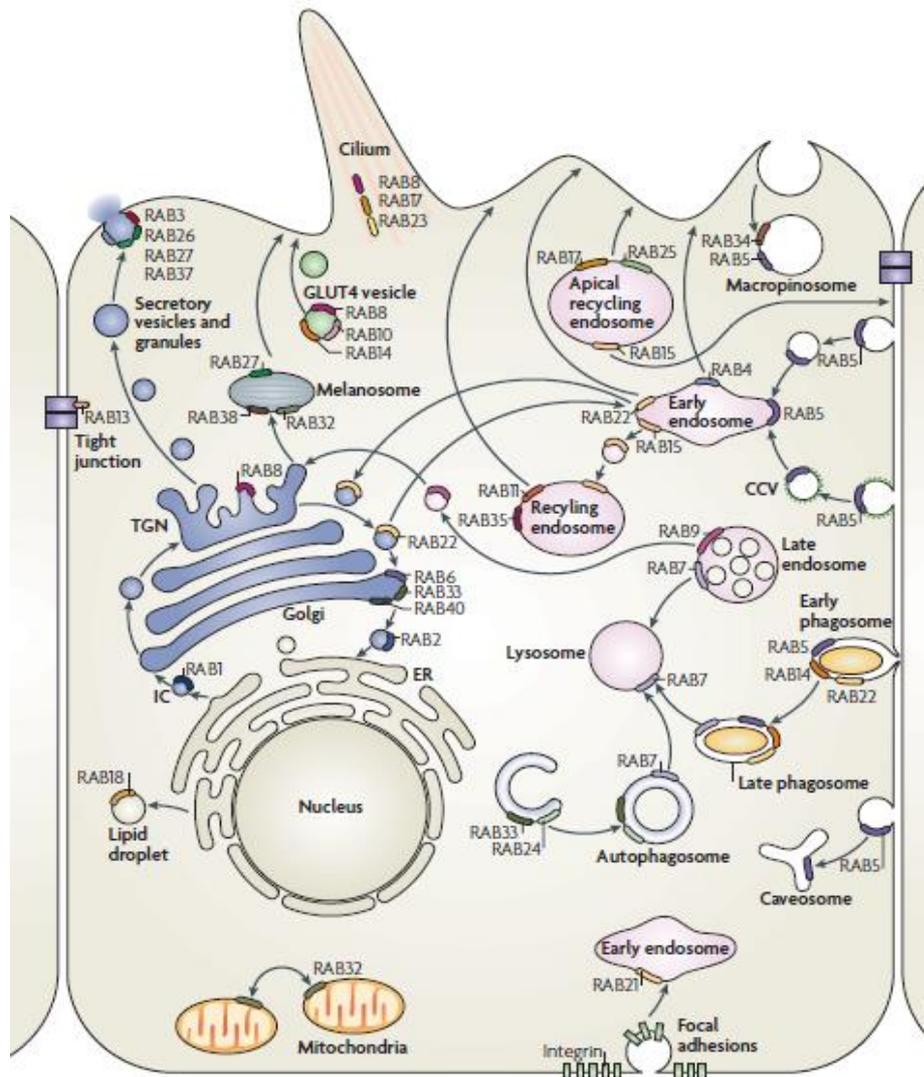


Figura 7. Localização subcelular e função das Rab's. Exemplo do transporte de membranas que ocorre em uma célula epitelial, ressaltando todas as vias e diferentes Rab's que atuam em cada uma delas. A atuação dessas proteínas começa logo no retículo endoplasmático (RE) onde a Rab18, por exemplo, é responsável pelo transporte dos lipídios ali sintetizados. Já as proteínas que devem ser endereçadas para o complexo de Golgi (CG) são enviadas do RE principalmente pela Rab1, no qual ao final do CG a Rab8 é a principal responsável por formar as vesículas que vão ser enviadas para a membrana plasmática para serem exocitadas. Outras Rab's como a 2 e 22 fazem parte do sistema de transporte retrogrado do CG até o RE, onde a última também participa do transporte de substâncias do CG para os endossomos primários e vice-versa. Dentro do sistema endossômico-lisossômico é possível ver a participação de diversas Rab's que contribuem para a sinalização das vesículas que devem avançar no estágio de degradação até a formação dos lisossomos, sendo elas formadas inicialmente por fagossomos, pinossomos, endossomos ou mesmo de substâncias já presentes no ambiente intracelular. Processos de ciliogênese e formação de junções intercelulares também possuem participação das Rab's. (Fonte: Adaptado de (STENMARK, 2009)).

Tendo em vista a diversidade funcional que as Rab's possuem, uma delas em particular aparenta possuir maior relevância no contexto da DP. Como dito, a Rab8a é a responsável pelo endereçamento da grande maioria das vesículas que necessitam ser translocadas do RE até a rede *trans* do CG até a membrana plasmática da célula para que os produtos que ali estão sejam liberados para o meio extracelular. Evidências descritas por Yin e colaboradores (2014) mostraram relação direta entre a α -sin e Rab8a, demonstrando que a presença de Rab8a modula a expressão/organização de α -sin dentro da célula, podendo levá-la a agregação e formação de LB's, mas que mesmo na presença desses agregados tóxicos, a Rab8a, quando superexpressa, desempenhava um papel citoprotetor na presença desses oligômeros, reduzindo a toxicidade da α -sin agregada (YIN et al., 2014). No entanto, os mecanismos que levam a interação de ambas as proteínas *in vitro* e no ambiente intracelular continuam pouco conhecidos, sendo necessário explorar quais regiões da Rab8a possuem interação com a porção C-terminal da α -sin e em quais condições microambientais.

De fato, a relação entre ambas as proteínas no contexto da DP ainda é pouco explorada na literatura. Gitler e colaboradores (2008), através de ensaios de transporte e microscopia eletrônica *in vitro* e experimentos de microscopia de fluorescência *in vivo* em levedura, demonstraram que a superexpressão de α -sin afetava de forma direta o transporte de vesículas do RE até o CG, de modo que as vesículas eram formadas normalmente, mas o processo de deslocamento de uma organela até a outra e/ou a fusão das vesículas que chegavam até o CG era reduzido ou interrompido quanto maior a concentração de α -sin presente no meio. Além disso, análises realizadas em modelo de DP em *C. elegans* também mostraram efeito protetivo nos organismos que apresentavam superexpressão de Rab8a em comparação com aqueles que apenas tinham grande expressão de α -sin (GITLER et al., 2008).

Baseado nessas informações, fica evidente que a α -sin está inserida em diversos processos necessários para o correto funcionamento das células. Porém, sob condições inadequadas, essa proteína pode se tornar nociva, visto que quando superexpressa ou sob níveis elevados de Ca^{2+} a α -sin pode ocasionar a formação de agregados tóxicos. Sabe-se que a α -sin interage com diversas proteínas envolvidas no transporte de vesículas, em especial a Rab8a. Dessa forma, uma desregulação de sua atividade poderia ocasionar morte neuronal, levando ao desenvolvimento da DP. Contudo, uma lacuna ainda existe, em especial, dentro da relação entre α -sin, Rab8a e o aumento dos níveis de Ca^{2+} nos terminais pré-sinápticos nos neurônios dopaminérgicos. Isso porque ainda não se sabe se o Ca^{2+} é realmente necessário para que a interação entre a α -sin e a Rab8a ocorra. Visto a importância desse mecanismo para a

homeostase celular e a crescente necessidade de tratamentos terapêuticos direcionados à DP, estudos celulares e *in vitro*, foram realizados neste trabalho, com o objetivo de elucidar a participação do Ca^{2+} na interação entre α -sin e Rab8a.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar a participação do Ca^{2+} na interação da α -sin com a Rab8a *in situ* e *in vitro*.

2.2. Específicos

- a) Avaliar o comportamento da α -sin na presença de Ca^{2+} em células neuronais;
- b) Caracterizar a α -sin recombinante por métodos biofísicos;
- c) Avaliar a influência do Ca^{2+} no comportamento biofísico da α -sin recombinante *in vitro*;
- d) Avaliar a interação entre α -sin e Rab8a em células neuronais na presença de Ca^{2+} ;
- e) Caracterizar e estabelecer as condições de interação entre α -sin e Rab8a recombinante *in vitro*.

3. METODOLOGIA

3.1. Cultura celular

Células SH-SY5Y (células de neuroblastoma humano) (ATCC CRL-2266) foram mantidas em meio DMEM/F12 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de antibióticos penicilina e estreptomicina (PSA) (Gibco), a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO₂.

3.2. Monitoramento da sinalização intracelular de cálcio

As células foram plaqueadas em lamínulas de vidro estéreis quadradas, posicionadas dentro da placa, a uma densidade de 4×10^5 células e incubadas em tampão HEPES (NaCl 142.2 mM, KCl 5.4 mM, NaH₂PO₄ 1.0 mM, HEPES 10 mM, dextrose 5.6 mM, MgSO₄ 0.8 mM, e CaCl₂ 1 mM) contendo a sonda FLUO-4/AM (6 μM) por 20 min a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, as lamínulas contendo as células foram transferidas para uma câmara de perfusão e levadas para observação em microscópio confocal Leica SP8. Os sinais de Ca²⁺ foram monitorados em células individuais durante a estimulação com KCl 50mM por 5 min. A emissão de fluorescência em resposta a detecção de Ca²⁺ intracelular foi monitorada utilizando lente objetiva de 63x e as imagens foram coletadas a 1.3 f/s. As alterações na fluorescência foram normalizadas pela fluorescência da linha de base e expressas como (F/F₀) x 100.

3.3. Transfecção transiente

As células foram plaqueadas em placas de 6 poços com lamínulas de vidro estéreis, a uma densidade de 4×10^5 células por poço. Após 24 h, as células foram transfectadas com FuGENE HD Transfection Reagent (Promega) e 3 μg de DNA plasmideal do vetor pEGFP-N2 contendo o gene *SNCA* e do vetor pCDNA5-mCherry contendo o gene *RAB8A*. As culturas foram mantidas por 48 h após a transfecção.

3.4. Indução de agregados de α-sinucleína e Rab8a

Após transfectadas, as células positivas para ambos os constructos acima, foram incubadas por 24 ou 48 h com meio de cultura DMEM/F12 contendo KCl 50 mM. Passado o

período de incubação de 24 ou 48 h, as células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% por 25 min em temperatura ambiente, lavadas 2x com PBS e montadas em solução de Vectashield contendo DAPI.

3.5. Microscopia confocal

As imagens foram coletadas em um microscópio confocal Leica SP8 com uma objetiva a óleo de 63x N.A 1.40. Para GFP, excitação a 488 nm e emissão a 509 nm. Para mCherry, 561/580 nm e DAPI, 358/461 nm.

3.6. Cepas de *E. coli*

As culturas de *E. coli* foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB), composto por 10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de cloreto de sódio. Para o meio sólido, foi adicionado ao meio 20 g/L de ágar bacteriológico. Todos os meios foram esterilizados em autoclave durante 20 min a 121°C antes do uso.

Para a produção dos plasmídeos e das proteínas recombinantes, diferentes cepas de *E. coli* foram selecionadas para cada caso. De forma específica, a propagação plasmideal foi realizada na cepa DH5 α , enquanto para a expressão das proteínas recombinantes foram utilizadas as cepas BL21(DE3) e Rosetta2 (DE3).

3.7. Clonagens

3.7.1. Amplificação dos genes SNCA e RAB8A

A amplificação completa dos genes *SNCA* e *RAB8A*, que codificam as proteínas α -sin e Rab8a, respectivamente, foi feita pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando-se uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano como molde. Os oligonucleotídeos utilizados nesta etapa do trabalho estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes *SNCA* e *RAB8A*.

Proteína	Primer	Sequência (5' - 3')
α-sin	HsSnca.M1.NdeI.FOR	CATATTCACATATGATGGATGTATTCATGAAAGGAC
α-sin	HsSnca.A140.Not.REV	TAGAGGCGGCCGCTTAGGCTTCAGGTTTCGTAGTCTTGA
α-sin-GFP	HsSnca.M1.HindIII.FOR	CATCTAAGCTTGCCATGGATGTATTCATGAAAGGAC
α-sin-GFP	HsSnca.A140.SmaI.REV	ATGACACCCGGGGGCTTCAGGTTTCGTAGTCTTGATAC
Rab8a	HsRab8a.M1.NdeI.FOR	AGCCATCATATGGCGAAGACCTACGATTACCTGT
Rab8a	HsRab8a.L207.XhoI.REV	GTCAGCTCGAGTCACAGAAGAACACATCGGAAAA
Rab8a-mCherry	HsRab8a.M1.HindIII.FOR	GCTCGAAGCTTATGGCGAAGACCTACGATTAC
Rab8a-mCherry	HsRab8a.L207.BamHI.REV	CGTATGGATCCCAGAAGAACACATCGGAAAAAGC

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Eppendorf Master Cycler, com Taq HiFi Buffer 1X, MgCl₂ 1,25 mM, dNTP 0,2 mM, 10 pmol dos oligonucleotídeos *forward* e *reverse* específicos para cada gene (Tabela 1), 0,5 μ L de *Taq Platinum DNA Polimerase HIFI* (Invitrogen) e cDNA molde, com volume total, por tubo, de 50 μ L. A PCR foi programada com a seguinte ciclagem: 94°C - 2:00 min [1X]; 94°C - 30 s, 60°C - 30 s, 72°C - 1:00 min [35X]; 72°C - 5:00 min [1X]. O resultado da amplificação foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 1% contendo *Sybr Safe* (Thermo Fisher). Posteriormente, os produtos da amplificação foram purificados com o kit *PCR Purification* (QIAGEN) ou kit *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN).

3.7.2. Reações de clivagem

Os insertos, amplificados e purificados por kit *PCR Purification* (QIAGEN) dos genes *SNCA* e *RAB8A*, assim como os vetores de interesse para cada um dos genes, foram clivados pelas enzimas de restrição presentes em seus respectivos primers (Tabela 2). Para cada reação de clivagem foram utilizados aproximadamente 500 ng do inserto de cada gene e dos vetores selecionados, 10 U das enzimas de restrição em respectivo tampão, em um volume total de 30 μ L. As reações foram incubadas à 37°C *overnight* ou por 4 h, de acordo com a atividade de cada enzima.

As reações de digestão foram submetidas à análise por eletroforese em gel de agarose 1% contendo *Sybr Safe*. Os fragmentos correspondentes aos DNAs de interesse,

produtos das reações de clivagem, foram então recuperados do gel e purificados utilizando o kit *Gel Extraction* (QIAGEN). Os respectivos vetores e enzimas de restrição usados para cada construção estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Vetores e enzimas de restrição utilizados.

Inserto	Vetor	Sistema de Expressão	Enzimas de restrição
SNCA	pET21b	<i>E. coli</i>	NdeI e NotI
SNCA	pEGFP-N2	Mamífero	HindIII e SmaI
RAB8A	pET-28a-TEV	<i>E. coli</i>	NdeI e XhoI
RAB8A	pCDNA5-mCherry	Mamífero	HindIII e BamHI

3.7.3. Reações de ligação

Para as reações de ligação entre os insertos e o vetores linearizados foi utilizado 1U da enzima T4 DNA ligase (Promega), tampão específico da enzima, 60 ng do vetor linearizado e 100 ng do inserto, em um volume total de 20 μ l. A reação foi mantida a 16°C *overnight*.

3.7.4. Transformação em *E. coli*

As células de *E. coli*, cepa DH5- α , termo-competentes foram transformadas com o produto total das reações de ligação. Para isso, após a adição da reação de ligação na bactéria, o sistema ficou em repouso à 4°C por 30 min, em seguida foi realizado o choque-térmico colocando o sistema por 1 min 30 s à 42°C e rapidamente 1 min à 4°C, por fim houve a adição de 800 μ L de meio LB à essas células onde foram incubadas à 37°C por 1h à 200 rpm. As células transformadas foram plaqueadas em 20 ml de meio de cultura LB sólido contendo 20 μ l do antibiótico de seleção dos vetores utilizados e foram mantidas a 37°C *overnight*.

3.7.5. Confirmação dos clones por PCR de colônia

Foram coletadas de 7 a 10 colônias transformantes para realizar a PCR de colônia. Na PCR foram utilizados 5 μ l da suspensão celular, resultante de 1 colônia transformada em 20 μ l de meio LB, como molde para a reação, 0,5 mM dos oligonucleotídeos *forward* e *reverse* específicos de cada vetor, *Buffer HF Phusion* 1X, dNTPs 10 mM, MgCl₂ 25 mM, e 1 U de *Taq* DNA polimerase Phusion (produzida no LNBio). A PCR foi realizada com a seguinte ciclagem:

98°C - 1 min [1X]; 98°C - 10 s, 55°C - 30 s, 72°C - 2 min [35X]; 72°C - 10 min [1X]. Os produtos das reações foram analisados em gel de agarose 1% para confirmação dos clones.

3.7.6. Sequenciamento dos clones

Para cada construção, foram selecionados e sequenciados dois clones previamente confirmados por PCR de colônia. Os clones selecionados foram cultivados em LB líquido, com o devido antibiótico, a 37°C *overnight*, 200 rpm. Após esse período, foi utilizado o kit *NucleoSpinPlasmid* (Macherey-Nagel), para a extração do DNA plasmideal das colônias selecionadas, para que fossem sequenciadas em sistema *Applied Biosystems 3500XL*, a fim de confirmar a integridade da sequência de nucleotídeos do gene em questão.

3.8. Indução da expressão da Hs α -sinucleína e Hs Rab8a

Para a expressão da proteína α -sin, foi utilizada a cepa BL21(DE3) de *E. coli* transformada com o vetor pET21b contendo o gene *SNCA* (pET21b+SNCA). Culturas foram crescidas a partir de 1 colônia utilizando-se 50 mL de meio LB líquido e 100 μ g/mL de ampicilina a 37°C, 200 rpm, *overnight*. Posteriormente, foram preparados inóculos contendo 50 mL da cultura cultivada *overnight* juntamente com 500 mL de meio LB e antibiótico, os quais foram mantidos a 37°C, 200 rpm até que o meio de cultura atingisse densidade óptica (D.O.) de ~0,6. Nesta etapa, a expressão da proteína foi induzida com a adição de IPTG 1 mM (*isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*) durante 4 h a 37°C, 200 rpm.

Já para a expressão da proteína Rab8a, foi utilizadas a cepa Rosetta2 de *E. coli* transformada com vetor pET-28a-TEV contendo o gene *RAB8A* (pET28a-TEV+RAB8A). As culturas contendo 50 mL foram feitas da mesma maneira como descrito acima, porém, além dos 100 μ g/mL de canamicina, foi adicionado também 34 μ g/mL de clorofenicol, sendo essa resistência intrínseca da cepa utilizada. Os inóculos de 500 mL foram cultivados da mesma maneira e a indução foi feita pela adição de IPTG 0,5 mM por 16 h a 18°C, 200 rpm. Ao final do processo, os meios de cultura contendo as bactérias com as respectivas proteínas expressas foram centrifugados por 45 min à 9000 g à 4°C e os *pellets* coletados.

3.9. Purificação

3.9.1. α -sin

O *pellet* de células contendo a α -sin, foi congelado à -20°C *overnight* para a lise bacteriana (Bartels, et al., 2019). Após este período, houve o descongelamento e posterior ressuspensão das células em 20 mL tampão contendo Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 25 mM e EDTA 1 mM pH 8,0 (Tampão A). As células em suspensão foram incubadas em banho térmico à 95°C durante 15 min, resfriada à 4°C e centrifugada por 45 min à 20000 g à 4°C . O sobrenadante, contendo a proteína alvo foi coletado e filtrado em filtro $0,45\ \mu\text{m}$. O volume do lisado foi ajustado para 100 mL com tampão A.

