

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**EDUARDO COELHO CERQUEIRA**

INTERAÇÃO ENTRE O PEPTÍDEO BETA-AMILÓIDE (25-35) E A PROTEÍNA ALFA-  
SINUCLEÍNA: IMPLICAÇÕES NA NEUROPATHOGÊNESE DA DOENÇA DE  
PARKINSON

RIO DE JANEIRO  
2012

Eduardo Coelho Cerqueira

INTERAÇÃO ENTRE O PEPTÍDEO BETA-AMILÓIDE (25-35) E A  
PROTEÍNA ALFA-SINUCLEÍNA: IMPLICAÇÕES NA  
NEUROPATHOGÊNESE DA DOENÇA DE PARKINSON

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de bacharel em Química.

Orientadores: Profa. Dra. Mônica S. Freitas  
Prof. Dr. Cristian Follmer

Rio de Janeiro  
2012

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, em especial, mãe (Marcia), avó (Wanda) e irmão (Leonardo), pelo auxílio financeiro e emocional desde meu nascimento. Vocês em especial compartilharam minhas conquistas e falhas e compreenderam minhas escolhas e minha dedicação aos estudos.

Aos meus amigos de faculdade, principalmente Danielly, Livia, Rafaela e Gabrielly por compartilharem diversos momentos memoráveis, desde acidentes explosivos em aulas práticas até a alegria das fotos de formatura.

Às minhas ex-companheiras de laboratório, Fernanda e Cristiane e aos atuais colegas de laboratório, pelo aprendizado, pela união e por proporcionarem momentos agradáveis de trabalho.

Aos meus orientadores, Cristian Follmer e Mônica Freitas, por me ensinarem tudo que eu precisei durante este projeto com toda paciência e dedicação.

## RESUMO

### PROJETO DE CURSO

TÍTULO: Interação entre o peptídeo  $\beta$ -amilóide (25-35) e a proteína  $\alpha$ -sinucleína: Implicações na neuropatogênese da Doença de Parkinson

ALUNO: Eduardo Coelho Cerqueira

ORIENTADORES: Mônica S. Freitas e Cristian Follmer

Muitas doenças neurodegenerativas estão diretamente relacionadas à formação de agregados proteicos tóxicos, como é o caso das doenças de Parkinson (PD) e Alzheimer (AD), associadas, respectivamente, a agregação da  $\alpha$ -sinucleína e do peptídeo  $\beta$ -amilóide. Em pacientes com Demência com Corpos de Lewy (DLB), doença que combina sintomas de AD e PD, observa-se a presença de  $\alpha$ -sinucleína em placas senis constituídas pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide, o que pode sugerir uma interação entre  $\beta$ -amilóide e  $\alpha$ -sinucleína. Estudos prévios mostram que o fragmento de  $\beta$ -amilóide 25-35 ( $A\beta_{25-35}$ ), altamente fibrilogênico e neurotóxico, é capaz de inibir a agregação de  $\alpha$ -sinucleína, além de aumentar a neurotoxicidade dos agregados formados. A proposta deste trabalho foi investigar os efeitos do peptídeo  $A\beta_{25-35}$  na cinética de formação de fibras de  $\alpha$ -sinucleína na ausência ou presença de agitação, bem como os mecanismos envolvidos na inibição da fibrilação. Além disso, os principais sítios de interação entre a  $\alpha$ -sinucleína e o  $A\beta_{25-35}$  foram investigados utilizando-se a técnica de ressonância magnética nuclear (RMN), através da correlação heteronuclear de quantum-simples. Em adição, os resultados obtidos com medidas de ligação a Tioflavina-T sugerem que o peptídeo  $\beta$ -amilóide interfere com a etapa de nucleação da cinética de formação de fibra, estendendo a fase “lag” da cinética de agregação, não modificando a etapa de alongamento da fibra. Bem como, os dados de microscopia de força atômica mostraram a presença de estrutura fibrilar além de agregados amorfos em presença do  $A\beta_{25-35}$ , o que pode explicar a menor ligação à Tioflavina-T observada no final da agregação. Além disso, dados de  $^1H^{15}N$ -HSQC sugerem que o peptídeo  $\beta$ -amilóide interage com não só com a  $\alpha$ -sinucleína monomérica e desenovelada, mas também com a proteína em meio contendo SDS, onde esta adquire estruturas em  $\alpha$ -hélice. No conjunto, nossos dados fornecem novos indícios moleculares da interação entre  $\beta$ -amilóide e a  $\alpha$ -sinucleína, podendo assim contribuir para uma maior compreensão acerca da patogênese da DLB.

Palavras-chave: neurodegeneração, Demência com corpos de Lewy, HSQC,  $\alpha$ -sinucleína,  $\beta$ -amilóide, fibrilação.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PD – Doença de Parkinson.  
AD – Doença de Alzheimer  
DLB – Demência com Corpos de Lewy  
A $\beta$  – peptídeo  $\beta$ -amilóide  
RMN- Ressonância Magnética Nuclear  
HSQC – *Heteronuclear Single-Quantum Correlation*  
AFM – Microscopia de Força Atômica  
APP – proteína precursora de amilóide  
NAC – componente não-amilóide  
SDS – Dodecil sulfato de sódio  
IPTG - *Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside*  
PMSF – *phenylmethanesulfonyl fluoride*  
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético  
Tris - tris(hidroximetil)aminometano  
TFA – ácido trifluoroacético

### Aminoácidos:

G ou Gly – Glicina	A ou Ala – Alanina
L ou Leu – Leucina	I ou Ile – Isoleucina
V ou Val – Valina	P ou Pro – Prolina
F ou Phe – Fenilalanina	S ou Ser – Serina
C ou Cys – Cisteína	Y ou Tyr – Tirosina
Q ou Gln – Glutamina	H ou His – Histidina
R ou Arg – Arginina	K ou Lys – Lisina
W ou Trp – Triptofano	M ou Met - Metionina
T ou Thr – Treonina	N ou Asn – Asparagina
E ou Glu – Glutamato	D ou Asp – Aspartato

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	7
1.1 DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS E AGREGAÇÃO PROTÉICA	7
1.2 DOENÇA DE PARKINSON E $\alpha$ -SINUCLÉINA	10
1.3 DOENÇA DE ALZHEIMER E $\beta$ -AMILÓIDE	14
1.4 PEPTÍDEO $\beta$ -AMILÓIDE E $\alpha$ -SINUCLÉINA	16
<b>2 OBJETIVOS</b>	18
2.1 OBJETIVOS GERAIS	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
<b>3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b>	19
3.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE $\alpha$ -SINUCLÉINA	19
3.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE $\alpha$ -SINUCLÉINA MARCADACOM $^{15}\text{N}$	20
3.3 CINÉTICA DE AGREGAÇÃO DA $\alpha$ -SINUCLÉINA	20
3.4 ESTUDO DA MORFOLOGIA DOS AGREGADOS	21
3.5 CORRELAÇÃO HETERONUCLEAR DE QUANTUM-SIMPLES	21
<b>4 RESULTADOS</b>	23
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA $\alpha$ -SINUCLÉINA	23
4.2 EFEITOS DO A $\beta$ 25-35 NA AGREGAÇÃO DA $\alpha$ -SINUCLÉINA	24
4.3 INTERAÇÃO ENTRE $\alpha$ -SINUCLÉINA E $\beta$ -AMILÓIDE	30
<b>5 DISCUSSÃO</b>	34
<b>6 CONCLUSÃO</b>	36
<b>7 PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	36
<b>8 REFERÊNCIAS</b>	37

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS E AGREGAÇÃO PROTÉICA

O mau-enovelamento de proteínas, levando à formação de agregados protéicos potencialmente tóxicos, parece ser um mecanismo comum em várias doenças neurodegenerativas (Lee, 2000) (**Tabela 1**). São alguns exemplos de doenças onde a formação de agregados protéicos constitui-se num fator chave na origem e/ou progressão da doença: a doença de Alzheimer familiar ou esporádica (agregação do peptídeo  $\beta$ -amilóide e da proteína tau), formas esporádica e genética da Encefalopatia Espongiforme (agregação da proteína do príon), doença de Parkinson e sinucleinopatias (depósitos de  $\alpha$ -sinucleína), doença de Huntington (agregação da proteína huntingtina), Ataxia Espinocerebelosa Tipo 3 ou doença de Machado-Joseph (agregação da proteína ataxina-3).