Para o primeiro passo de purificação, usou-se uma coluna de troca-aniônica HiScreen Q HP (GE HealthCare) contendo 4,7 mL de volume de coluna (VC), previamente equilibrada com Tampão A, no qual a amostra foi injetada sob fluxo de 1,0 mL/min com o uso do equipamento Akta FPLC (GE HealthCare). Após a injeção da amostra, a coluna foi lavada com tampão A sob mesmo fluxo de 1,0 mL/min até que o sinal de UV e de condutividade estivessem estabilizados. Em seguida, iniciou-se o processo de eluição da proteína com um gradiente de 0 a 100% de Tampão B (Tampão A + NaCl 1 M) em 15 VC. Frações de 2 mL foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE 13%.

As frações contendo a proteína de interesse foram reunidas, concentradas em concentrador UltraFree 4, 10 kDa (Millipore) e submetidas à purificação por exclusão molecular em sistema Akta FPLC (GE HealthCare). A coluna Superdex 75 16/60 prepgrad (GE Healthcare) foi equilibrada em tampão contendo acetato de sódio 50 mM, pH 7,4, sob fluxo de 0,5 ml/min. Frações de 1 mL foram coletadas e posteriormente analisadas por SDS-PAGE 13%.

Por fim, após a purificação por cromatografia de exclusão molecular, a amostra foi dialisada contra 2 L de Tampão C contendo Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 e NaCl 50 mM, *overnight* à 4°C sob agitação branda e com o uso de membranas SpectraPor (MWCO 6 – 8.000). A amostra final foi congelada em nitrogênio líquido e estocada à -80°C .

3.9.2. Rab8a

O *pellet* de células contendo a Rab8a foi ressuscitado em 20 mL, por litro de indução, em tampão contendo HEPES 50 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, MgCl₂ 1 mM, β-mercaptoetanol 2 mM e PMSF 1 mM. As células em suspensão foram incubadas com lisozima 0,2 mg/mL por 30 min e posteriormente sonicadas com ~20 pulsos de 15 s em 50% de amplitude. A suspensão foi centrifugada por 45 min à 20000 g à 4°C e o sobrenadante foi coletado e filtrado em filtro 0,45 μM.

Para o primeiro passo de purificação, usou-se uma coluna HiTrap Chelating (GE HealthCare) contendo 5,0 mL de volume de coluna (VC), previamente equilibrada com Tampão D composto por HEPES 50 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, MgCl₂ 1 mM e β-mercaptoetanol 2mM. A amostra foi injetada sob fluxo de 1,0 mL/min com o uso do equipamento Akta FPLC (GE HealthCare). Após a injeção da amostra, a coluna foi lavada com tampão de mesma composição usado no equilíbrio da coluna, sob mesmo fluxo de 1,0 mL/min, até que o sinal de UV estivesse estabilizado. Para a eluição da proteína foi utilizado Tampão E com adição de imidazol 500 mM. Frações de 2 mL foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE 13%.

As frações contendo a proteína de interesse foram reunidas e concentradas em concentrador UltraFree 4, 10 kDa (Millipore) e submetidas a purificação por exclusão molecular em sistema Akta FPLC (GE HealthCare). A coluna Superdex 75 16/60 prepgrad (GE Healthcare) foi equilibrada em Tampão F contendo HEPES 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 1mM e DTT 1 mM sob fluxo de 0,5 ml/min. Frações de 1 mL foram coletadas e posteriormente analisadas por SDS-PAGE 13%. A amostra final foi congelada em nitrogênio líquido e estocada à -80°C.

3.10. Caracterização biofísica da α-sin

3.10.1. Dicroísmo Circular (CD)

A técnica CD foi realizada no UV distante (260 - 185 nm) com uso do equipamento Jasco J-850 (JASCO) a fim de avaliar o conteúdo de estrutura secundária da proteína α-sin em diferentes concentrações da proteína e na presença de diferentes concentrações do íon Ca²⁺ em solução. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente e em cubeta de quartzo com caminho ótico de 0,1 mm, sendo que cada condição avaliada foi incubada durante 24 h à 4°C e 37°C e 48 h à 37°C. As amostras analisadas estavam em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 e

NaCl 50 mM. As condições na presença de Ca^{2+} foram preparadas em mesmo tampão acrescido de CaCl_2 . Para cada medida foram coletados 10 espectros utilizando o *software SpectraManager (JASCO)*. Os espectros foram plotados através do programa *GraphPad Prism 8*. Por fim, através da página *Dichroweb*, foram feitas as deconvoluções dos espectros obtidos.

3.10.2. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

As medidas de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) foram realizadas no equipamento *Zetasizer Nano ZS* (Malvern Panalytical), a fim de avaliar se houve mudanças no raio hidrodinâmico da α -sin nas diferentes concentrações de proteína e íon Ca^{2+} . As medidas foram realizadas a temperatura ambiente em cubeta de quartzo contendo as amostras incubadas por 24 h à 4°C e 37°C e 48 h à 37°C e centrifugadas a 14000 rpm, 4°C por 10 min. O tampão utilizado foi Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 e NaCl 50 mM. As condições na presença de Ca^{2+} foram preparadas em mesmo tampão acrescido de CaCl_2 . Os dados foram coletados através do *software Zetasizer Nano v3.30* e plotados com o programa *GraphPad Prism 8*.

3.10.3. Cromatografia de Exclusão Molecular com Espalhamento Multiangular de Luz (SEC-MALS)

Para determinar o peso molecular e estado oligomérico da α -sin obtida, foi realizado a técnica de Cromatografia de Exclusão Molecular com Espalhamento Multiangular de Luz (SEC-MALS) no equipamento *OMNISEC GPC/SEC System* (Malvern Panalytical). Amostras de α -sin nas concentrações de 0,5 mg/mL e 5,0 mg/mL foram analisadas em triplicata, com uso de uma coluna Superdex 75 10/300 prepgrad (GE Healthcare) em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 e NaCl 50 mM, sob fluxo de 0,4 mL/min. Os espectros obtidos (índice de refração, espalhamento de alto e baixo ângulo de luz e viscosidade) para cada replicata foram tratados no mesmo *software* do equipamento utilizando uma curva padrão de BSA, à 5,0 mg/mL em tampão de mesma composição para a normalização dos dados. Os gráficos foram plotados com uso do programa *GraphPad Prism 8*.

3.10.4. Ensaio de 1,8-ANS

Para avaliar a exposição de resíduos hidrofóbicos em solução da α -sin foram realizados o ensaio baseado na intensidade da fluorescência do 1,8-ANS (*1-Anilino-naphthalene-8-Sulfonic Acid*). Amostras de α -sin nas concentrações de 0,5 mg/mL e 5,0 mg/mL, na presença e ausência de 1 mM de Ca^{2+} , foram incubadas à 37°C na presença de ANS 20 μM , em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 e NaCl 50 mM, em placa de 96 poços (Greiner). As medidas de fluorescência foram obtidas pelo equipamento *EnVision* (Perkin Elmer), sendo os comprimentos de onda de 370 nm/400-600 nm (ex/em) para o ANS. Os gráficos foram plotados com uso do programa *GraphPad Prism 8*.

3.11. Ensaio de interação α -sin e Rab8a

3.11.1. Pull-down

Para avaliar a interação entre α -sin e Rab8a *in vitro*, foi utilizado o ensaio de *pull-down* com uso da resina TALON (TakaraBio). Foram avaliadas quatro condições: 1) 50 μg de α -sin e 50 μg de Rab8a; 2) 50 μg de α -sin e 50 μg de Rab8a na presença de Ca^{2+} 1 mM; 3) 50 μg de α -sin e 50 μg de Rab8a na presença de GDP 1 mM; 4) 50 μg de α -sin e 50 μg de Rab8a na presença de Ca^{2+} 1 mM e GDP 1 mM. Todas essas condições foram preparadas em um volume total de 400 μL de tampão de ligação composto por HEPES 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, MgCl_2 1 mM e β -mercaptoetanol 2 mM (as condições contendo Ca^{2+} e/ou GDP possuíam adição do respectivo aditivo no tampão usado) e incubadas por 2h30 à 4°C sem agitação.

A resina TALON foi previamente equilibrada com tampão de ligação e posteriormente carregada com cada uma das condições descritas por 30 min à 4°C com agitação branda. Posteriormente, o sistema foi centrifugado por 1 min à 1000 g à 4°C (todas as etapas de centrifugação seguiram esses parâmetros), sendo o sobrenadante coletado para posterior análise. Em seguida foram realizadas quatro lavagens com 200 μL de tampão de ligação, sendo coletado o conteúdo da primeira e quarta lavagem para análise. Por fim, foi adicionado 200 μL tampão de eluição de mesma composição do tampão de ligação com adição de imidazol 500 mM. Os sistemas foram incubados por 10 min e posteriormente centrifugados. Os sobrenadantes dessa etapa foram coletados para análise.

Além das condições de interação descritas, foram realizados os controles tanto da α -sin quanto da Rab8a isoladas sob as mesmas condições descritas previamente.

3.11.2. Western blotting

Cada condição/etapa coletada durante o ensaio de *pull-down* foi submetida a corrida em gel de SDS-PAGE 13% e transferidas para membranas de nitrocelulose de 0,45 μm (BioRad). As membranas foram incubadas por 2 h à temperatura ambiente com anticorpos anti- α -sin (1:1000, Abcam) e anti-Rab8a (1:1000, Abcam) seguidos de incubação por 1 h à temperatura ambiente com anticorpos secundários conjugados à HRP anti-rabbit, 1:5000. As membranas foram reveladas usando o sistema de detecção de quimioluminescência BioRad (Clarity Western ECL, BioRad). Os sinais de quimioluminescência foram aferidos qualitativamente usando o software Image J.

3.12. Análise estatística

Para as imagens provenientes da microscopia confocal, ao menos 5 imagens de três experimentos individuais por grupo foram coletadas. Gráficos representam a média \pm SEM. Teste T de *Student* foi utilizado e $P < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1. Clonagens

Para a realização dos experimentos de interação entre α -sin e Rab8a, inicialmente, foi necessário preparar as construções plasmideais contendo os genes responsáveis pela expressão de cada uma das proteínas. As construções utilizadas foram planejadas para que toda a sequência de aminoácidos que compõe ambas as proteínas fossem expressas por completo (*full lenght*), sendo 140 aminoácidos para a α -sin e 207 aminoácidos para a Rab8a.

4.1.1. Clonagem da α -sin e Rab8a para ensaios *in situ* em células SH-SY5Y

Os vetores escolhidos para as clonagens das construções utilizadas nos ensaios *in situ* em células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) foram o pEGFP-N2 para a α -sin e o vetor pCDNA5-mCherry para a Rab8a. O pEGFP-N2 possui em sua sequência o gene da proteína verde fluorescente (GFP), gerando assim um constructo contendo a α -sin com a GFP ligada à sua porção C-terminal, o que torna possível a identificação da proteína na célula através da microscopia de fluorescência. Já o vetor pCDNA5-mCherry, contendo em sua sequência o gene de expressão da proteína fluorescente mCherry, foi utilizado para detecção da Rab8a, no qual a proteína fluorescente é expressa em conjunto ao N-terminal da Rab8a.

Como mostrado na Figura 8A e 8C, as sequências de DNA contendo o gene *SNCA* (420 pares de bases (pb)) e o gene *RAB8A* (621 pb) foram amplificados por PCR através de uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano obtida comercialmente. Essas sequências foram inseridas nos respectivos vetores, pEGFP-N2 e pCDNA5-mCherry para posterior seleção dos clones obtidos (Figura 8B e 8D). Para identificação de colônias positivas para o gene *SNCA*, os *primers* utilizados foram específicos para a sequência inserida, sendo positivos os clones que amplificaram sequências de 420 pb (Figura 8B). Já para as construções do gene *RAB8A*, foram usados *primers* específicos para o vetor plasmidial, gerando amplificação de um fragmento de 1655 pb (Figura 8D). Uma vez identificados, os clones positivos foram selecionados e sequenciados para confirmar a integridade da sequência dos genes inseridos nos vetores (dados não mostrados).

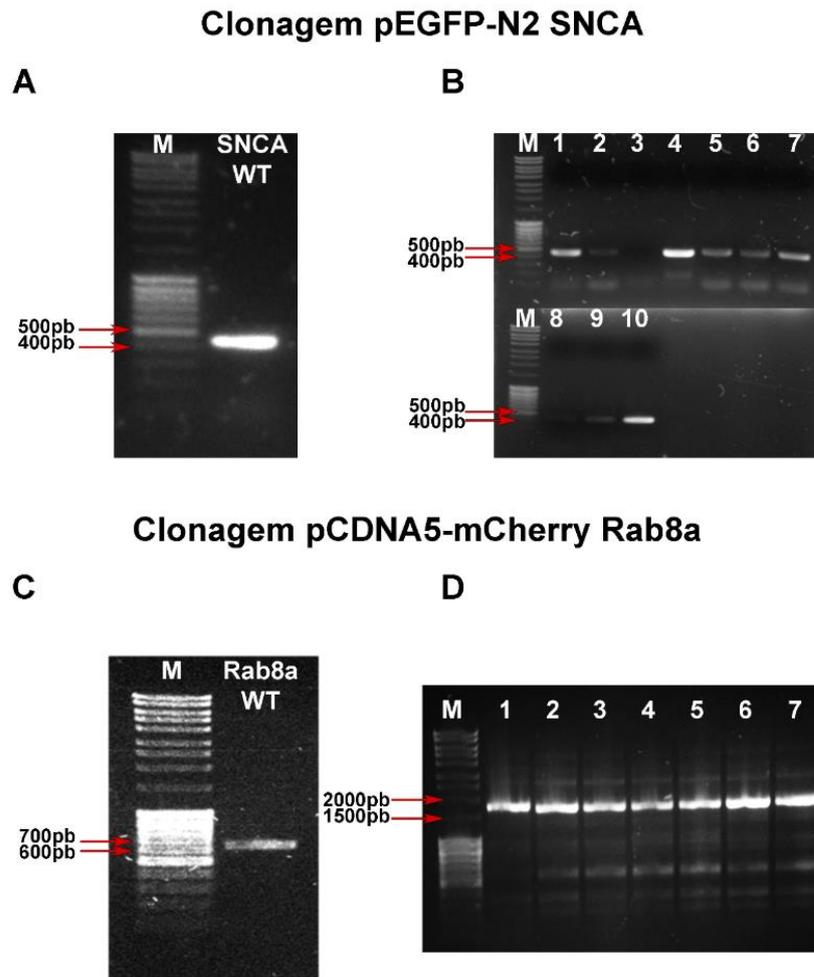


Figura 8. Clonagem pEGFP-N2-SNCA e pCDNA5-mCherry-RAB8A. A) Gel de agarose 1% mostrando o produto da PCR contendo a sequência do gene *SNCA* de 420 pb. B) Gel de agarose 1% contendo o produto de PCR de cada um dos clones obtidos para a construção pEGFP-N2-SNCA, após o método de PCR de colônia, sendo positivos os que apresentam bandas de 420 pb. C) Gel de agarose 1% mostrando o produto da PCR contendo a sequência do gene *RAB8A* de 621 pb. B) Gel de agarose 1% contendo o produto de PCR de cada um dos clones obtidos para a construção pCDNA5-mCherry-RAB8A, após o método de PCR de colônia, sendo positivos os que apresentam bandas de 1655 pb.

4.1.2. Clonagem da α -sin e Rab8a para expressão em sistema procarioto

Para as construções contendo os genes *SNCA* e *RAB8A* utilizados para a expressão das respectivas proteínas em sistema procarioto, utilizamos os vetores pET21b para a α -sin e pET-28a-TEV para a Rab8a. A escolha do pET21b foi baseada na estratégia de produção da proteína descrita em BARTELS (2019), que possibilitou a expressão do constructo sem que nenhum tipo de sequência adicional fosse necessário para auxiliar no processo de purificação da α -sin. Já o vetor pET-28a-TEV possui em sua sequência o gene responsável por expressar,

em conjunto com a proteína de interesse, uma sequência de seis histidinas (His-Tag) que auxilia no processo de purificação por afinidade à metal. Além disso, outros grupos mostraram sucesso em expressar e purificar a Rab8a utilizando construção semelhante.

A Figura 9A e 9C mostra que as sequências de DNA contendo o gene *SNCA* (420 pb) e o gene *RAB8A* (621 pb) foram amplificadas por PCR com sucesso. Essas sequências foram inseridas nos respectivos vetores (pET21b e pET-28a-TEV) e os clones positivos obtidos foram selecionados através do método de PCR de colônia (Figura 9B e 9D). Para as construções do gene *SNCA*, os clones positivos amplificaram sequências de 420 pb referente apenas ao tamanho do gene que codifica a proteína. Já para as construções do gene *RAB8A* foram usados *primers* específicos para a sequência inserida, sendo positivos os clones que amplificaram sequências de 621 pb. Novamente, os clones positivos selecionados para cada uma das construções foram sequenciados para confirmar a integridade da sequência dos genes inseridos nos vetores (dados não mostrados). De posse destes resultados obtidos, indicando a integridade e sucesso na obtenção dos constructos de expressão, partimos para os ensaios funcionais e biofísicos.

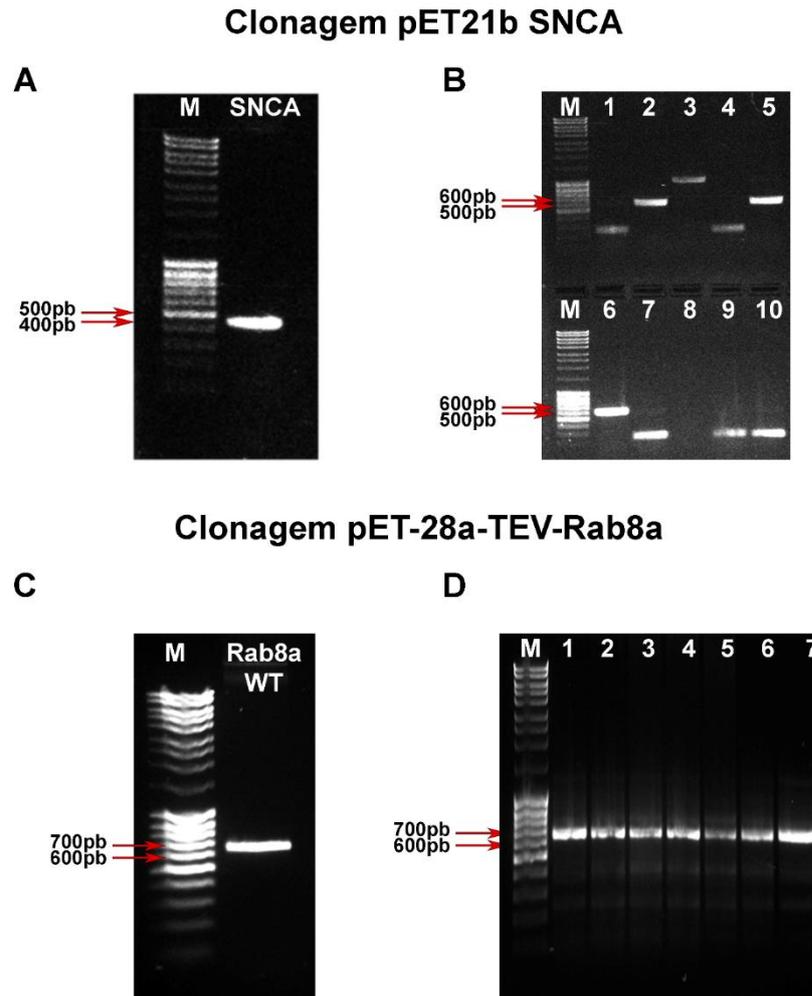


Figura 9. Clonagem pET21b-SNCA e pET-28a-TEV-Rab8a. A) Gel de agarose 1% para confirmação do produto da PCR contendo a sequência do gene *SNCA* de 420 pb. B) Gel de agarose 1% contendo o produto de PCR de cada um dos clones obtidos para a construção pET21b-SNCA, após o método de PCR de colônia, sendo os positivos o que apresentam bandas de 420 pb. C) Gel de agarose 1% para confirmação do produto da PCR contendo a sequência do gene *RAB8A* de 621 pb. D) Gel de agarose 1% contendo o produto de PCR de cada um dos clones obtidos para a construção pET-28a-TEV-RAB8A, após o método de PCR de colônia, sendo os positivos o que apresentam bandas de 621 pb.