Em doenças amiloidogênicas, a causa e/ou a progressão da patologia parecem estar relacionadas à formação de inclusões protéicas fibrosas, intracelular ou no espaço extracelular, denominadas agregados amilóides (Trojanowski, 2000). Assim, estas doenças são classificadas de forma genérica como doenças amiloidogênicas ou amiloidoses. Interessantemente, as proteínas envolvidas nessas diferentes doenças não apresentam nenhuma similaridade de estrutura primária ou mesmo de estrutura terciária, sob o ponto de vista da unidade monomérica. A **Figura 1**, mostra diversas proteínas amiloidogênicas, as quais se diferenciam enormemente quanto ao tamanho, estrutura secundária, terciária ou quaternária e, no entanto, são capazes de sofrer alterações conformacionais, sob certas condições, que resultam na formação de fibras bastante similares. Essa observação leva à hipótese de que possam haver alvos similares para o desenvolvimento de fármacos visando, principalmente, à inibição da formação de potenciais agregados protéicos neurotóxicos. Assim, apesar das diferenças na composição molecular dessas estruturas fibrilares, bem como das regiões em que elas ocorrem, um grande número de evidências sustentam a hipótese de que mecanismos patológicos similares são a base de todas estas doenças (Trojanowski, 1998).

Assim, a agregação de proteínas formando lesões potencialmente tóxicas parece ser um mecanismo comum num grupo diverso de doenças neurodegenerativas. Nestas patologias, mutações nos genes que codificam a proteína em questão podem causar uma variante familiar da doença, bem como dar origem a marcas características das lesões no cérebro. Apesar destas mesmas lesões poderem também ser formadas pela proteína não mutada nas formas esporádicas da doença (Lee, 2000)

**Tabela 1.** Agregação de proteínas e formação de estruturas filamentosas como um possível mecanismo básico para diversas doenças neurodegenerativas (adaptado de Lee, 2000)

<b>Doença</b>	<b>Componentes das lesões</b>	<b>Localização</b>
Doença de Alzheimer	SPs/ A $\beta$	Extracelular
	NFTs/PHFtau	Intracelular
Esclerose Lateral Amiotrófica	Esferóides/ subunidades NF, SOD1	Intracelular
Demência com Corpos de Lewy	SPs/A $\beta$	Extracelular
	LBs/ $\alpha$ -sinucleína	Intracelular
Síndrome de Down	SPs/A $\beta$	Extracelular
	NFTs/PHFtau	Intracelular
	LBs/ $\alpha$ -sinucleína	Intracelular
Neurodegeneração com Acúmulo de Ferro - Tipo 1	LBs/ $\alpha$ -sinucleína	Intracelular
	GCIIs/ $\alpha$ -sinucleína	Intracelular
Variante de AD com Corpos de Lewy	SPs/A $\beta$	Extracelular
	NFTs/PHFtau	Intracelular
	LBs/ $\alpha$ -sinucleína	Intracelular
Atrofia Múltipla	GCIIs/ $\alpha$ -sinucleína	Intracelular
Doença de Inclusão Intranuclear Neuronal	Inclusões/tratos de poliglutaminas expandidas	Intranuclear
Doença de Parkinson	LBs/ $\alpha$ -sinucleína	Intracelular
Doenças de Prion	Placas amilóides/prions	Extracelular
Taupatias	Emaranhados “tangles” / tau anormal	Intracelular
Doenças dos Trinucleotídeos Repetidos	Inclusões/tratos de poliglutaminas expandidas	Intranuclear e intradendrítica