4.2. O Ca^{2+} promove a agregação α -sinucleína em células SH-SY5Y

Estudos publicados anteriormente mostraram que a α -sin tem interação direta com o íon Ca^{2+} em sua porção C-terminal (LAUTENSCHLÄGER et al., 2018; NIELSEN et al., 2001). Além disso, já foi demonstrado que a ligação de íons metálicos à proteínas amiloidogênicas como a S100, por exemplo, regula sua conformação e, em alguns casos, a oligomerização de dímeros em oligômeros de maior grau de magnitude (BOTELHO et al.,

2009; FRITZ et al., 2010). Para investigar se o aumento nos níveis de Ca^{2+} poderia, também, alterar a distribuição intracelular da α -sin e causar sua agregação, utilizamos as células excitáveis SH-SY5Y, um modelo grandemente utilizado de neurônios dopaminérgicos em estudos *in vitro* (XICOY; WIERINGA; MARTENS, 2017; XIE; HU; LI, 2010). O influxo de Ca^{2+} em células excitáveis ocorre por meio de diferentes canais, dentre eles os canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem. A voltagem da membrana neuronal é regulada, sobretudo, pela concentração de íons sódio (Na^+) e potássio (K^+) nos espaços intra e extracelular. Alterações nessas concentrações podem levar à despolarização da membrana e, conseqüentemente, à abertura dos canais para Ca^{2+} voltagem-dependentes (RIENECKER; POSTON; SAHA, 2020). Diversos compostos químicos têm sido utilizados para estimular essa despolarização em experimentos *in vitro*, dentre eles, o cloreto de potássio (KCl). Quando adicionado ao meio extracelular, o KCl eleva a concentração de K^+ nesse local, provocando despolarização e abertura de canais para Ca^{2+} , o que possibilita a observação da resposta celular a esse íon (DOLMETSCH et al., 2001). Para comprovar flutuações no nível intracelular de Ca^{2+} mediante estímulo, células SH-SY5Y foram carregadas com a sonda para Ca^{2+} FLUO-4/AM, e estimuladas com KCl 50 mM durante imageamento por microscopia confocal *live-imaging*. Como pode ser observado na Figura 10A e 10B, células não-estimuladas não apresentam flutuações no sinal fluorescente da sonda ao longo de todo tempo de imageamento. No entanto, células estimuladas com KCl 50 mM apresentaram um pico de fluorescência que é um indicativo da sinalização de Ca^{2+} seguido de normalização de seus níveis citosólicos durante o imageamento (Figura 10A-C), comprovando a eficiência do tratamento em alterar os níveis intracelulares de Ca^{2+} .

Com base nos resultados anteriores, células SH-SY5Y foram transfectadas com o constructo pEGFP-N2-SNCA e, após 48h da transfecção, analisadas em três condições distintas: ausência de estimulação com KCl; 24 h de estimulação com KCl; e 48 h de estimulação com KCl. Ao observar essas células por microscopia confocal após os tratamentos (Figura 10D), verificamos que o primeiro grupo, sem qualquer tratamento, apresentou a α -sin-GFP dispersa de forma homogênea por todo o citosol celular. Já em cerca de 15% das células estimuladas por 24 h com KCl 50 mM foi possível observar a presença de pequenos grânulos GFP-positivos, indicando a formação de agregados de α -sin em decorrência do aumento de Ca^{2+} no citoplasma (Figura 10E). Porém, grande parte da α -sin-GFP ainda apresentava-se dispersa sem a formação de agregados nessa condição. Já sob a condição de 48 h de tratamento com a solução despolarizante, cerca de 30% das células apresentaram grânulos de α -sin GFP-

positivos (Figura 10D e 10E), sugerindo que o tempo de exposição a essas condições contribuem para que a α -sin altere sua organização e distribuição citoplasmática. Além disso, a distribuição da proteína que não se encontra diretamente nos oligômeros aparenta ser menos homogênea e estar menos difusa por todo citosol quando comparado às condições anteriores.

Para confirmar a hipótese de que a α -sin tende a se oligomerizar em estruturas de ordem superior de maneira tempo-dependente nessas condições de estímulo despolarizante/aumento dos níveis intracelular de Ca^{2+} e se esses oligômeros passam a se constituir como agregados, as células GFP positivas que continham grânulos foram analisadas e o tamanho dos grânulos formados em cada condição foram mensurados. Como parâmetro, a análise se baseou em um trabalho publicado por GHOSH e colaboradores (2018), em que os grânulos considerados como agregados necessitavam possuir diâmetro igual ou superior a $2\ \mu\text{m}$ (GHOSH; KUNDU; CHATTOPADHYAY, 2018). Como podemos observar no gráfico da Figura 10F, o tamanho dos grânulos GFP-positivos nas condições controle e no tratamento por 24 h com KCl não mostrou diferença significativa, indicando que os grânulos presentes no tratamento de 24 h ainda não representam um agregado de α -sin. Porém, na condição de 48 h de tratamento foi observado que ~60% das células positivas para grânulos GFP-positivos apresentaram estruturas com diâmetro maior ou igual a $2\ \mu\text{m}$, confirmando que a maior exposição da célula a essa condição proporciona a formação de agregados maiores de α -sin (Figura 10F).

Esses dados mostram que nas células da linhagem SH-SY5Y, o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} altera a distribuição e organização da α -sin.

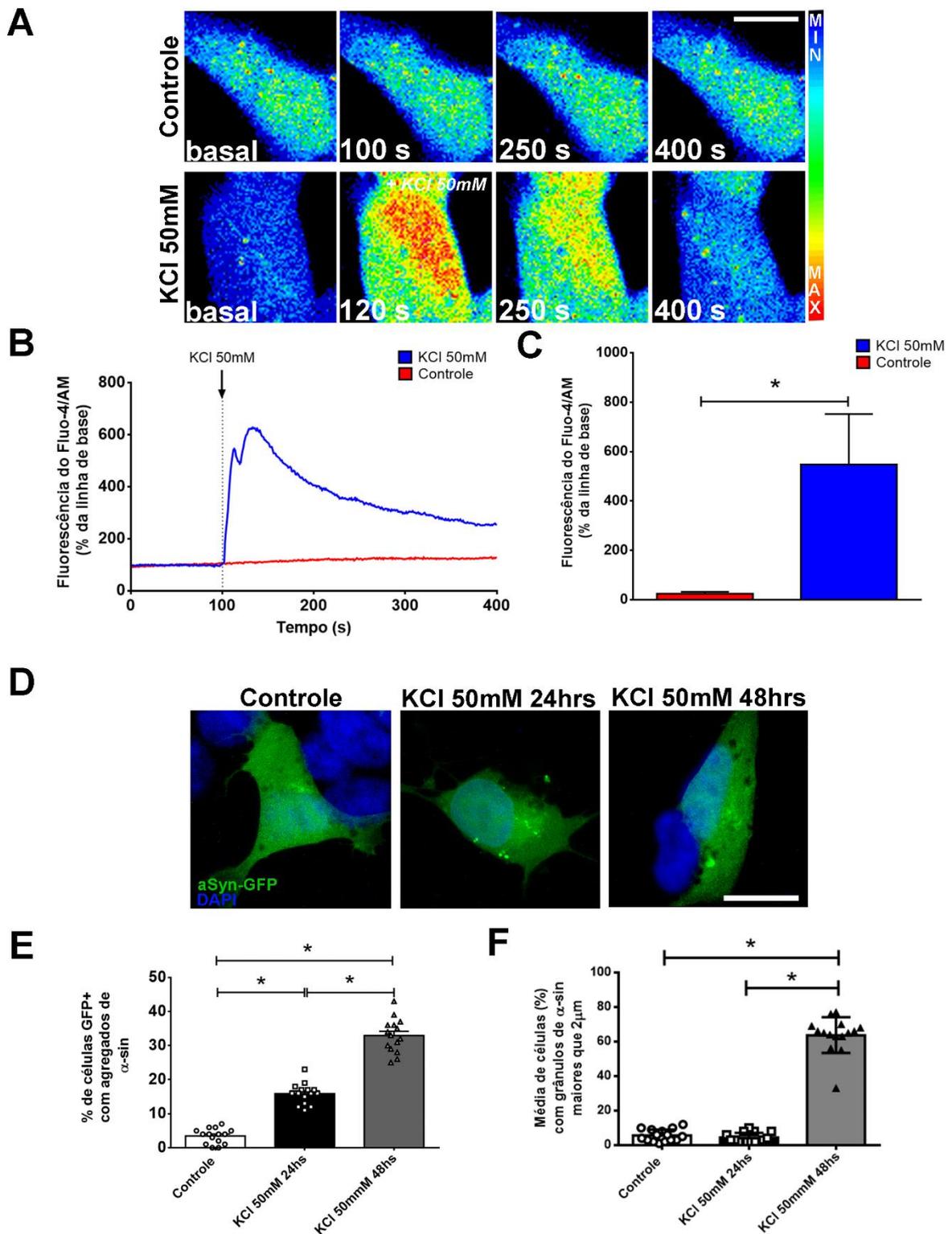


Figura 10. Células SH-SY5Y sofrem despolarização por estímulo de KCl promovendo aumento dos níveis de Ca^{2+} citosólico e agregação da α -sin. A) Microscopia confocal de células SH-SY5Y incubadas com Fluo-4/AM ($6 \mu\text{M}$) em condição controle e estimuladas com solução de KCl 50mM (barra de escala: $10 \mu\text{m}$). B) Tempo de duração representativo do sinal total de Ca^{2+} . A seta indica o momento em que ocorreu o tratamento das células com KCl. C) Quantificação do pico de fluorescência após tratamento com KCl 50mM. (As barras de erro indicam a média \pm erro padrão da média; $n =$ pelo menos 25 células para cada grupo, * $p < 0,05$ por teste t de *Student* não-

pareado). D) Microscopia confocal representativa de células SH-SY5Y transfectadas com pEGFP-N2-SNCA expressando α -sin-GFP (verde) mostrando grupo controle e tratamento de 24 h e 48 h com KCl 50mM. É possível observar que o tratamento faz com que a α -sin se agregue em grânulos citoplasmáticos no decorrer do tempo. Os núcleos foram corados com DAPI (azul). E) Quantificação da porcentagem de células GFP positivas que apresentavam grânulos de α -sin para a condição controle e cada grupo tratado. (As barras de erro indicam a média \pm erro padrão da média; n = pelo menos 15 células para cada grupo, * p < 0,05 por teste *t* de Student não-pareado). F) Quantificação da porcentagem de células GFP positivas que apresentavam grânulos de α -sin maiores que 2 μ m para a condição controle e cada grupo tratado. (As barras de erro indicam a média \pm erro padrão da média; n = pelo menos 15 células para cada grupo, * p < 0,05 por teste *t* de Student não-pareado).

4.3. A α -sin *in vitro* possui alteração da sua estrutura secundária de maneira concentração-dependente, mas independente do Ca^{2+}

Estudos prévios da literatura sugerem que a α -sin, quando superexpressa ou submetida a altas concentrações de Ca^{2+} pode sair de um estado monomérico para um estado oligomérico ou até mesmo fibrilar (GOODWIN et al., 2013; LOWE et al., 2009; NATH et al., 2011; RCOM-H'CHEO-GAUTHIER et al., 2016). Baseados nestes trabalhos e em nossos resultados obtidos *in situ*, o próximo objetivo foi averiguar se o comportamento da α -sin recombinante *in vitro* teria o mesmo perfil quando submetida a condições em que o ambiente químico estivesse com altas concentrações de Ca^{2+} . Para isso, inicialmente, produzimos a α -sin recombinante utilizando *E. coli* cepa BL21(DE3) transformada com a construção pET21b-SNCA e expressão induzida com IPTG. O sobrenadante obtido após a lise das células foi submetido a cromatografia de troca-iônica, já que a construção da α -sin utilizada não continha nenhum tipo de *tag* específico para outros métodos cromatográficos. Após todo conteúdo do lisado ser injetado na coluna, iniciou-se o processo de eluição com o aumento gradativo da concentração de NaCl presente no tampão. Esse aumento do conteúdo de sal no meio faz com que os íons presentes em maior quantidade compitam com a proteína pela resina presente na coluna (BAHADIR, 2013; HEALTHCARE, 2016). No momento em que detectamos aumento do sinal de UV o gradiente foi mantido nessa concentração de sal até que todo conteúdo fosse eluído nessa faixa de condutividade. No caso da α -sin, a eluição ocorreu em uma condutividade ~ 23 mS/cm (Figura 11A).

Após análise por SDS-PAGE, a α -sin obtida nessa primeira etapa cromatográfica foi submetida a cromatografia de exclusão molecular, de forma a garantir a homogeneidade da amostra com relação ao seu tamanho e estado oligomérico em solução. O volume de retenção observado foi de ~ 60 mL (Figura 11B), o que, segundo o padrão da coluna

SUPERDEX 75 16/60, corresponde a proteínas com peso molecular de ~50 kDa, valor esse bem distante do esperado para a α -sin que possui 14,46 kDa. Essa diferença pode ocorrer devido ao fato de que estes valores de volumes de retenção são baseados em proteínas globulares, e como a α -sin tem característica de proteína desestruturada, seu volume de retenção durante o método cromatográfico pode apresentar distorções.

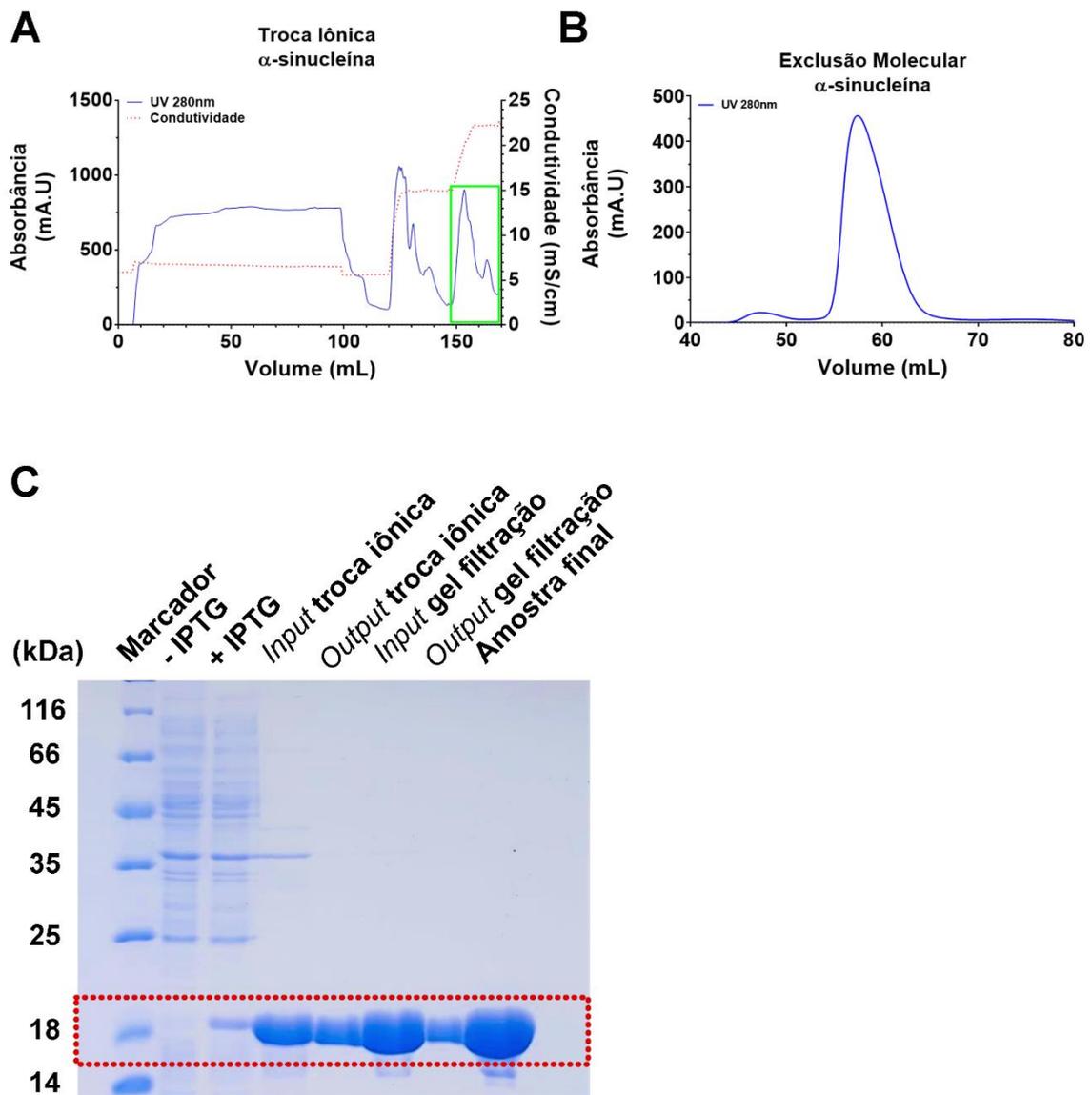


Figura 11. Purificação da α -sin recombinante. A) Cromatograma resultante após cromatografia de troca-iônica da fração solúvel do lisado de bactérias contendo a α -sin recombinante. Pico destacado em verde corresponde à eluição da proteína (sinal de UV 280 nm representada em azul e sinal da condutividade representado em vermelho tracejado). B) Cromatograma resultante após cromatografia de exclusão molecular das frações coletadas no pico destacado em A (sinal de UV 280 nm representada em azul). C) SDS-PAGE 13% representativo durante todas as etapas de purificação.

Ao final do processo de purificação foi obtida a α -sin recombinante com grau de pureza acima de 95% e em concentração de $\sim 7,0$ mg/mL. Isso pôde ser confirmado através da análise por SDS-PAGE de todas as etapas de purificação (Figura 11C). De posse da proteína recombinante, inicialmente avaliamos qual seu comportamento biofísico *in vitro* quando incubada por 24 ou 48 h em altas ou baixas concentrações, uma vez que a literatura sugere que sua superexpressão em células de eucariotos ocasiona a formação de agregados, levando, com o tempo, à formação de LB's maduros (FARRER, 2006). Desta maneira, utilizamos o CD para avaliar a estrutura secundária da proteína nessas condições e o DLS para determinar o raio hidrodinâmico dessas diferentes amostras a fim de averiguar possível agregação da α -sin nestas diferentes concentrações. As concentrações avaliadas foram de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg/mL, em que cada condição foi mantida durante 24 h à 4°C antes de cada uma das análises.

Por meio do CD, foi observado que o aumento da concentração da α -sin presente na amostra levou a proteína a apresentar, majoritariamente, maior quantidade de α -hélices em sua estrutura, com base na presença de sinais negativos na região de 222 nm e 208 nm, correspondentes a esse tipo de estrutura secundária (Figura 12A). Por outro lado, nas concentrações mais baixas, principalmente na faixa de 0,5 e 1,0 mg/mL, o sinal majoritário foi uma banda negativa em torno de 195-200 nm, sinal característico de proteínas desestruturadas (Figura 12A). Para confirmar essa mudança de conteúdo de estrutura secundária concentração-dependente, foi utilizado o *software CONTIN* disponível pelo sistema *DichroWeb*. Esse *software* se baseia na combinação de diferentes espectros referentes a proteínas com estrutura já determinada por métodos cristalográficos ou por ressonância magnética nuclear (RMN), que ao se alinharem ao espectro da proteína de interesse, determinam o conteúdo de cada tipo de estrutura secundária dentro do intervalo de 100%.

Os valores mostrados na Figura 12A mostram que o aumento da concentração a α -sin faz com que a proteína passe de $\sim 50\%$ da sua estrutura desordenada para valores de até 10%, enquanto o conteúdo de α -hélice aumenta em uma proporção correspondente, passando de valores $\sim 15\%$ para até $\sim 60\%$ do conteúdo total de estrutura secundária da α -sin. O conteúdo de folhas- β e “*loops*” permanece inalterado em todas as condições.

Já os experimentos de DLS mostraram, que independente da concentração de α -sin, o raio hidrodinâmico da amostra não se altera consideravelmente em nenhuma das situações analisadas, variando em um intervalo de 2,94 a 3,70 nm (Figura 12B), todas apresentando picos monodispersos indicando boa homogeneidade estrutural (Figura 12B). Dessa forma, mesmo ocorrendo a mudança da estrutura secundária da α -sin devido ao aumento de concentração, o

seu estado oligomérico permanece inalterado, apresentando características biofísicas comparáveis à valores obtidos característicos da α -sin monomérica em solução já demonstrados em outros trabalhos (LOWE et al., 2009; NATH et al., 2011). Para confirmar se o raio hidrodinâmico da α -sin, avaliado pelo DLS correspondia ao valor esperado para a proteína em estado monomérico, as amostras nas concentrações de 0,5 e 5,0 mg/mL foram submetidas a análise de SEC-MALS. Através da análise dos picos obtidos durante o método cromatográfico, foi determinada a massa de 15,32 kDa para a amostra de α -sin à 0,5 mg/mL e 14,62 kDa para a condição de 5,0 mg/mL, sendo os raios determinados de 4,06 nm e 4,16 nm, respectivamente, valores correspondentes ao estado monomérico da proteína (Figura 12C).

Com isso, nas condições observadas *in vitro*, apesar da estrutura secundária da α -sin se alterar devido ao aumento da concentração da proteína em solução este evento não é acompanhado pela agregação da mesma.

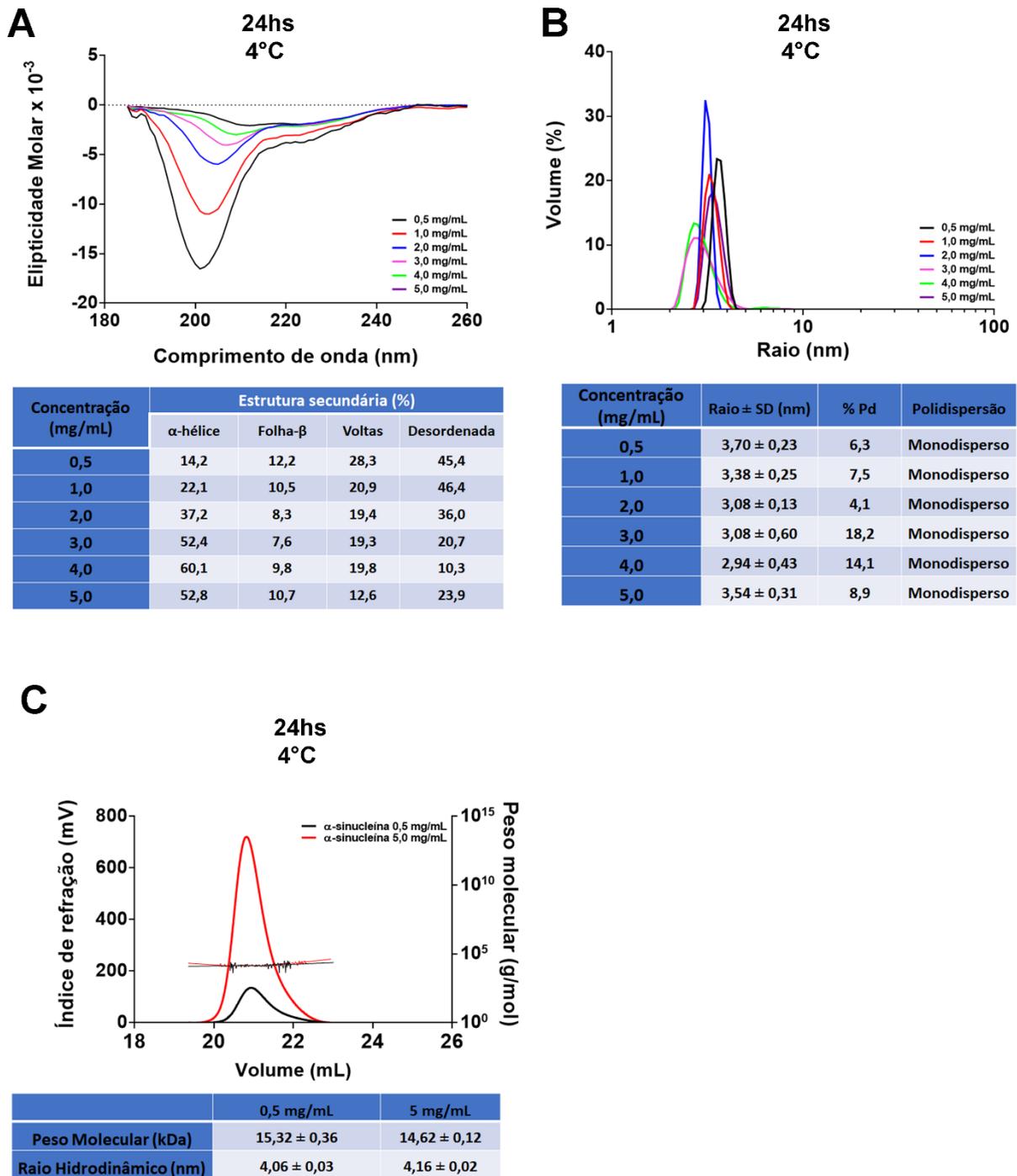


Figura 12. Análises biofísicas da α -sin *in vitro* indicam mudança de estrutura secundária dependente de concentração, mas sem alteração de seu estado oligomérico. A) CD da α -sin nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg/mL após incubação por 24 h à 4°C. Espectros foram deconvoluídos pelo *software* CONTIN sendo os dados obtidos presentes na tabela B) DLS da α -sin nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg/mL após incubação por 24 h à 4°C. Tabela contendo os valores de raio hidrodinâmico e polidispersão das condições analisadas C) SEC-MALS da α -sin nas concentrações de 0,5 e 5,0 mg/mL. Tabela contendo os valores de massa molecular e raio hidrodinâmico obtidos após tratamento dos dados.

Com base no comportamento da α -sin em diferentes concentrações avaliado anteriormente, foram selecionadas as concentrações de 0,5 mg/mL e 5,0 mg/mL para os experimentos seguintes. Para avaliar se distintas concentrações de Ca^{2+} poderiam influenciar na composição da estrutura secundária e/ou estado de oligomerização/agregação da proteína, as amostras foram incubadas por 24 ou 48 h a 4°C na presença de diferentes concentrações de Ca^{2+} (200, 400, 600, 800 e 1000 μM), selecionadas com base em Nath e colaboradores (2011). Após esse período, os ensaios de CD e DLS foram realizados para determinar se a adição do íon ocasionava comportamentos diferentes dos observados quando as amostras contendo a α -sin na ausência de Ca^{2+} foram analisadas.

Os espectros de CD obtidos, tanto após o período de 24 h ou 48 h de incubação, e independente da concentração de Ca^{2+} utilizada, mostraram amostras com comportamento semelhante ao observado nas amostras incubadas na ausência de Ca^{2+} . O aparecimento de banda negativa na região de 195 – 200 nm revelaram que todas as condições apresentaram o mesmo perfil, constituído em proteína majoritariamente desestruturada. (Figura 13A e 13D). De forma semelhante, as amostras na concentração de 5,0 mg/mL de α -sin incubadas na presença de Ca^{2+} tiveram, também, o mesmo padrão observado anteriormente (Figura 12), com todas as condições revelando um alto conteúdo de α -hélice (sinal negativo na região 222 nm e 208 nm) (Figura 13A e 13D). Já os ensaios de DLS mostraram que para as amostras contendo α -sin à 0,5 mg/mL incubadas por 24 h na presença de concentrações de Ca^{2+} , variando entre 0 μM – 600 μM Ca^{2+} , o raio hidrodinâmico das amostras apresentou valor no intervalo de 1,11 a 1,47 nm, enquanto nas condições de 800 μM e 1 mM de Ca^{2+} os valores de raio se aproximaram dos observados nas condições de α -sin à 5,0 mg/mL, sendo 2,56 nm e 3,38 nm, respectivamente (Figura 13B e 13C). No período de 48 h de incubação, ainda na concentração de 0,5 mg/mL α -sin, os valores de raio hidrodinâmico apresentaram certa discrepância, variando de 2,81 a 4,45 nm. Por outro lado, as condições contendo maior concentração de α -sin (5 mg/mL) tiveram resultados homogêneos e correlatos entre si, para ambos os tempos de incubação, no qual todos os valores de raio hidrodinâmico obtidos foram no intervalo de 3,08 a 3,54 nm (Figura 13E e 13F). Dessa forma, na condição de alta concentração de α -sin (5,0 mg/mL), o Ca^{2+} não teve influência no estado oligomérico da proteína, já que os valores de raio hidrodinâmico da amostra não apresentaram alteração relevante. Para as medidas com 0,5 mg/mL de α -sin, os dados obtidos são inconclusivos com relação ao papel do íon no processo de agregação da proteína, já que não obtivemos um padrão de aumento de raio hidrodinâmico em concordância com a aumento da concentração do Ca^{2+} . Um fator que pode ter contribuído para isso é a

concentração de 0,5 mg/mL estar próxima do limite inferior de detecção do equipamento utilizado (0,2 mg/mL para proteínas com ~15 kDa), fazendo com que a relação sinal/ruído das medidas em questão apresentassem valores baixos nessas condições.

Dito isso, com esses dados concluímos que o Ca^{2+} adicionado ao meio, independente da concentração, teve pouca ou nenhuma interferência significativa na estruturação secundária da α -sin *in vitro*.

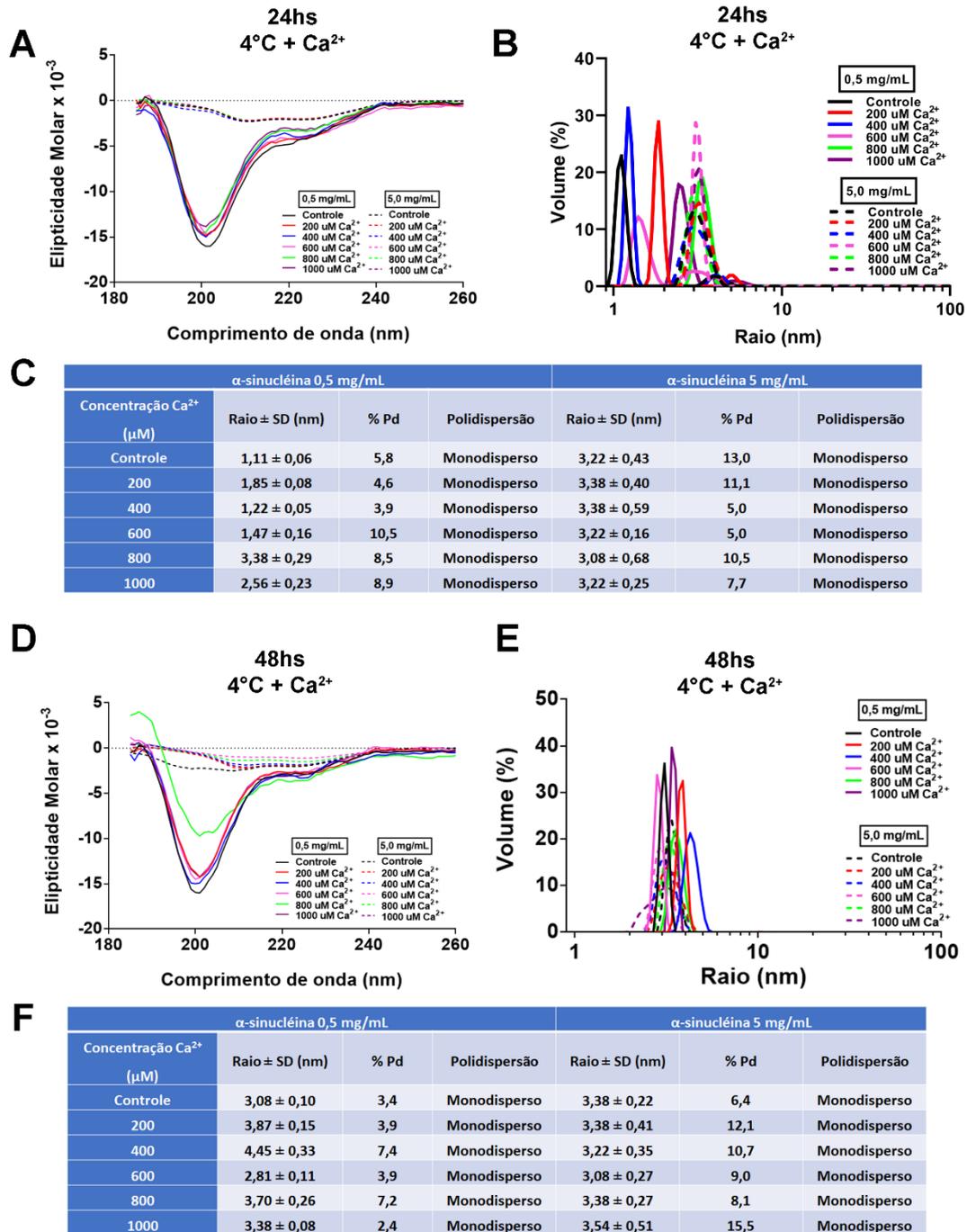


Figura 13. Análises biofísicas da α -sin *in vitro* na presença de Ca^{2+} indicam que o íon não influencia na estrutura secundária e estado oligomérico da proteína. A) CD da α -sin nas concentrações de 0,5 e 5,0 mg/mL após incubação por 24 h à 4°C na presença de 200, 400, 600, 800 e 1000 μM de Ca^{2+} . B) DLS da α -sin nas concentrações de 0,5 e 5,0 mg/mL após incubação por 24 h à 4°C na presença de 200, 400, 600, 800 e 1000 μM de Ca^{2+} . C) Tabela contendo os valores de raio hidrodinâmico e polidispersão das condições analisadas em (B). D) CD da α -sin nas concentrações de 0,5 e 5,0 mg/mL após incubação por 48 h à 4°C na presença de 200, 400, 600, 800 e 1000 μM de Ca^{2+} . E) DLS da α -sin nas concentrações de 0,5 e 5,0 mg/mL após incubação por 48 h à 4°C na presença de 200, 400, 600, 800 e 1000 μM de Ca^{2+} . F) Tabela contendo os valores de raio hidrodinâmico e polidispersão das condições analisadas em (E).

Uma vez que os experimentos à 4°C não mostraram diferença significativa no comportamento da proteína na presença ou não de Ca²⁺, as mesmas análises e condições foram testadas na temperatura 37°C de maneira a se chegar mais próximo da temperatura fisiológica. Inicialmente, foram realizados os experimentos apenas na presença de diferentes concentrações de α -sin para averiguar se a mudança de temperatura levaria a uma diferença dos resultados de CD e DLS observados nas mesmas condições à 4°C. Para as condições em que havia apenas a variação da concentração de α -sin (0,5 a 5,0 mg/mL), os resultados de CD foram semelhantes aos observados à 4°C, nos quais baixas concentrações de α -sin mostram a proteína majoritariamente desestruturada enquanto em altas concentrações ocorre predominância de estruturas α -hélices (Figura 14A). Os raios hidrodinâmicos observados para a α -sin, mensurados por DLS, também seguiram o mesmo padrão em comparação a incubação a 4°C, (2,81 a 3,38 nm), sendo todos os picos monodispersos, o que sugere homogeneidade da população de α -sin presente na amostra, tendo certa dispersão apenas nas condições de 0,5 mg/mL com adição de 200 e 800 μ M de Ca²⁺ (Figura 14B) pelos mesmos motivos sugeridos anteriormente (Figura 13B).

Quando repetimos estas análises na presença de Ca²⁺ (concentrações variando entre 200 μ M e 1 mM), os mesmos padrões foram observados. A α -sin a 0,5 mg/mL na ausência ou presença de diferentes concentrações do íon e a 37°C continuou sendo majoritariamente desestruturada, enquanto nas mesmas condições a 5,0 mg/mL de proteína a α -sin apresenta maior conteúdo de α -hélice em sua estrutura (Figura 14C). O mesmo ocorre para as análises de DLS: em baixa concentração da proteína, os valores obtidos variaram de 1,77 a 3,53 nm, enquanto para a concentração de α -sin 5mg/mL, os resultados foram mais uma vez mais coesos e semelhantes aos observados anteriormente, seguindo o intervalo de 3,08 a 3,70 nm (Figura 14D e 14E). Em síntese, pode-se aferir que, *in vitro*, o Ca²⁺ não tem papel direto na mudança estrutural da α -sin, diferentemente do observado em células SH-SY5Y.