A $\beta$ : peptídeos  $\beta$ -amilóide

GCIIs: inclusões citoplasmáticas gliais

LBs: Corpos de Lewy

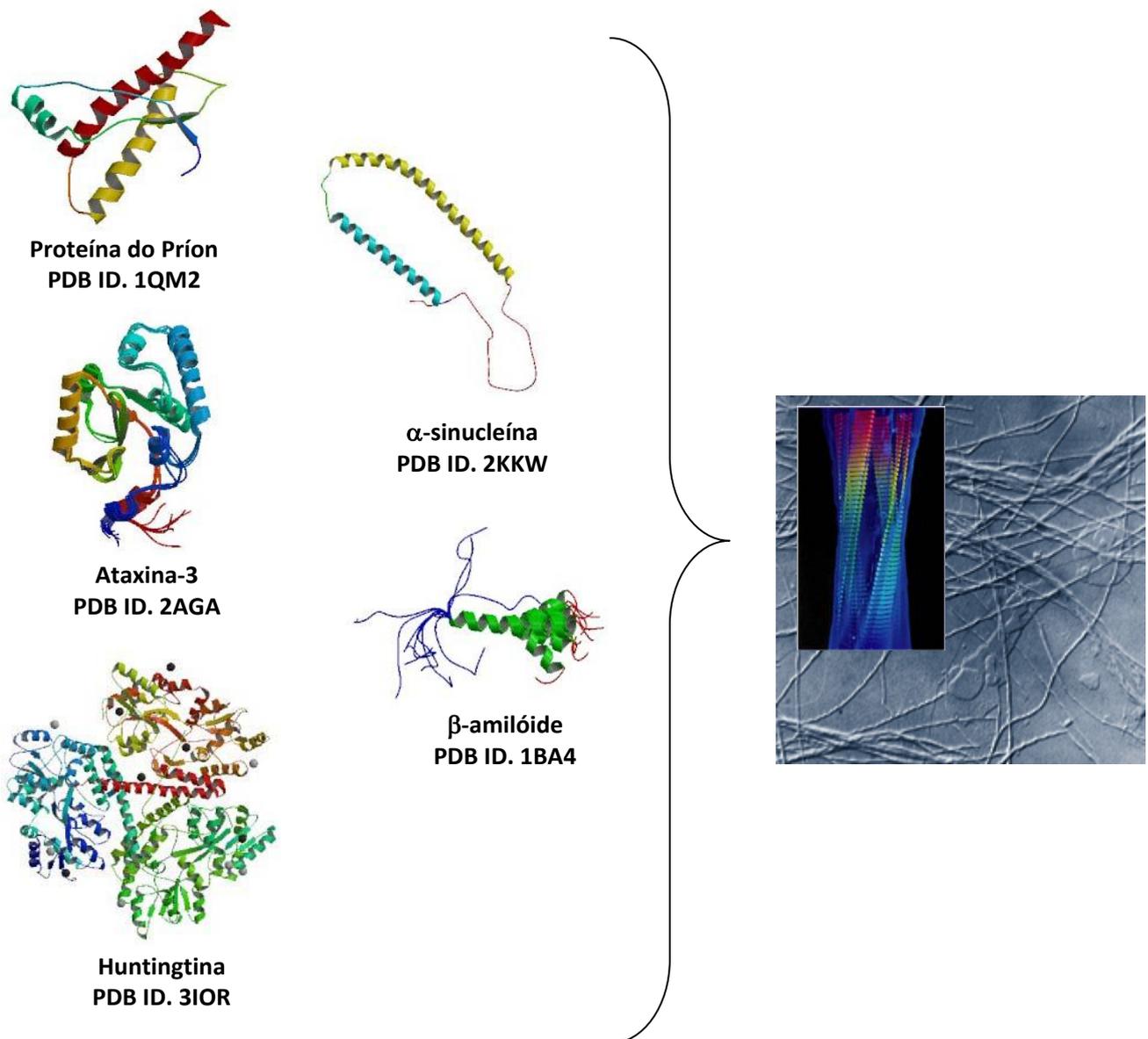
NF: neurofilamentos

NFTs: emaranhados “tangles” neurofibrilares

PHFtau: filamentos de tau helicamente unidos

SOD1: superóxido dismutase 1

SPs: placas senis



**Figura 1.** Proteínas com estruturas totalmente distintas (proteína do Prion, ataxina-3 e huntingtina) e relacionadas a diferentes doenças neurodegenerativas são capazes de sofrer alterações conformacionais, gerando fibras similares entre si.