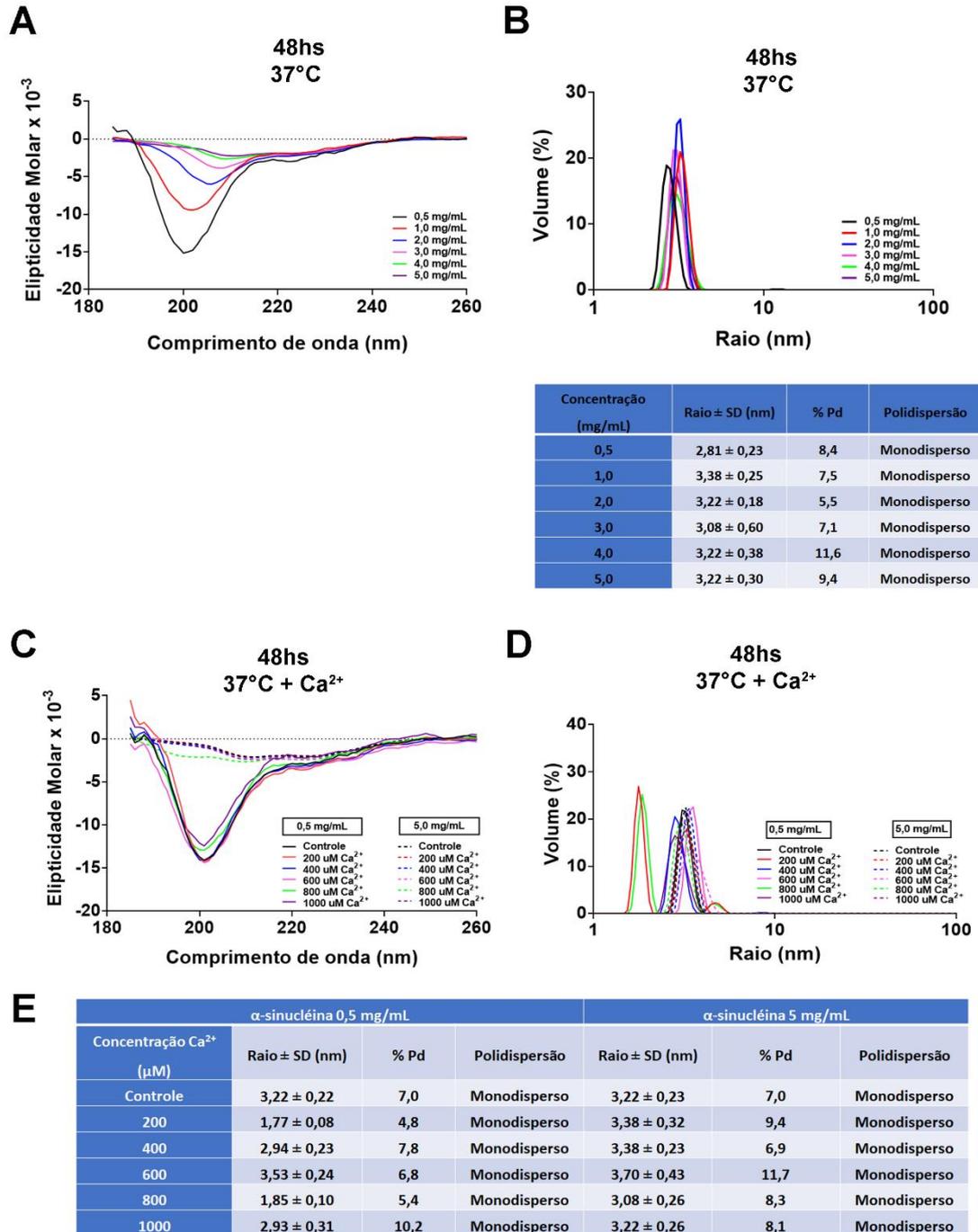


Figura 14. Análises biofísicas da α -sin *in vitro* em condições de temperatura semelhantes à fisiológica indicam mudança de estrutura secundária dependente de concentração, mas sem alteração de seu estado oligomérico na presença ou ausência de Ca²⁺. A) CD da α -sin nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg/mL após incubação por 48 h à 37°C. B) DLS da α -sin nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg/mL após incubação por 48 h à 37°C. Tabela contendo os valores de raio hidrodinâmico e polidispersão das condições analisadas. C) CD da α -sin nas concentrações de 0,5 e 5,0 mg/mL após incubação por 48 h à 37°C na presença de 200, 400, 600, 800 e 1000 μ M de Ca²⁺. D) DLS da α -sin nas concentrações de 0,5 e 5,0 mg/mL após incubação por 48 h à 37°C na presença de 200, 400, 600, 800 e 1000 μ M de Ca²⁺. F) Tabela contendo os valores de raio hidrodinâmico e polidispersão das condições analisadas em (D).

De posse desses dados, concluímos que o fenômeno ainda a ser explorado seria a diferença estrutural observada com o aumento gradativo da concentração da α -sin, ou seja, a passagem de uma proteína majoritariamente desestruturada para uma conformação com maior quantidade de α -hélices. Com relação a isso, é descrito que a α -sin monomérica ocorre em duas conformações dentro da célula: desestruturada solúvel no citosol e, quando em contato com a membrana plasmática, α -helicoidal. Tal mudança de estrutura secundária ocorre devido a interação dessa proteína com regiões hidrofóbicas da membrana o que leva a exposição de resíduos hidrofóbicos da proteína (ELIEZER et al., 2001; UVERSKY et al., 2002). Baseados nisso, para averiguarmos se o aumento da concentração da proteína na presença ou ausência de Ca^{2+} poderia levar a exposição destes resíduos hidrofóbicos *in vitro*, utilizamos a sonda 1,8-ANS, que ao se ligar em regiões hidrofóbicas emite fluorescência. Os resultados obtidos durante 15 h de leitura mostram que tanto a condição com 1 mM de Ca^{2+} , quanto a que o íon estava ausente, e independentemente da concentração da proteína utilizada, não houve alteração na intensidade da fluorescência do ANS, indicando que não ocorreu exposição de resíduos hidrofóbicos na amostra (Figura 15A e B). No entanto, é interessante observar que, pelos valores de fluorescência do 1,8-ANS a 500 nm, a α -sin na concentração de 0,5 mg/mL apresenta 10.000 unidades de absorbância abaixo do que na condição com 5,0 mg/mL de proteína, indicando que a maior concentração de α -sin leva à maior exposição de superfícies hidrofóbicas.

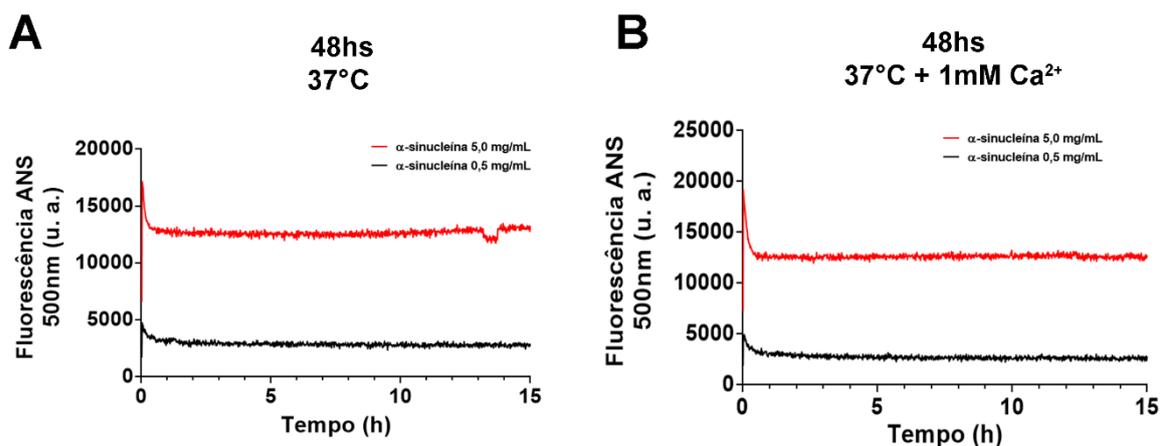


Figura 15. Altas concentrações de α -sin *in vitro* leva à exposição de superfícies hidrofóbicas. A) Fluorescência do 1,8-ANS à 37°C em amostras contendo α -sin a 0,5 e 5,0 mg/mL na ausência de Ca^{2+} . B) Fluorescência do 1,8-ANS à 37°C em amostras contendo α -sin a 0,5 e 5,0 mg/mL na presença de 1 mM de Ca^{2+} . As análises foram realizadas durante 15h consecutivas.

4.4. O Ca^{2+} promove a co-localização da α -sin e Rab8a em células SH-SY5Y

Estudos publicados já evidenciaram, que em determinados modelos de DP existe uma relação direta entre α -sin e Rab8a, em casos de superexpressão de ambas as proteínas ou por mudanças pós-traducionais da α -sin, dentre elas, a fosforilação da Ser129 e seu estado de agregação (GITLER et al., 2008; YIN et al., 2014a). Além disso, já foi demonstrado que a superexpressão de Rab8a mediada por vírus e direcionada para uma região cerebral específica foi capaz de resgatar a toxicidade nigroestriatal mediada por α -sin em um modelo de murino de parkinsonismo (MCFARLAND et al., 2018). Visto que o aumento na concentração citoplasmática de Ca^{2+} gerou alteração na organização e distribuição da α -sin em nosso modelo celular (Figura 10), objetivamos observar se a elevada concentração de Ca^{2+} no citosol das células SH-SY5Y poderiam, também, levar à co-localização entre a α -sin e a Rab8a. Para isso, células SH-SY5Y foram transfectadas com os constructos pEGFP-N2-SNCA e pCDNA5-mCherry-RAB8A. Após a expressão das proteínas recombinantes, as células receberam estímulo de KCl 50 mM, gerando despolarização de membrana e consequente influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular, por 24 e 48 h. Como pode ser observado na Figura 16A, células GFP/mCherry positivas não estimuladas continham α -sin dispersa por todo citosol. Com relação a Rab8a, esta proteína se encontrou dispersa pelo citoplasma, mas também em alguns grânulos ao redor do núcleo. Ao sobrepor os canais, é possível observar pouca co-localização da Rab8a-mCherry com α -sin-GFP, sugerindo que nessa situação basal há um baixo nível de interação entre essas proteínas. No entanto, após 24 h de estímulo com KCl 50 mM, a α -sin-GFP apresentou certa agregação em grânulos citoplasmáticos, porém grande parte da proteína ainda estava dispersa pelo restante da célula. Já para a Rab8a-mCherry nessas condições, os grânulos contendo esta proteína se mantiveram, porém, ao sobrepor as imagens, observamos a co-localização dos grânulos GFP-positivos com os grânulos mCherry-positivos (Figura 16A, painel do meio). Por fim, o grupo que recebeu tratamento por 48 h teve drástica mudança na localização das proteínas ali expressas, apresentando grande co-localização da α -sin-GFP com Rab8a sugerindo que o aumento na concentração de Ca^{2+} por períodos prolongados induz a interação da Rab8a com a α -sin no citoplasma celular.

De forma a quantificar esses padrões observados, ao analisar as imagens obtidas foi possível determinar que o número de grânulos de α -sin dentro das células passou de próximo de 0, na situação controle, para uma média de ~ 10 grânulos por célula no tratamento com KCl 50 mM por 24 h. Já na condição de 48 h, as células passaram a apresentar um valor médio de ~ 5 grânulos citoplasmáticos (Figura 16B). Com base nesses resultados, o possível mecanismo

de interação entre as duas proteínas aparenta se iniciar quando ocorre o influxo de Ca^{2+} para o citoplasma e pequenos pontos de nucleação de α -sin-GFP começam a surgir, de forma que a Rab8a tende a se co-localizar nessas regiões iniciais. Com o passar do tratamento, esses pequenos grânulos sofrem aumento de tamanho, até o momento que praticamente passam a ser únicos dentro da célula, contendo praticamente todo o conteúdo de ambas as proteínas (Figura 16A e 16B). Essa última observação pode ser justificada baseada no fato de que ~80% dos grânulos observados durante os dois períodos de tratamentos mostrarem a co-localização de α -sin e Rab8a (Figura 16C).

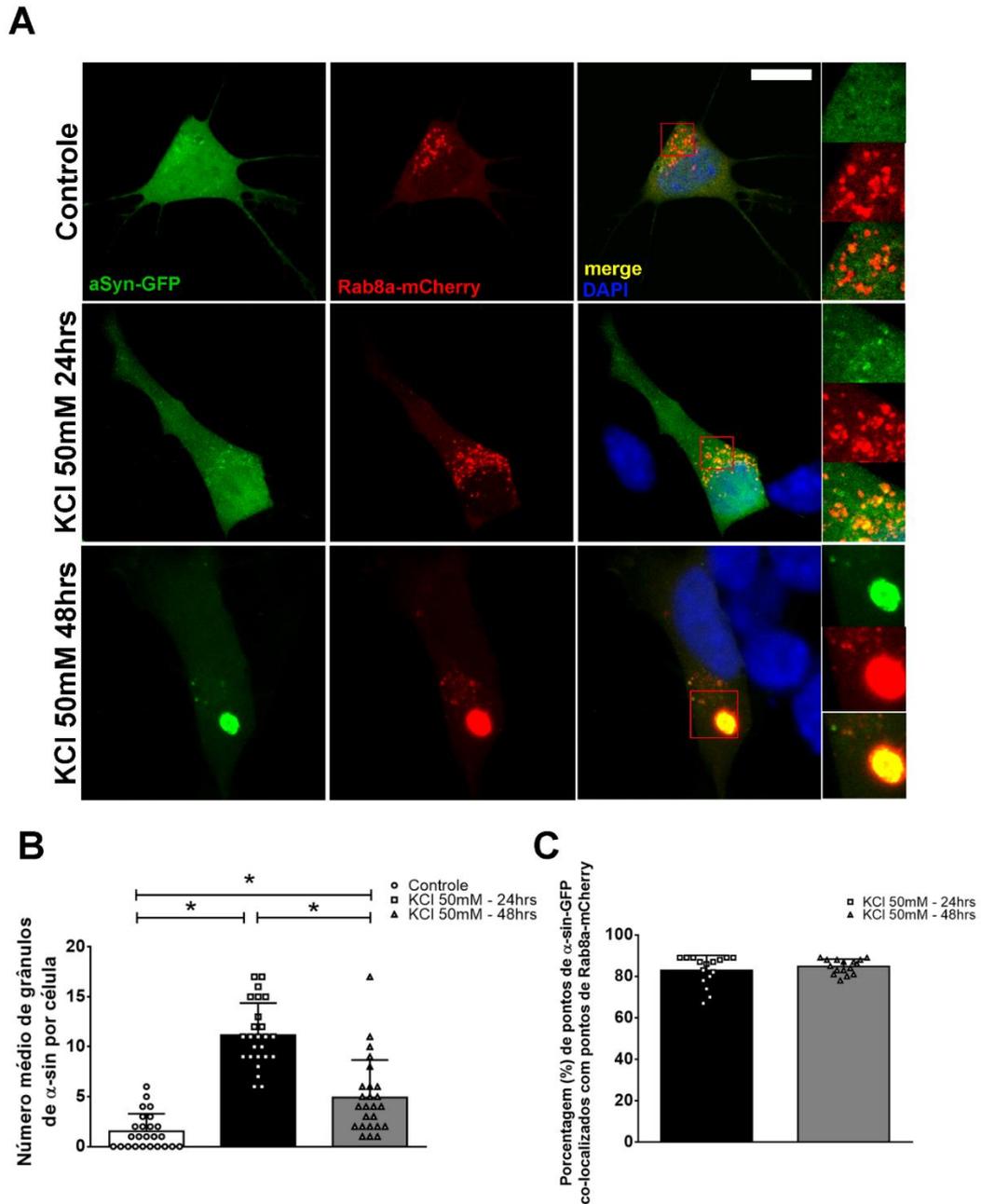


Figura 16. O aumento dos níveis de Ca^{2+} em células SH-SY5Y leva a agregação da α -sin e promove sua co-localização com a Rab8a. A) Microscopia confocal representativa de células SH-SY5Y transfectadas com pEGFP-N2-SNCA expressando α -sin-GFP (sinal verde) e pCDNA5-mCherry-RAB8A (sinal vermelho) mostrando grupo controle e tratamento de 24 h e 48 h com solução de 50 mM de KCl, no qual o tratamento faz com que a α -sin se agregue no decorrer do tempo e sofra co-localização com Rab8a. Os núcleos foram corados com DAPI (sinal azul). B) Quantificação do número de grânulos de C presente em cada célula em cada um dos grupos observados. (As barras de erro indicam a média \pm erro padrão da média; n = pelo menos 25 células para cada grupo, * $p < 0,05$ por teste *t* de Student não-pareado). C) Quantificação da porcentagem de grânulos de α -sin-GFP que estavam co-localizados com grânulos de Rab8a-mCherry nas condições de tratamento de 24 h e 48 h. (As barras de erro indicam a média \pm erro padrão da média; n = pelo menos 25 células para cada grupo, * $p < 0,05$ por teste *t* de Student não-pareado).

4.5. A presença de Ca^{2+} aumenta a interação entre α -sin e Rab8a *in vitro*

Ainda baseado nas evidências já publicadas citadas e nos resultados obtidos apresentados na Figura 16, foi averiguado se o comportamento da α -sin junto a Rab8a *in vitro* condiz com o observado nas células SH-SY5Y. Para isso, para o ensaio de *pull-down* realizado produzimos a Rab8a recombinante utilizando *E. coli* cepa Rosetta2 transformada com a construção pET28a-TEV-RAB8A e expressão induzida com IPTG. O sobrenadante obtido após a lise das células foi submetido a cromatografia de afinidade ao metal, especificamente ao Ni^{2+} , já que a construção da Rab8a continha His-Tag em sua porção N-terminal. Após todo conteúdo do lisado ser injetado na coluna, iniciou-se o processo de eluição com o aumento gradativo da concentração de imidazol, molécula essa capaz de competir com a His-Tag para se ligar a coluna de purificação (HEALTHCARE, 2016). No momento em que detectamos aumento do sinal de UV o gradiente foi mantido nessa concentração de imidazol até que todo conteúdo fosse eluído, onde a Rab8a teve eluição em uma concentração de ~150 mM de imidazol (Figura 17A).

Após análise por SDS-PAGE, a Rab8a obtida nessa primeira etapa cromatográfica foi submetida a cromatografia de exclusão molecular, tendo volume de retenção ~68 mL em coluna SUPERDEX 75 16/60 (Figura 17B). Ao final do processo de purificação foi obtida a Rab8a recombinante com grau de pureza acima de 90% e em concentração de ~1,3 mg/mL. Isso pode ser confirmado através da análise por SDS-PAGE de todas as etapas de purificação (Figura 17C).

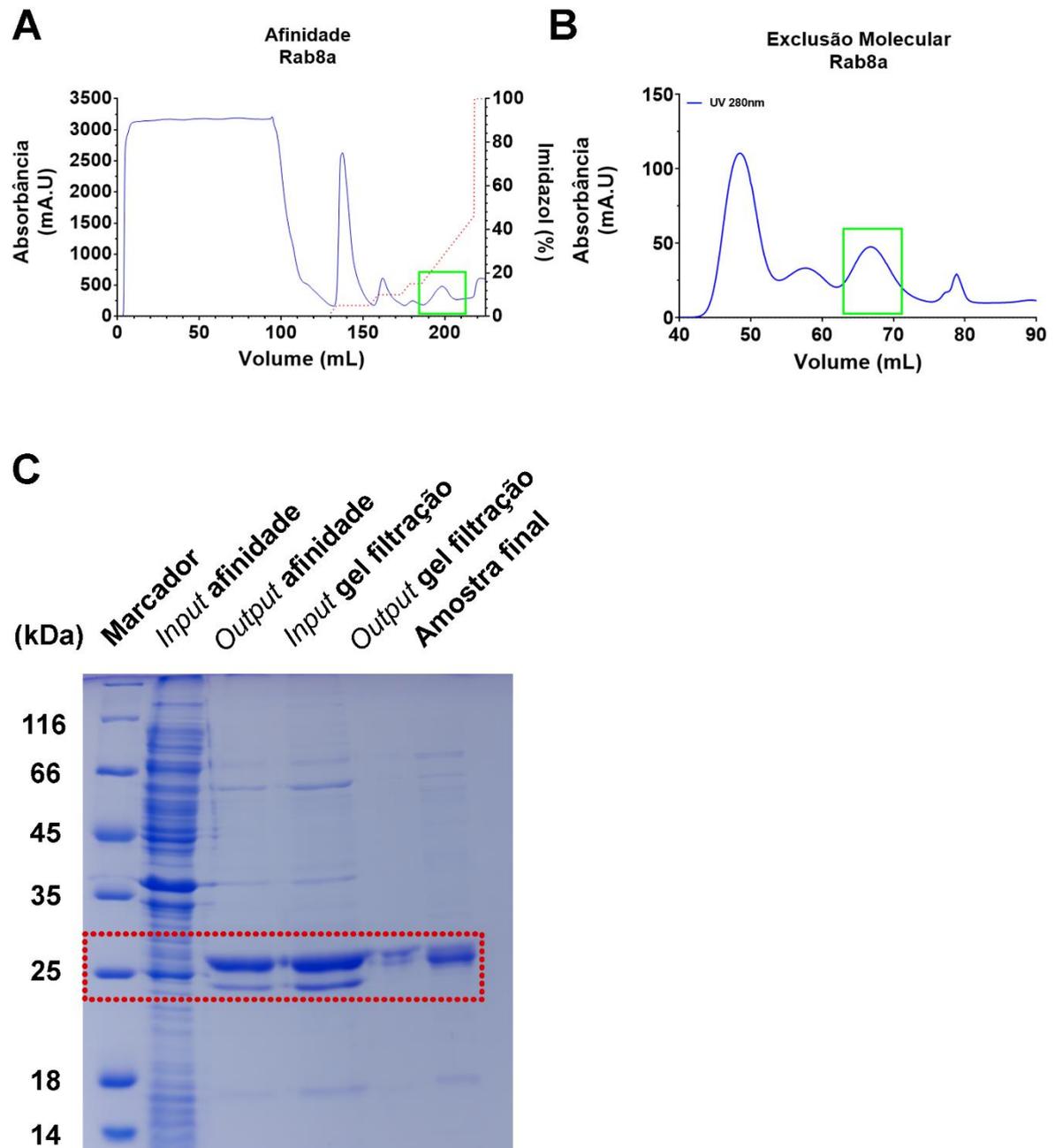


Figura 17. Purificação da Rab8a recombinante. A) Cromatograma resultante após cromatografia de afinidade ao Ni^{2+} da fração solúvel do lisado de bactérias contendo a Rab8a recombinante. Pico destacado em verde corresponde à eluição da proteína (sinal de UV 280 nm representada em azul e sinal da % de imidazol representado em vermelho tracejado). B) Cromatograma resultante após cromatografia de exclusão molecular das frações coletadas no pico destacado em A (sinal de UV 280 nm representada em azul). C) SDS-PAGE 13% representativo durante todas as etapas de purificação.

Com a Rab8a recombinante purificada, foi possível realizar o ensaio de *pull-down* junto a α -sin a fim de averiguar a interação de ambas as proteínas na presença de Ca^{2+} . Inicialmente foi observado qual o comportamento de ambas as proteínas isoladas com relação a sua interação com a resina TALON usada no experimento. Como esperado, a α -sin, por não possuir nenhuma *tag*, não apresentou interação com a resina já que as bandas referentes a proteína ocorrem apenas majoritariamente na canaleta do *flow-through* (FT) e outra parte, em quantidade menor, na canaleta da primeira lavagem (L1) (Figura 18A). Dessa maneira, qualquer sinal referente a α -sin nas canaletas de eluição (E) se deve a sua possível interação com a Rab8a. Por outro lado, o controle referente a Rab8a mostrou que a His-tag presente na construção da proteína permite que a mesma tenha interação com a resina, já que a maior parte da proteína colocada inicialmente no sistema se desliga na coluna apenas na canaleta E, após adição de imidazol no sistema (Figura 18A).

Com relação as condições de interação entre α -sin e Rab8a avaliadas, é possível observar que tanto a condição 1 (α -sin + Rab8a), quanto a condição 2 (α -sin + Rab8a + Ca^{2+} 1 mM), após 2h30min de incubação resultou no aparecimento de banda na região próxima ao marcador de 15 kDa, indicando a presença de α -sin nas canaletas referente a eluição (Figura 18B painéis da esquerda). Isso indica que em condições basais e na presença de Ca^{2+} ambas as proteínas tendem a se interagir *in vitro*. Porém, ao analisar a intensidade das bandas de α -sin obtidas em cada situação, é possível observar que a interação ocorre de maneira mais intensa na presença de Ca^{2+} (Figura 18C). Essas observações vão de encontro com o observado nos resultados da Figura 16A e 16B, que correspondem as condições basais e na presença de Ca^{2+} no interior das células. É necessário ressaltar os sinais observados nas canaletas FT, L1 e L4 possuem diferença, comparadas entre as condições 1 e 2, sendo isso provavelmente devido à influência da agitação mecânica que o sistema sofreu durante a execução do experimento.

Já nas condições de incubação na presença de GDP, os resultados obtidos foram diferentes dos analisados até o momento. É descrito que na presença desse nucleotídeo a Rab8a se torna inativa, impedindo sua interação com seus parceiros de interação (STENMARK, 2009). Sendo assim, nas condições 3 (α -sin + Rab8a + GDP 1 mM) e 4 (α -sin + Rab8a + GDP 1 mM + Ca^{2+} 1 mM) não foi possível observar sinal referente a α -sin, demonstrando que a interação foi bloqueada nessas situações devido a inatividade da proteína (Figura 18B painéis da direita). Por meio das análises densitométricas foi visto que os sinais na região de 15 kDa de ambas essas condições foram as menores em relação as duas primeiras observadas (Figura 18C). Assim, é possível dizer que há uma interação direta entre as proteínas, sendo que o Ca^{2+} tende

a intensificar esse processo. Porém, para que isso ocorra, a Rab8a necessita estar em seu estado ativado, livre de GDP.

Com esses resultados, concluímos a interação da α -sin com a Rab8a é intensificada na presença de Ca^{2+} e somente ocorre quando a Rab8a se encontra em seu estado ativado. No entanto, se este evento é um mecanismo protetor ou neurotóxico ao longo do desenvolvimento da DP ainda precisa ser investigado.

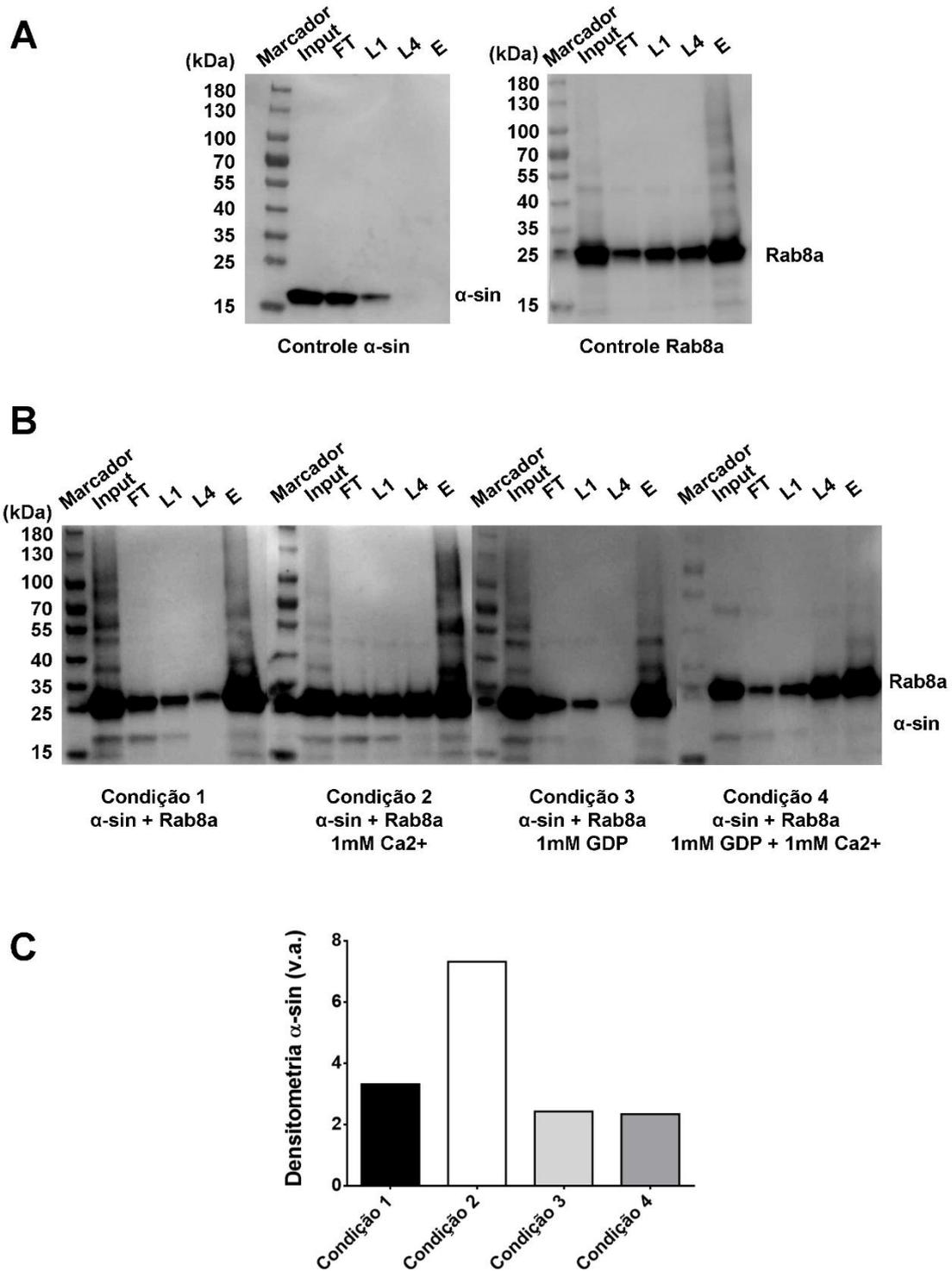


Figura 18. A α -sin e Rab8a interagem em condições basais e na presença de Ca^{2+} enquanto a presença de GDP impede esse mecanismo. A) Western blotting das proteínas α -sin e Rab8a purificadas e isoladas submetidas ao ensaio de *pull-down* (FT: *flow-through*; L1: lavagem 1; L4: lavagem 4; E: eluição). B) Western blotting das condições 1 (α -sin + Rab8a), 2 (α -sin + Rab8a + Ca^{2+} 1 mM), 3 (α -sin + Rab8a + GDP 1 mM) e 4 (α -sin + Rab8a + Ca^{2+} 1 mM + GDP 1 mM) submetidas ao ensaio de *pull-down* (FT: *flow-through*; L1: lavagem 1; L4: lavagem 4; E: eluição). C) Análise densitométrica qualitativa das bandas referente a α -sin observadas em (B) nas canaletas E.

5. DISCUSSÃO

Apesar de casos genéticos serem bastante conhecidos e responsáveis por cerca de 10% dos casos, a DP é majoritariamente representada por casos esporádicos, sendo a exposição a fatores ambientais um dos fatores-chave que podem levar a indução do mau funcionamento e agregação de proteínas relacionadas a doença, como ocorre com a α -sin (BRAAK et al., 2003; PERFEITO; REGO, 2012). Além disso, é descrito que a quebra do equilíbrio da concentração de metais no interior das células é um evento importante no desenvolvimento de diversas doenças neurológicas, como por exemplo, o desbalanço da homeostase de Ca^{2+} (MATTSON, 2007; SURMEIER; GUZMAN; SANCHEZ-PADILLA, 2010). Tratando-se da α -sin, a quebra do fino equilíbrio relacionado com o controle das concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} em neurônios dopaminérgicos vem se tornando um campo de intensa investigação já que a porção C-terminal desta proteína possui alta afinidade ao Ca^{2+} , sendo isso não somente necessário para seu correto funcionamento nos mecanismo regulatórios do transporte de vesículas, mas também um possível mecanismo de indução da agregação da proteína em casos patológicos (NIELSEN et al., 2001).

Dentro de uma célula a concentração média de Ca^{2+} reportada é próxima a 100 nM, mas, especificamente nos terminais pré-sinápticos, local onde ocorre a liberação das vesículas sinápticas e com maior ocorrência de α -sin, esses níveis de Ca^{2+} podem chegar até 200 μM após a despolarização da célula (LAUTENSCHLÄGER et al., 2018). Estudos realizados por Nath et al., 2011, em células neuronais humanas da linhagem 1321N1 transfectadas com α -sin mostram que o tratamento com tapsigargina e calcimicina, compostos que aumentam os níveis intracelulares de Ca^{2+} nas células, promovem o aparecimento de agregados de α -sin após 12 e 24 h de tratamento com esses compostos. Este evento também pode ser observado em nossos resultados realizados em células SH-SY5Y (Figura 10), que após serem despolarizadas com KCl, apresentaram a agregação da α -sin devido ao aumento dos níveis de Ca^{2+} no ambiente intracelular.

Para melhor entendimento do impacto do Ca^{2+} à nível estrutural da α -sin, foram realizados estudos biofísicos da proteína *in vitro* em ambientes químicos com concentrações análogas do cátion. Nossos dados obtidos mostraram que apenas alterações na concentração de α -sin é suficiente para induzir modificações na estrutura secundária da proteína, a qual passou de uma estrutura desordenada, quando em baixas concentrações, para uma proteína majoritariamente rica em α -hélices, quando em concentrações maiores (Figura 12). Mecanismos análogos a esse foram observados apenas em situações em que ocorreu adição de

solventes orgânicos como óxido de trimetilamida (TMAO) e fluoroálcoois como TFE e HFiP, em que foi possível observar alterações na conformação da α -sin com o aumento do conteúdo desses solventes (UVERSKY et al., 2002).

Outra estrutura majoritariamente rica em α -hélices de α -sin é a ocorrência do seu tetrâmero, estrutura reportada por Bartels et al., 2011, que foi isolada de hemácias. No entanto, nossos dados obtidos por SEC-MALS indicaram que independente da concentração da α -sin no meio, a proteína recombinante somente se apresentou em conformação monomérica, descartando a hipótese de que em altas concentrações em solução a α -sin poderia se rearranjar em um tetrâmero. Reforçando esta ideia, as medidas obtidas dos raios hidrodinâmicos medidos para as amostras nas diferentes concentrações de proteína, sendo todos dentro do intervalo 2,94 nm à 3,70 nm, vão de encontro com os valores reportados em ensaios de microscopia eletrônica utilizando a α -sin monomérica (LOWE et al., 2009; NATH et al., 2011).

Um mecanismo já observado e responsável pela alteração da conformação da α -sin monomérica desestruturada para a sua forma monomérica rica em α -hélices, é a sua interação com lipídios da membrana plasmática das células (LASHUEL et al., 2013). Como exemplo, alguns trabalhos mostraram que a adição de pequenos lipídios em solução ou mesmo a imobilização da α -sin em superfícies hidrofóbicas conferiam a proteína mudanças estruturais semelhantes devido a maior exposição de seus resíduos hidrofóbicos para que fosse possível a interação direta com a bicamada lipídica (AFITSKA et al., 2019; BARTELS; CHOI; SELKOE, 2011; FAUVET et al., 2012). Por conta disso, os ensaios realizados observando a fluorescência do 1,8-ANS (Figura 15) indicaram que na condição de maior concentração de α -sin ocorre maior exposição de espécies hidrofóbicas em solução. Isso se deve ao maior número de moléculas em solução e maior exposição de resíduos hidrofóbicos nessa situação gerando microambientes mais lipofílicos que fazem com que os monômeros em solução adquiram estrutura majoritária de α -hélice.

A partir desses resultados, considerados linha de base para o entendimento do comportamento da α -sin *in vitro*, foi averiguado quais as mudanças estruturais o Ca^{2+} causaria na proteína para que a mesma se agregasse, como mostrado nos experimentos em células. De forma curiosa, os ensaios biofísicos realizados em todas as condições em que houve a adição de Ca^{2+} , sendo da menor concentração utilizada (200 μM) até a máxima (1 mM), mostraram que o comportamento da proteína *in vitro* não seguiu o mesmo padrão observado de agregação (Figura 13 e 14). Em todos os casos, independente da temperatura e tempo de incubação com o cátion, todas as amostras em menor concentração (0,5 mg/mL) continuaram a ser

majoritariamente desestruturadas e monoméricas, enquanto as amostras de 5,0 mg/mL da proteína, continuaram a ter maior composição de α -hélices e organizada em monômeros. Esses dados, foram de certa forma divergentes com os que estão descritos em outros trabalhos, já que em situações em que o ambiente químico apresentava apenas 180 μM de Ca^{2+} , Nath et al., 2011 descreveram por microscopia eletrônica, a formação de estruturas esféricas de α -sin com raio de 5 à 10 nm, ou até mesmo formas anelares da proteína que chegavam a ter raios de 35 à 45 nm, tamanhos esses superiores aos obtidos em nossos resultados. Assim, avaliando os dados fica evidente que a construção da α -sin recombinante e as condições testadas neste trabalho, não mostraram influência do Ca^{2+} *in vitro*, de forma que o mecanismo de agregação visto nas células pode ser dependente de outros fatores além da participação do Ca^{2+} para que a resposta posterior seja a agregação da α -sin. Por exemplo, um trabalho publicado por Dufty et al., 2007, descreve a atuação da proteína dependente de Ca^{2+} , calpaína, envolvida no mecanismo de clivagem da α -sin, como sendo responsável pela formação de fragmentos de α -sin, os quais são os possíveis responsáveis por sua agregação intracelular. Desta forma, apesar de não termos observado alterações na estrutura da proteína *in vitro* na presença de Ca^{2+} , não podemos descartar os resultados observados em células. Por si só, essa interferência sobre o funcionamento da α -sin por conta da quebra da homeostase de Ca^{2+} já pode ser considerado um fator grave para o desenvolvimento da DP devido a tendência de agregação da proteína. Além disso, é relatado que estes agregados de α -sin, além de tóxicos para a célula, podem interromper o correto mecanismo de funcionamento das Rab's, causando problemas relacionados ao transporte de vesículas no interior das células.

A respeito dessa hipótese, Gitler et al., 2008 demonstraram por meio de ensaios *cell-free* que a superexpressão e/ou mal enovelamento da α -sin foi capaz de inibir o transporte de vesículas do RE até o CG, o que geraria prejuízos ao funcionamento celular. No entanto, evidências obtidas por ensaios de imunofluorescência constataram que tanto a Rab8a quanto a Rab3a tendiam a se co-localizar nas regiões em a α -sin estava agregada e tinham um papel protetor perante a toxicidade gerada pelos agregados dessa espécie proteica. Tendo essa informação em vista, por meio dos ensaios com células SH-SY5Y transfectadas com α -sin e Rab8a (Figura 16), observamos que após o tratamento com KCl, que induziu a agregação de α -sin, a distribuição de Rab8a no citoplasma tende a se concentrar na mesma região em que os agregados de α -sin ocorrem, demonstrando que o Ca^{2+} intensifica esse processo (Figura 16).