## 1.2 DOENÇA DE PARKINSON E $\alpha$ -SINUCLÉINA

A doença de Parkinson (PD) é uma doença do sistema motor que afeta aproximadamente 1% da população com idade acima de 65 anos, sendo caracterizada por bradi e hipocinesia, tremores de repouso, rigidez, marcha desordenada e prejuízo de reflexo postural (Marsden, 1994). Os sintomas em PD resultam de uma neurodegeneração progressiva que afeta predominantemente os neurônios dopaminérgicos do sistema nigroestriatal (Marsden, 1994). Histologicamente, observa-se uma perda dos neurônios da substância *nigra* e o desenvolvimento de inclusões intracelulares, chamadas de Corpos de Lewy, compostas por um material filamentososo denso e granular. A neuropatogênese da PD é desconhecida. Em cérebros normais, apesar do número de células nigrais sofrerem uma redução de 4.7 - 6.0% a cada década de vida no período de 50 a 90 anos de idade (Gibb, 1991), esta perda não é suficiente para produzir as características da patologia (McGeer, 1977). Além disso, o padrão de perda das células dopaminérgicas estriatais (Kish, 1992) e das células nigrais (Fearnley, 1991) com o envelhecimento, é significativamente diferente daquele observado em PD, onde em torno de 70% de células nigras são perdidas. Estas observações, juntamente com diversos trabalhos, têm indicado que, embora o aumento da idade seja um fator de risco inequívoco para PD, esta patologia parece não ser desencadeada somente pelo processo de envelhecimento (Scherman, 1989).

A maioria dos casos da PD é idiopática, sem um histórico familiar. Entretanto, uma pequena percentagem dos casos é familiar e herdado de um modo autossômico-dominante. Assim, duas mutações distintas foram identificadas no gene da proteína  $\alpha$ -sinucleína, em pacientes com PD familiar (Polymeropoulos, 1997): a primeira mutação é a troca de um resíduo de alanina na posição 53 por um resíduo de treonina (A53T), sendo a segunda, a troca de um resíduo de alanina na posição 30 por um resíduo de prolina (A30P).

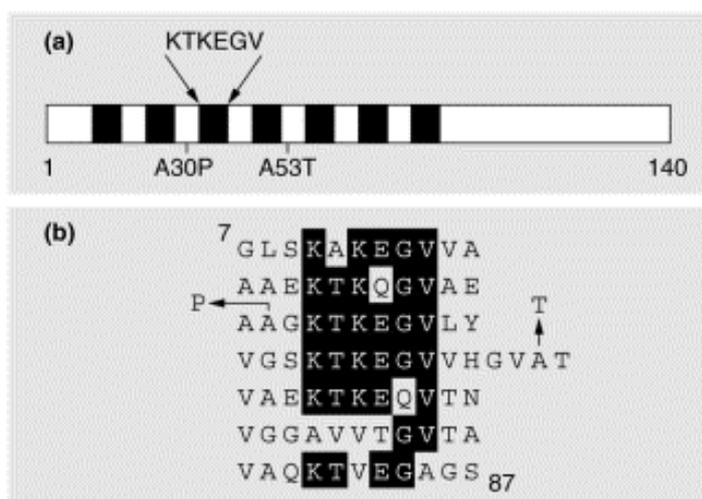
Além de PD,  $\alpha$ -sinucleína é o componente majoritário das lesões associadas a várias outras doenças neurológicas como a atrofia múltipla, a doença de Hallervorden-Spatz, variante da doença de Alzheimer com corpos de Lewy e demência com corpos de Lewy (Spillantini, 1998). Estas doenças são caracterizadas por inclusões celulares de agregados de  $\alpha$ -sinucleína, que formam corpos de lewy na doença de Parkinson, placas amilóides na doença de Alzheimer, inclusões glial-citoplasmáticas e agregados nos terminais pré-sinápticos em atrofia múltipla e esclerose lateral amiotrófica.

As sinucleínas são proteínas abundantes no cérebro, porém pouco é conhecido sobre suas funções fisiológicas. Em humanos, três diferentes membros ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -sinucleínas) desta família são expressos por três genes distintos (Goedert, 1998), sendo estas isoformas constituídas de 127 a 140 aminoácidos, com uma identidade de seqüência de 56-62%. Estas proteínas apresentam um conjunto de seqüências imperfeitas repetidas:  $\alpha$ -sinucleína apresenta de cinco a sete seqüências repetidas, enquanto que  $\beta$ -,  $\gamma$ -sinucleínas apresentam cinco seqüências repetidas. Utilizando-se experimentos de imunohistoquímica, constatou-se que  $\alpha$ -sinucleína e  $\beta$ -sinucleína estão concentradas nos terminais nervosos, com baixa quantidade nos corpos das células nervosas e dendritos. Já a  $\gamma$ -sinucleína está presente por toda a célula nervosa (Goedert, 2001).