Esse aumento da interação α -sin-Rab8a também foi observado nas condições analisadas *in vitro* com as proteínas recombinantes. O ensaio de *pull-down* analisado por

Western blotting (Figura 17), confirmou que na presença de ambas as proteínas a interação ocorre de maneira basal, porém nas condições em que há a presença de concentrações elevadas de Ca^{2+} e a Rab8a encontra-se ativada (livre de GDP), esse processo tende a se intensificar. Um único relato anterior confere esse fenômeno devido a fosforilação da Ser129 da α -sin. No entanto, em nossas condições *in vitro*, mostramos que esta fosforilação não é crucial para essa interação uma vez que utilizamos apenas proteínas sem modificações pós-traducionais (YIN et al., 2014b). Porém, como já é descrito que o Ca^{2+} interage com a α -sin na região C-terminal, região onde se encontra o resíduo Ser129, talvez o mecanismo de ligação nesse caso possa ocorrer de forma análoga.

Baseado nessas informações, é evidente a relação entre os três componentes estudados aqui: α -sin, Rab8a e Ca^{2+} . Nossos resultados reforçam que a desregulação na interação α -sin-Rab8a mediada por Ca^{2+} é um mecanismo que pode levar ao desenvolvimento da DP devido a formação de agregados de α -sin e aprisionamento da Rab8a, gerando danos a fisiologia celular. E entender os fatores que levam as células a sofrerem a deficiência em normalizarem seus níveis de Ca^{2+} após estímulo e compreender a dinâmica que ocorre nessas situações de estresse, proporcionarão o desenvolvimento de novas terapias e/ou medicamentos que atuem nessas vias e permitam que esse quadro seja reversível ou, até mesmo, bloqueado.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstra que a homeostase do Ca^{2+} no interior das células neuronais é um evento intimamente relacionado com o estado agregacional da α -sin no citoplasma celular e regula a interação desta proteína com a Rab8a GTPase. Desta maneira, esperamos que estes dados ajudem a elucidar um dos possíveis mecanismos celulares e moleculares envolvidos na DP esporádica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUNIT, S. et al. Tunneling nanotubes spread fibrillar α -synuclein by intercellular trafficking of lysosomes. **The EMBO Journal**, v. 35, n. 19, p. 2120–2138, 2016.
- AFITSKA, K. et al. α -Synuclein aggregation at low concentrations. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1867, n. 7–8, p. 701–709, 2019.
- BAHADIR, O. Ion-Exchange Chromatography and Its Applications. **Column Chromatography**, 2013.
- BALDERESCHI, M. et al. Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: two-fold higher incidence in men. ILSA Working Group. Italian Longitudinal Study on Aging. **Neurology**, v. 55, n. 9, p. 1358–63, 2000.
- BARBOSA, M. T. et al. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: A community-based survey in Brazil (the Bambuí Study). **Movement Disorders**, v. 21, n. 6, p. 800–808, 2006.
- BARTELS, Tim (Ed.). **Alpha-Synuclein: Methods and Protocols**. Hertfordshire: Humana Press, 2019.
- BARTELS, T.; CHOI, J. G.; SELKOE, D. J. α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. **Nature**, v. 477, n. 7362, p. 107–111, 2011.
- BELLUCCI, A. et al. Parkinson's disease: From synaptic loss to connectome dysfunction. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 42, n. 1, p. 77–94, 2016.
- BENBA, A.; ABDELILAH, A.; HAMMOUCH, A. A review of the assessment methods of voice disorders in the context of Parkinson's disease. **Journal of Telecommunication, Electronic and Computer Engineering**, v. 8, n. 9, p. 103–112, 2016.
- BENDOR, J. T.; LOGAN, T. P.; EDWARDS, R. H. The function of α -synuclein. **Neuron**, v. 79, n. 6, p. 1044–1066, 2013.
- BLEIMLING, N. et al. Chaperone-assisted production of active human Rab8A GTPase in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 65, n. 2, p. 190–195, 2009.
- BOTELHO, H. M. et al. Metal ions modulate the folding and stability of the tumor suppressor protein S100A2. **FEBS Journal**, v. 276, n. 6, p. 1776–1786, 2009.
- BRAAK, H. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease.

Neurobiology of Aging, v. 24, n. 2, p. 197–211, 2003.

BURRÉ, J. et al. α -Synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. **Science**, v. 329, n. 5999, p. 1663–1667, 2010.

BURRÉ, J. et al. Properties of native brain α -synuclein. **Nature**, v. 498, n. 7453, p. 1–6, 2013.

BUTLER, B.; SAMBO, D.; KHOSHBOUEI, H. Alpha-synuclein modulates dopamine neurotransmission. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 83–84, p. 41–49, 2017.

CHAN, C. S. et al. “Rejuvenation” protects neurons in mouse models of Parkinson’s disease. **Nature**, v. 447, n. 7148, p. 1081–1086, 2007.

CHIBA, K.; TREVOR, A. J.; CASTAGNOLI, N. Active uptake of MPP⁺, a metabolite of MPTP, by brain synaptosomes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 128, n. 3, p. 1228–1232, 1985.

COOPER, A. A. et al. α -synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson’s models. **Science**, v. 313, n. 5785, p. 324–328, 2006.

DA, B. et al. Mild cognitive impairment is related to Alzheimer disease pathology and cerebral infarctions . PubMed Commons. v. 3, p. 1–2, 2014.

DALFÓ, E.; FERRER, I. Early α -synuclein lipoxidation in neocortex in Lewy body diseases. **Neurobiology of Aging**, v. 29, n. 3, p. 408–417, 2008.

DARDEN, L. Mechanisms and models. **The Cambridge Companion to the Philosophy of Biology**, v. 39, p. 139–159, 2007.

DOLMETSCH, R. E. et al. Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel- calmodulin complex through the MAP kinase pathway. **Science**, v. 294, n. 5541, p. 333–339, out. 2001.

DORSEY, E. R. et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. **Neurology**, v. 68, n. 5, p. 384–386, 2007.

DUFTY, B. M. et al. Calpain-cleavage of α -synuclein: Connecting proteolytic processing to disease-linked aggregation. **American Journal of Pathology**, v. 170, n. 5, p. 1725–1738, 2007.

ELIEZER, D. et al. Conformational properties of α -synuclein in its free and lipid-associated states. **Journal of Molecular Biology**, v. 307, n. 4, p. 1061–1073, 2001.

FARRER, M. J. Genetics of Parkinson disease: Paradigm shifts and future prospects. **Nature**

Reviews Genetics, v. 7, n. 4, p. 306–318, 2006.

FAUVET, B. et al. α -Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and *Escherichia coli* exists predominantly as disordered monomer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 19, p. 15345–15364, 2012.

FEI, Q.; ETHELL, D. W. Maneb potentiates paraquat neurotoxicity by inducing key Bcl-2 family members. **Journal of Neurochemistry**, v. 105, n. 6, p. 2091–2097, 2008.

FOLLETT, J. et al. Potassium depolarization and raised calcium induces α -synuclein aggregates. **Neurotoxicity Research**, v. 23, n. 4, p. 378–392, 2013.

FRITZ, G. et al. Natural and amyloid self-assembly of S100 proteins: Structural basis of functional diversity. **FEBS Journal**, v. 277, n. 22, p. 4578–4590, 2010.

GABE LEE, M. T.; MISHRA, A.; LAMBRIGHT, D. G. Structural mechanisms for regulation of membrane traffic by Rab GTPases. **Traffic**, v. 10, n. 10, p. 1377–1389, 2009.

GHOSH, S.; KUNDU, A.; CHATTOPADHYAY, K. Small Molecules Attenuate the Interplay between Conformational Fluctuations, Early Oligomerization and Amyloidosis of Alpha Synuclein. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2018.

GITLER, A. D. et al. The Parkinson's disease protein α -synuclein disrupts cellular Rab homeostasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 1, p. 145–150, 2008.

GOODWIN, J. et al. Raised calcium and oxidative stress cooperatively promote α -synuclein aggregate formation. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 5, p. 703–711, 2013.

GORELL, J. M. et al. Occupational exposures to metals as risk factors for Parkinson's disease. **Neurology**, v. 48, n. 3, p. 650–658, 1997.

GROSSHANS, B. L.; ORTIZ, D.; NOVICK, P. Rabs and their effectors: Achieving specificity in membrane traffic. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 32, p. 11821–11827, 2006.

GUO, Z. et al. Intermediates in the guanine nucleotide exchange reaction of Rab8 protein catalyzed by guanine nucleotide exchange factors Rabin8 and GRAB. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 45, p. 32466–32474, 2013.

HEALTHCARE, G. E. Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing: Principles and

Methods. **GE HealthCare Handbooks**, p. 170, 2016.

JAVITCH, J. A. et al. Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: Uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 7, p. 2173–2177, 1985.

JAVOY, F. et al. Specificity of dopaminergic neuronal degeneration induced by intracerebral injection of 6-hydroxydopamine in the nigrostriatal dopamine system. **Brain Research**, v. 102, n. 2, p. 201–215, 1976.

JOST, W. H.; REICHMANN, H. “An essay on the shaking palsy” 200 years old. **Journal of Neural Transmission**, v. 124, n. 8, p. 899–900, 2017.

LASHUEL, H. A. et al. The many faces of α -synuclein: From structure and toxicity to therapeutic target. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 1, p. 38–48, 2013.

LAUTENSCHLÄGER, J. et al. C-terminal calcium binding of α -synuclein modulates synaptic vesicle interaction. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.

LLINÁS, R.; SUGIMORI, M.; SILVER, R. B. Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. **Science**, v. 256, n. 5057, p. 677–679, 1992.

LOTHARIUS, J.; BRUNDIN, P. Pathogenesis of parkinson’s disease: Dopamine, vesicles and α -synuclein. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 12, p. 932–942, 2002.

LOWE, R. et al. Calcium(II) selectively induces α -synuclein annular oligomers via interaction with the C-terminal domain. **Protein Science**, v. 13, n. 12, p. 3245–3252, 2009.

LUK, K. C. et al. PNAS-2009-Luk-20051-6.pdf. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 47, p. 20051–20056, 2009.

LUK, K. C. et al. Intracerebral inoculation of pathological α -synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative α -synucleinopathy in mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 5, p. 975–988, 2012.

LUTH, E. S. et al. Soluble, prefibrillar α -synuclein oligomers promote complex I-dependent, Ca²⁺-induced mitochondrial dysfunction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 31, p. 21490–21507, 2014.

MAROTEAUX, L.; CAMPANELLI, J. T.; SCHELLER, R. H. Synuclein: A neuron-specific

- protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. **Journal of Neuroscience**, v. 8, n. 8, p. 2804–2815, 1988.
- MATTSON, M. R. Calcium and neurodegeneration. **Aging Cell**, v. 6, n. 3, p. 337–350, 2007.
- MCFARLAND, N. et al. Rab8a protects against alpha-synuclein toxicity in a rat model of Parkinsonism (P3.049). **Neurology**, v. 90, n. 15 Supplement, p. P3.049, 10 abr. 2018.
- MELACHROINO, K. et al. Deregulation of calcium homeostasis mediates secreted α -synuclein-induced neurotoxicity. **Neurobiology of Aging**, v. 34, n. 12, p. 2853–2865, 2013.
- MERGLER, D.; BALDWIN, M. Early manifestations of manganese neurotoxicity in humans: An update. **Environmental Research**, v. 73, n. 1–2, p. 92–100, 1997.
- MIRONOV, S. L. α -Synuclein forms non-selective cation channels and stimulates ATP-sensitive potassium channels in hippocampal neurons. **Journal of Physiology**, v. 593, n. 1, p. 145–159, 2015.
- MODI, P. et al. Understanding Pathophysiology of Sporadic Parkinson's Disease in Drosophila Model: Potential Opportunities and Notable Limitations. **Challenges in Parkinson's Disease**, 2016.
- NATH, S. et al. Raised calcium promotes α -synuclein aggregate formation. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 46, n. 2, p. 516–526, 2011.
- NIELSEN, M. S. et al. Ca^{2+} Binding to α -Synuclein Regulates Ligand Binding and Oligomerization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 25, p. 22680–22684, 2001.
- NONAKA, T. et al. Seeded aggregation and toxicity of α -synuclein and tau: Cellular models of neurodegenerative diseases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 45, p. 34885–34898, 2010.
- PEDRO AMORIM NETO, D. et al. Commensal Gut Bacterium *Akkermansia Muciniphila* Secretome Induces Mitochondrial Calcium Overload and α -Synuclein Aggregation in Enteroendocrine Cells. p. 1–44, 2021.
- PEREIRA-LEAL, J. B.; SEABRA, M. C. Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 313, n. 4, p. 889–901, 2001.
- PERFEITO, R.; REGO, A. C. Papel da Alfa Sinucleína e da disfunção mitocondrial associada a DP. **Rev Neurocienc**, v. 20, n. 2, p. 273–284, 2012.

- PFEFFER, S. R. Structural clues to rab GTPase functional diversity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 16, p. 15485–15488, 2005.
- POUNTNEY, D. L.; VOELCKER, N. H.; GAI, W. P. Annular alpha-synuclein oligomers are potentially toxic agents in alpha-synucleinopathy. Hypothesis. **Neurotoxicity Research**, v. 7, n. 1–2, p. 59–67, 2005.
- R, R.; NEUROGLIA, E. M.; HARBOR, C. S. Intracellular calcium dependence of transmitter release rates. **Nature**, v. 406, n. August, p. 889–893, 2000.
- RCOM-H'CHEO-GAUTHIER, A.; GOODWIN, J.; POUNTNEY, D. L. Interactions between calcium and alpha-synuclein in neurodegeneration. **Biomolecules**, v. 4, n. 3, p. 795–811, 2014.
- RCOM-H'CHEO-GAUTHIER, A. N. et al. Calcium: Alpha-synuclein interactions in alpha-synucleinopathies. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, n. DEC, p. 1–8, 2016.
- RIENECKER, K. D. A.; POSTON, R. G.; SAHA, R. N. Merits and Limitations of Studying Neuronal Depolarization-Dependent Processes Using Elevated External Potassium. **ASN Neuro**, v. 12, nov. 2020.
- SHIMIZU, K. et al. Carrier-mediated processes in blood-brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. **Brain Research**, v. 906, n. 1–2, p. 135–142, 2001.
- SINGH, A. et al. Nimodipine, an L-type calcium channel blocker attenuates mitochondrial dysfunctions to protect against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonism in mice. **Neurochemistry International**, v. 99, p. 221–232, 2016.
- STENMARK, H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 8, p. 513–525, 2009.
- SURMEIER, D. J.; GUZMAN, J. N.; SANCHEZ-PADILLA, J. Calcium, cellular aging, and selective neuronal vulnerability in Parkinson's disease. **Cell Calcium**, v. 47, n. 2, p. 175–182, 2010.
- TOTTERDELL, S.; HANGER, D.; MEREDITH, G. E. The ultrastructural distribution of alpha-synuclein-like protein in normal mouse brain. **Brain Research**, v. 1004, n. 1–2, p. 61–72, 2004.
- TYSNES, O. B.; STORSTEIN, A. Epidemiology of Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 124, n. 8, p. 901–905, 2017.

UVERSKY, V. N. et al. Biophysical properties of the synucleins and their propensities to fibrillate: Inhibition of α -synuclein assembly by β - and γ -synucleins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 14, p. 11970–11978, 2002.

VARGAS, K. J.; CHANDRA, S. S. Synucleins☆. **Reference Module in Biomedical Sciences**, n. September, p. 1–6, 2014.

XICOY, H.; WIERINGA, B.; MARTENS, G. J. M. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. **Molecular Neurodegeneration**, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2017.

XIE, H. R.; HU, L. SEN; LI, G. Y. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: In vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. **Chinese Medical Journal**, v. 123, n. 8, p. 1086–1092, 2010.

YIN, G. et al. α -Synuclein interacts with the switch region of Rab8a in a Ser129 phosphorylation-dependent manner. **Neurobiology of Disease**, v. 70, p. 149–161, 2014a.

YIN, G. et al. α -Synuclein interacts with the switch region of Rab8a in a Ser129 phosphorylation-dependent manner. **Neurobiology of Disease**, v. 70, p. 149–161, 2014b.

ZERIAL, M.; MCBRIDE, H. Rab proteins as membrane organizers. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 2, p. 107–117, 2001.

ZHANG, J. et al. Manganese ethylene-bis-dithiocarbamate and selective dopaminergic neurodegeneration in rat: A link through mitochondrial dysfunction. **Journal of Neurochemistry**, v. 84, n. 2, p. 336–346, 2003.

8. ATIVIDADES ACADÊMICAS

8.1. Artigos publicados

- 1) RODRIGUES, P. V.; TOSTES, K. ; BOSQUE, B. P. ; **GODOY, J. V. P.** ; AMORIM NETO, D. P. ; DIAS, C. S. B. ; FONSECA, M. C. . **illuminating the Brain With X-Rays: Contributions and Future Perspectives of High-Resolution Microtomography to Neuroscience**. *Frontiers in Neuroscience*, v. 15, p. 1-13, 2021.

- 2) DE CASTRO FONSECA, M. ; DE OLIVEIRA, J. F. ; ARAUJO, B. H. S. ; CANATELI, C. ; DO PRADO, P. F. V. ; AMORIM NETO, D. P. ; BOSQUE, B. P. ; RODRIGUES, P. V. ; **DE GODOY, J. V. P.** ; TOSTES, K. ; FILHO, H. V. R. ; NASCIMENTO, A. F. Z. ; SAITO, A. ; TONOLI, C. C. C. ; BATISTA, F. A. H. ; DE OLIVEIRA, P. S. L. ; FIGUEIRA, A. C. ; SOUZA DA COSTA, S. ; KREPISCHI, A. C. V. ; ROSENBERG, C. ; WESTFAHL, H. ; DA SILVA, A. J. R. ; FRANCHINI, K. G. . **Molecular and cellular basis of hyperassembly and protein aggregation driven by a rare pathogenic mutation in DDX3X**. *iScience*, v. 24, p. 102841, 2021.

8.2. Artigos submetidos para publicação

- 1) AMORIM NETO, D. P., BOSQUE, B.P., **GODOY, J.V.P.**, RODRIGUES, P.V., MENESES, D. D.; TOSTES, K., TONOLI, C.C.C., GONZÁLEZ-BILLAULT, C., FONSECA, M.C. **Mitochondrial calcium overload induced by the commensal gut bacterium *Akkermansia muciniphila* secretome leads to α -synuclein aggregation in enteroendocrine cells**. *iScience*. 2021 (submetido).

- 2) RODRIGUES, P.V., **GODOY, J.V.P.**, BOSQUE, B.P., AMORIM NETO, D.P., TOSTES, K., PALAMETA, S., GARCIA-ROSA, S., TONOLI, C.C.C., FONSECA, M.C. **Transcellular propagation of fibrillar α -synuclein from enteroendocrine to neuronal cells requires cell-to-cell contact and is Rab35-dependent**. *npj Parkinson's Disease*. 2021 (submetido).

8.3. Participação em eventos

- 3rd Industrial Biotechnology and Synthetic Biology Workshop (IBSB). 2021.