A estrutura primária da  $\alpha$ -sinucleína pode ser dividida em três regiões funcionais: uma região amino-terminal (resíduos de 1-60) na qual cinco das sete seqüências repetidas KTKEGV estão localizadas (**Figura 2**); uma região hidrofóbica (resíduos 61-95), que apresenta uma forte tendência a formar folha  $\beta$ -pregueada, com base em predições de estrutura secundária (Iwai, 1995); e uma região carboxi-terminal enriquecida com resíduos ácidos e prolina. Esta região acídica apresenta maior variabilidade nas várias isoformas de  $\alpha$ -sinucleína isolada de diversas origens como aves, bovinos e humanos (George, 1995). Nenhum homólogo de sinucleínas foi identificado em *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* ou *Drosophila melanogaster*, indicando que a presença de sinucleínas talvez esteja limitada a vertebrados (Goedert, 2001).

Estudos experimentais têm mostrado que  $\alpha$ -sinucleína pode ligar-se a membranas lipídicas através da região com seqüências repetidas na parte amino-terminal, sugerindo que a  $\alpha$ -sinucleína possa ser uma proteína ligadora de lipídeos (Jensen, 1998). A mutação A30P reduz esta ligação a lipídeos, enquanto que a mutação A53T não apresenta nenhum efeito. Um fato importante acerca da possível função das sinucleínas está na observação de que tanto  $\alpha$ -sinucleína como  $\beta$ -sinucleína são capazes de inibir fosfolipase D2 (Jenco, 1998). Esta isoforma de fosfolipase D se localiza na membrana plasmática, onde desempenha uma função regulatória sinal-induzida do citoesqueleto e de endocitose. Portanto, é possível que  $\alpha$ -sinucleína e  $\beta$ -sinucleína regulem o processo de transporte por vesículas. Experimentos de inibição do gene da  $\alpha$ -sinucleína via recombinação homóloga sugerem que esta proteína seja um regulador negativo de neurotransmissores (Abeliovich, 2000).

Sob o ponto de vista estrutural,  $\alpha$ -sinucleína é um tetrâmetro com estrutura em alfa-hélice que, sob condições ainda não conhecidas, é convertida a uma espécie amiloidogênica, rica em estrutura do tipo folhas-beta. Algumas evidências apontam para a formação de uma espécie monomérica desenovelada ou parcialmente enovelada como uma etapa chave na formação de fibras da  $\alpha$ -sinucleína. Tanto a proteína inteira, como a região carboxi-terminal truncada, associam-se formando filamentos, de modo semelhante aos encontrados no cérebro de pacientes com PD (Conway, 2000a). Estudos indicam que a mutação A53T aumenta a velocidade de associação da  $\alpha$ -sinucleína em filamentos, porém o efeito da mutação A30P ainda não está claro. A agregação da proteína monomérica é acompanhada por uma transição de um estado randômico a um estado mais ordenado, com conformação folha  $\beta$ -pregueada (Conway, 2000a). Estudos de difração de raio-X e de elétrons mostram que os filamentos de  $\alpha$ -sinucleína exibem uma conformação  $\beta$ -cruzada que é característica de amilóides (Serpell, 2000). Nas mesmas condições em que  $\alpha$ -sinucleína se associa,  $\beta$ -sinucleína e  $\gamma$ -sinucleína não formaram filamentos e mantiveram suas conformações randômicas (Serpell, 2000), coincidindo com a ausência observada destas sinucleínas nas lesões filamentosas (Spillantini, 1998).



**Figura 2.** Diagrama esquemático da  $\alpha$ -sinucleína humana. Sete repetições da sequência consenso KTKEGV são mostradas pelas barras pretas, juntamente com as duas mutações A30P e A53T. b) Repetições de sequências observadas na  $\alpha$ -sinucleína humana. Os resíduos 7-87 dos 140 aminoácidos são indicados, sendo os resíduos idênticos, nas sete repetições, destacados em preto (Goedert, 2001).

Camundongos transgênicos expressando  $\alpha$ -sinucleína humana selvagem ou mutante nas células nervosas, apresentaram inclusões da proteína distintas dos filamentos encontrados em humanos (Masliah, 2000). A presença destas inclusões foi acompanhada de degeneração dos terminais dopaminérgicos, porém sem perda de células nervosas. Utilizando-se o modelo de ratos, observou-se uma reprodutibilidade maior das características histológicas da Doença de Parkinson (Betarbet, 2000). A administração crônica de rotenona, um inseticida que inibe o complexo mitocondrial I, leva a morte de células nervosas na substância nigra em ratos, que é associada com hipocinesia e rigidez (Betarbet, 2000). Observa-se também que nos neurônios nigrais acumulam-se inclusões de  $\alpha$ -sinucleína fibrilar antes da degeneração, concordando com estudos epidemiológicos que mostram uma associação entre PD e exposição a pesticidas. Este fato abre a discussão se a associação da  $\alpha$ -sinucleína é um resultado da inibição do complexo I, ou é devido a um efeito adicional da rotenona (Goedert, 2001).

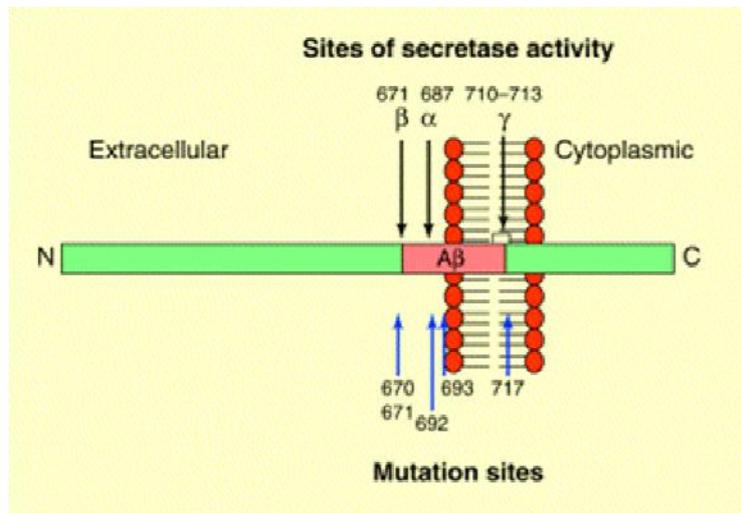
A expressão de  $\alpha$ -sinucleína humana selvagem ou mutante nas células nervosas de *D. melanogaster* leva a formação de inclusões filamentosas semelhantes às encontradas nos Corpos de Lewy (Feany, 2000). As células nervosas dopaminérgicas com estas inclusões sofrem degeneração e as moscas desenvolvem distúrbios locomotores. É importante ressaltar que o sequenciamento do genoma da *D. melanogaster* não apresentou nenhuma evidência de um homólogo de  $\alpha$ -sinucleína neste organismo. Comparado com camundongos transgênicos, em *D. melanogaster* os filamentos da  $\alpha$ -sinucleína humana formaram-se com relativa facilidade e velocidade, sugerindo que talvez vertebrados tenham algum mecanismo que previna a agregação da  $\alpha$ -sinucleína. No conjunto, estes dados reforçam a ideia de que a  $\alpha$ -sinucleína desempenha um papel central na degeneração observada em diversas doenças neurológicas.

### 1.3 A DOENÇA DE ALZHEIMER E O PEPTÍDEO $\beta$ -AMILÓIDE

A doença de Alzheimer (AD) é uma desordem de demência associada ao envelhecimento, que causa um prejuízo severo e permanente em múltiplas funções cognitivas (McKhann, 1984). O primeiro sintoma é tipicamente um declínio na memória recente. Passados vários anos, o paciente de AD já não é capaz de reconhecer fatos do seu passado e história recente, prejudicando também sua habilidade na orientação visual-espacial, além de alterações de humor e depressão. Nos Estados Unidos, aproximadamente 4 milhões de pessoas sofrem de AD, sendo atribuídas ~100.000 mortes/anos a esta patologia.