8.4. Resumos publicados em anais de congresso

- 1) Amorim Neto, D. P. ; Bosque, B. P. ; **Godoy, J. V. P.** ; Rodrigues, P. V. ; Toste, K. ; Fonseca, M. C. . Akkermansia Muciniphila Secretome Promotes Mitochondrial Stress And ASynuclein Aggregation In Enteroendocrine Cells: Hallmarks Of Parkinsons Disease Outside The Brain. 2021. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
- 2) Bosque, B. P. ; Amorim Neto, D. P. ; **Godoy, J. V. P.** ; Rodrigues, P. V. ; Toste, K.; Fonseca, M. C. . Selective toxicity of 6-hydroxydopamine towards dopaminergic cells is independent of LRRK2 activation. 2021. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
- 3) Rodrigues, P. V.; **Godoy, J. V. P.** ; Amorim Neto, D. P. ; Bosque, B. P. ; Toste, K. ; Fonseca, M. C. . Cellular Transfer Of AlphaSynuclein Pre-Formed Fibrils From Gut To Neurons Depends On Cell-Cell Contact. 2021. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

9. ANEXOS

Uso exclusivo da CIBio:

Número de projeto / processo: 2020-05

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa com OGMs para análise da CIBio - CNPEM

1. Título do projeto: Mecanismos celulares e moleculares do Parkinson Idiopático

2. Pesquisador responsável: Matheus de Castro Fonseca

3. Experimentador(es):

Matheus de Castro Fonseca, Celisa Caldana Tonoli, Dionísio Pedro Amorim Neto, Paula Vieira Rodrigues, Katiane Tostes, Beatriz Pelegrini Bosque, João Victor Pereira Godoy

Nível do treinamento do experimentador: [KT]-Iniciação científica, [CCT, DPAN, BPB, JVPJ] -mestrado, [PVR]-doutorado, []-doutorado direto, [MCF]-pós-doutorado, []-nível técnico, []-outro, especifique

4. Unidade operativa: [] LNLS [] LNNano [] LNBR [x] LNBio

5. Maior Classe de risco de OGM deste projeto: [x] Risco I [] Risco II [] Risco III [] Risco IV

6. O projeto é confidencial? [X] não [] sim

7. No caso de projeto confidencial, o título do projeto pode constar em lista aberta no CNPEM? [] não [X] sim

8. Qual é o objetivo do projeto? O objetivo do projeto consiste em estudar mecanismos de Parkinson idiopático em nível celular. Utilizaremos proteínas recombinantes e estudos envolvendo microscopia para verificar localização de marcadores e inferir sinalizações.

9. Informe um número e nome para cada OGM, organismo receptor, organismo doador, o transgene e classe de risco do OGM.

(1) pEGFP ha-sinucleína, células de mamífero, *E.coli* DH5alpha, pEGFP ha-sinucleína, classe 1(2) pet21b ha-sinucleína, *E.coli* DH5alpha, *E.coli* DH5alpha, pet21b ha-sinucleína, classe 1(3)pEGFP-Parvalbumin-MTS, células de mamífero, *E.coli* DH5alpha, pEGFP-Parvalbumin-MTS, classe 1

10. Descreva brevemente a função dos transgenes de cada OGM:

(1) a-sinucleína: exocitose de vesículas sinápticas em células neuronais.

(2) Parvalbumin-MTS: tamponante de cálcio mitocondrial

11. Algum OGM produz proteína tóxica, oncogênica ou pode gerar produtos deletérios para saúde humana, animal ou meio ambiente? Não

12. Algum OGM é agente patogênico esporulante? [X] Não [] Sim: _____

13. Algum OGM é agente patogênico e pode se propagar pelo ar? [X] Não [] Sim : _____

14. Algum transgene confere infectividade ou patogenicidade para os OGMs? Descreva

Não

15. Com relação aos cuidados preventivos associados a manipulação dos organismos, será necessária alguma avaliação médica periódica para experimentadores? [X] Não [] Sim. Que tipo de avaliação? (Ex: consulta com médico, exames laboratoriais etc...) Qual periodicidade? Onde será realizada esta avaliação?

16. Com relação aos cuidados preventivos associados a manipulação dos organismos, será necessária alguma vacinação preventiva para experimentadores? [X] Não [] Sim. Qual periodicidade? Onde será realizada esta vacinação?

17. No caso de uma eventual contaminação com organismos patogênicos ou toxinas, descreva medidas emergenciais para tratamento de pessoas envolvidas, descontaminação de equipamentos, instalações e meio ambiente.

Uso exclusivo da CIBio:

Número de projeto / processo: 2020-05

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa com OGMs para análise da CIBio - CNPEM

Por não se tratar de organismos patogênicos, esporulantes e com contenção controlada, as medidas a serem tomadas em casos emergenciais são as medidas gerais de contenção (isolamento da área para evitar alastramento), auxílio na descontaminação de equipamentos e pessoal e acionamento de Pessoal de Emergências do CNPEM.

18. Projetos que façam uso de organismos ou genes associados ao patrimônio genético brasileiro precisam de cadastro na plataforma SISGEN (www.sisgen.gov.br). É de total responsabilidade do pesquisador responsável esse cadastramento e cumprimento da legislação. O projeto envolve manipulação, transferência, modificação, armazenamento, coleta de Organismos e derivados relativos ao patrimônio genético brasileiro? () SIM, (X) Não. No caso de responder sim, mencionar a seguir quais os códigos de acesso do cadastro no SISGEN, caso já tenha realizado _____.

O pesquisador principal tem conhecimento de que conforme a RDC 50 de 21/02/2002 da Anvisa, é responsável por determinar a classificação de riscos de seu projeto, assim como determinar EPIs e medidas de segurança necessárias para prevenir a contaminação de experimentadores, equipamentos, instalações, terceiros e meio ambiente. O pesquisador responsável também precisará providenciar rotina para realização de exames médicos e laboratoriais para sua equipe, bem como vacinações quando aplicável. Todos os experimentadores envolvidos devem ser supervisionados pelo pesquisador principal, que é o responsável pelo treinamento de biossegurança adequado às suas necessidades para a manipulação, armazenamento, descarte e transporte de OGMs, atendendo a legislação e normativas preconizadas pela CTNBio, Anvisa e outros órgãos e agências regulamentadoras e fiscalizadoras.

A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia: 11/06/2020

Parecer final: [x]-projeto aprovado, []-projeto recusado, []-projeto com deficiências.

comentários da CIBio:

Marcio C. Bajgelman

Presidente da CIBio CNPEM
Marcio Chaim Bajgelman

Alberto Benedetti

Membro da CIBio CNPEM
Celso Eduardo Benedetti

Rafael Elias Marques

Membro da CIBio CNPEM
Rafael Elias Marques Pereira Silva

Douglas Galante

Membro da CIBio CNPEM
Douglas Galante

Juliana Velasco de Castro

Membro da CIBio CNPEM
Juliana Velasco de Castro Oliveira

Daniel Kolling

Membro da CIBio CNPEM
Daniel Kolling

Juliana Conceição Teodoro

Membro da CIBio CNPEM
Juliana Conceição Teodoro

Mateus Borba Cardoso

Membro da CIBio CNPEM
Mateus Borba Cardoso

Certificado de participação do evento 3rd Industrial Biotechnology and Synthetic Biology
Workshop (IBSB). 2021



Submissão do paper “Mitochondrial calcium overload induced by the commensal gut bacterium *Akkermansia muciniphila* secretome leads to α -synuclein aggregation in enteroendocrine cells”

iScience

Mitochondrial calcium overload induced by the commensal gut bacterium *Akkermansia muciniphila* secretome leads to α -synuclein aggregation in enteroendocrine cells
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	ISCIENCE-D-21-02967
Full Title:	Mitochondrial calcium overload induced by the commensal gut bacterium <i>Akkermansia muciniphila</i> secretome leads to α -synuclein aggregation in enteroendocrine cells
Article Type:	Research Article
Corresponding Author:	Matheus de Castro Fonseca, Ph.D. Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio); Brazilian Center for Research in Energy and Materials Campinas, São Paulo BRAZIL
First Author:	Dionisio Pedro Amorim Neto
Order of Authors:	Dionisio Pedro Amorim Neto Beatriz Pelegriini Bosque João Vitor Pereira de Godoy Paula Vieira Rodrigues Dario Donoso Meneses Katiene Tostes Celiza Caldana Costa Tonoli Christian González-Billault Matheus de Castro Fonseca, Ph.D.
Abstract:	The notion that the gut microbiota plays a role in neurodevelopment, behavior and outcome of neurodegenerative disorders is recently taking place. A number of studies have consistently reported a greater abundance of <i>Akkermansia muciniphila</i> in Parkinson's disease (PD) fecal samples. Nevertheless, a functional link between <i>A. muciniphila</i> and sporadic PD remained unexplored. Here, we investigated whether <i>A. muciniphila</i> conditioned medium could initiate the misfolding process of α -synuclein (α Syn) in enteroendocrine cells (EECs), which are part of the gut epithelium and possess many neuron-like properties. We found that <i>A. muciniphila</i> conditioned medium is directly modulated by mucin, induces intracellular calcium (Ca^{2+}) release, and causes increased mitochondrial Ca^{2+} uptake in EECs, which in turn leads to production of reactive oxygen species (ROS) and α Syn aggregation. Indeed, oral administration of <i>A. muciniphila</i> cultivated in the absence of mucin to aged mice also led to α Syn aggregation in cholecystokinin (CCK)-positive enteroendocrine cells. Noteworthy, buffering mitochondrial Ca^{2+} reverted all the damaging effects observed. Therefore, these molecular insights provided here offer evidence that bacterial proteins are capable of inducing α Syn aggregation in enteroendocrine cells.
Additional Information:	
Question	Response
Standardized datasets A list of datatypes considered standardized under Cell Press policy is available here . Does this manuscript report new standardized datasets?	No
Original code	No

Submissão do paper “Transcellular propagation of fibrillar α -synuclein from enteroendocrine to neuronal cells requires cell-to-cell contact and is Rab35-dependent”

manuscripttracking system		npj parkinson's disease
tracking system home	author instructions	reviewer instructions help logout journal home
Manuscript #	NPJPARKD-00970	
Current Revision #	1	
Other Version	NPJPARKD-00970PI	
Submission Date	30th Sep 21 07:14:16	
Current Stage	Manuscript Under Consideration	
Title	Transcellular propagation of fibrillar α -synuclein from enteroendocrine to neuronal cells requires cell-to-cell contact and is Rab35-dependent	
Running Head	Spreading of α -synuclein fibrils from EECs to neuronal cells	
Manuscript Type	Article	
Collections	N/A	
Word Count	Introduction, Methods, Results and Discussion - 6,773 words Total words of the Manuscript Word File - 10,260	
Corresponding Author	Dr Matheus Fonseca (matheus.fonseca@inbio.cnpem.br) (CNPEM)	
Contributing Authors	Ms Paula Rodrigues , Mr Joao Vitor de Godoy , Ms Beatriz Bosque , Mr Dionisio Pedro Neto , Ms Katiane Tostes , Dr Soledad Palameta , Dr Shella Garcia-Rosa , Ms Cellisa Tonoll	
Authorship	Yes	
Abstract	<p>Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative condition featured by motor dysfunction, death of midbrain dopaminergic neurons and accumulation of α-synuclein (αSyn) aggregates. Growing evidence suggests that PD diagnosis happens late in the disease progression and that the pathology may originate much earlier in the enteric nervous system (ENS) before advancing to the brain, via autonomic fibers. It was recently described that a specific cell type from the gut epithelium named enteroendocrine cells (EECs) possess many neuron-like properties including αSyn expression. By facing the gut lumen and being directly connected with αSyn-containing enteric neurons in a synaptic manner, EECs form a neural circuit between the gastrointestinal (GI) tract and the ENS, thereby being a possible key player in the outcome of PD in the gut. We have characterized the progression and the cellular mechanisms involved in αSyn pre-formed fibrils (PFFs) transfer from EECs to neuronal cells. We show that αSyn PFFs administered into the duodenal lumen of mice are promptly absorbed by the organ. In addition, in the enteroendocrine cell line STC-1 and in the neuronal cell line SH-SY5Y, αSyn PFFs induced intracellular calcium (Ca^{2+}) oscillations on an extracellular Ca^{2+} source-dependent manner and triggered αSyn fibrils internalization by endocytosis. We characterized the spread of αSyn PFFs from enteroendocrine to neuronal cells and showed that this process is dependent on physical cell-to-cell contact and on Rab35 GTPase. Lastly, inhibition of Rab35 increases the clearance of αSyn fibrils by redirecting them to the lysosomal compartment. Therefore, our results reveal mechanisms that contribute to the understanding of how seeded αSyn fibrils promote the progression of αSyn pathology from EECs to neuronal cells shifting the focus of PD etiology to the ENS.</p>	
Subject Terms	Biological sciences/Cell biology Biological sciences/Neuroscience/Cellular neuroscience	
Research Square author dashboard	I understand that my manuscript and associated personal data will be shared with Research Square for the delivery of the author dashboard.	
Competing interests policy	There is no conflict of interest.	
Clinical Trial	No	
Applicable Funding Source	CAPES;, CNPq;, FAPESP (2018/20014-0, 2019/24511-0). [Fonseca]	

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **A influência do Ca²⁺ na conformação estrutural da α -sinucleína e em sua interação com a Rab8a GTPase analisada por estudos biofísicos e celulares**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 14 de janeiro de 2022

Assinatura : João Vítor Pereira de Godoy
Nome do(a) autor(a): João Vítor Pereira de Godoy
RG n.º 44863221-4

Assinatura : Matheus de Castro Fonseca
Nome do(a) orientador(a): Matheus de Castro Fonseca
RG n.º 14427049



Illuminating the Brain With X-Rays: Contributions and Future Perspectives of High-Resolution Microtomography to Neuroscience

Paula Vieira Rodrigues^{1,2}, Katiane Tostes¹, Beatriz Pelegrini Bosque^{1,2}, João Vitor Pereira de Godoy^{1,2}, Dionisio Pedro Amorim Neto^{1,2}, Carlos Sato Baraldi Dias² and Matheus de Castro Fonseca^{1*}

¹ Brazilian Biosciences National Laboratory (LNB), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas, Brazil, ² Department of Structural and Functional Biology, State University of Campinas, Campinas, Brazil,

³ Brazilian Synchrotron Light National Laboratory (LNLS), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:
Julia Stephan,
Mind Research Network (MRN),
United States

Reviewed by:
Widor Vagh,
The University of Queensland,
Australia
Fahmoud Hydar,
Yale University, United States

***Correspondence:**
Matheus de Castro Fonseca
matheus.fonseca@lnb.br

Specialty section:
This article was submitted to
Brain Imaging Methods,
a section of the journal
Frontiers in Neuroscience

Received: 10 November 2020

Accepted: 26 February 2021

Published: 17 March 2021

Citation:
Rodrigues PV, Tostes K,
Bosque BP, Godoy JVP, Amorim
Neto DP, Dias CSB and Fonseca MC
(2021) Illuminating the Brain With
X-Rays: Contributions and Future
Perspectives of High-Resolution
Microtomography to Neuroscience.
Front. Neurosci. 15:627994.
doi: 10.3389/fnins.2021.627994

The assessment of three-dimensional (3D) brain cytoarchitecture at a cellular resolution remains a great challenge in the field of neuroscience and constant development of imaging techniques has become crucial, particularly when it comes to offering direct and clear obtention of data from macro to nano scales. Magnetic resonance imaging (MRI) and electron or optical microscopy, although valuable, still face some issues such as the lack of contrast and extensive sample preparation protocols. In this context, x-ray microtomography (μ CT) has become a promising non-destructive tool for imaging a broad range of samples, from dense materials to soft biological specimens. It is a new supplemental method to be explored for deciphering the cytoarchitecture and connectivity of the brain. This review aims to bring together published works using x-ray μ CT in neurobiology in order to discuss the achievements made so far and the future of this technique for neuroscience.

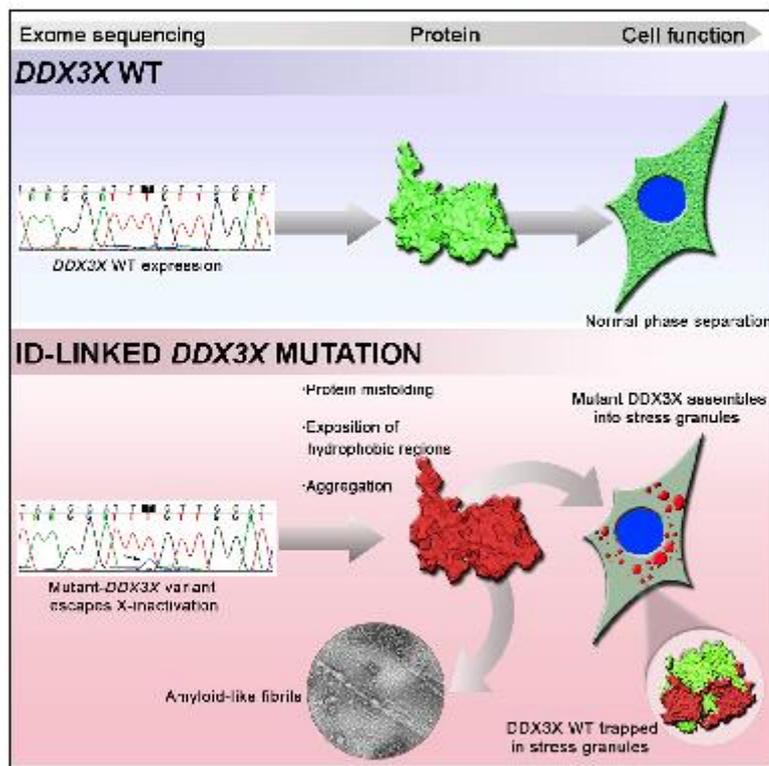
Keywords: x-ray microtomography, neurobiology, cell tracing, brain architecture, imaging techniques

INTRODUCTION

Back in the 1970s, the x-ray tomography technique (also known as “computerized axial tomography,” “transaxial tomography,” and “reconstruction from sections”) was first described as a method used in medical radiography for obtaining a slice through the body of the x-ray absorption with a resolution ranging from 1 to about 2 mm (Hounsfield, 1973; Swindell and Barrett, 1977). This achievement was recognized in the Nobel prize in Physiology or Medicine 1979 (Di Chiro and Brooks, 1979), and since then tomography has been widely used in medical radiology, biological, and material sciences research in order to produce non-invasive, diagnostic, and cross-sectional images of a particular structure within a sample. This technique was further expanded in 1987, when Flannery et al. (1987) developed a so-called “new form of microscopy – microtomography,” based on high-resolution x-ray tomography, producing the first three-dimensional (3D) images of the internal structure of small samples with a micrometer resolution. Microtomography (μ CT) can be used to non-destructively create 3D images of internal sections of a sample with a resolution limit comparable to that of a light microscope, allowing not only 3D visualization but also virtual slicing

Article

Molecular and cellular basis of hyperassembly and protein aggregation driven by a rare pathogenic mutation in DDX3X



Matheus de Castro Fonseca, Juliana Ferreira de Oliveira, Bruno Henrique Silva Araujo, ..., Harry Westfahl, Jr., Antônio José Roque da Silva, Kleber Gomes Franchini

matheus.fonseca@inbio.cnpq.br (M.d.C.F.)
kleber.franchini@inbio.cnpq.br (K.G.F.)

Highlights

DDX3X mutations skew X-inactivation and are found in 1-3% of unexplained ID in females

DDX3X mutant proteins assemble solid-like condensates and amyloid-like fibrils

Absent granules formed by *DDX3X* mutants sequester healthy *DDX3X* protein

ID-linked *DDX3X* L556S mutation decreases cell viability and induces apoptosis

de Castro Fonseca et al.,
Science 24, 102841
August 20, 2021 © 2021 The Author(s)
<https://doi.org/10.1016/j.jsci.2021.102841>