Histologicamente, observa-se a presença de depósitos protéicos extracelulares em cérebros de pacientes com AD, conhecidos como placas senis, cujo constituinte principal é o peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ). Estes depósitos são encontrados nos lóbulos frontal e temporal, incluindo o hipocampo, que é uma região do cérebro envolvida em memória e orientação visual/espacial. Assim, a doença é caracterizada pela neurodegeneração e perda da função sináptica, particularmente em regiões contendo abundantes placas senis. A função das placas e dos depósitos neurofibrilares na neuropatologia não é conhecida, porém juntos estes são os mais importantes marcadores bioquímicos da AD. Assim, o entendimento de sua formação pode fornecer importantes informações sobre a patogênese da doença.

A primeira mutação identificada relacionada à AD familiar foi a substituição de um resíduo de valina por um de isoleucina na posição 717 da proteína precursora de  $\beta$ -amilóide (APP) (Lendon, 1997). APP é uma proteína de superfície de célula, amplamente expressa, que é proteoliticamente clivada nas proximidades do lado extracelular da membrana por uma enzima chamada  $\alpha$ -secretase, liberando um domínio extracelular para o meio. A fração de APP que não é clivada pela  $\alpha$ -secretase, é então clivada por duas enzimas  $\beta$ -secretase e  $\gamma$ -secretase para gerar, assim, os peptídeos  $\beta$ -amilóide. A **Figura 3** mostra representações esquemáticas do processamento da APP e produção dos peptídeos de  $\beta$ -amilóide.



**Figura 3.** Representação esquemática do processamento da proteína precursora de  $\beta$ -amilóide (APP), que corresponde ao retângulo verde. A porção que codifica o peptídeo de  $\beta$ -amilóide é representada em vermelho. Os sítios de mutações em APP são representados por setas azuis e os sítios de clivagem por secretases, por setas pretas (Ray, 1998).

Peptídeos  $\beta$ -amilóides compreendem um conjunto heterogêneo de peptídeos com 39-43 aminoácidos, derivados por hidrólise proteolítica da APP (Selkoe, 1994; Lendon, 1997). Assim, peptídeos  $\beta$ -amilóide são produtos normais, embora minoritários, do metabolismo de APP, sendo predominantemente peptídeos com 40 resíduos de aminoácidos ( $A\beta_{40}$ ). Já peptídeos maiores, com 42-43 resíduos ( $A\beta_{42/43}$ ), representam apenas ~10% do total de peptídeos  $\beta$ -amilóide gerados. A localização do códon 717 sugere que uma mutação nesta posição pode alterar a atividade da  $\gamma$ -secretase. Quando examinada bioquimicamente, esta mutação leva a um aumento de 1.5 vezes na produção de  $A\beta_{42/43}$  *in vitro* e observa-se um aumento dos níveis plasmático e do fluido cerebrospinal de  $A\beta_{42/43}$  em pacientes portadores da mutação (Lendon, 1997). Apesar de peptídeos  $A\beta_{42/43}$  serem apenas uma fração dos peptídeos de  $A\beta$  presente no fluido cerebrospinal, peptídeos de  $A\beta_{42/43}$  são os maiores constituintes dos depósitos de placas senis, indicando que um aumento da produção desta espécie pode ser suficiente para causar a doença de Alzheimer. Cinco outras mutações no gene para APP relacionadas com AD familiar já foram identificados: uma dupla mutação nas posições 670/671, três na

posição 717 e uma na posição 716, todas conduzindo a um aumento nos níveis de A $\beta$ 42/43 (Ray, 1998).

De todos os derivados de A $\beta$ , o peptídeo 25-35 (A $\beta$ 25–35), de sequência GSNKGAIIGLM, é o menor fragmento capaz de formar fibras em solução (Hughes, 2000) com toxicidades semelhantes às fibras geradas a partir dos peptídeos A $\beta$ 42/43. Com isso, foi proposto que a região compreendendo os resíduos 25–35 do peptídeo A $\beta$  desempenha um papel importante tanto na fibrilogênese como na formação de espécies agregadas tóxicas. Sob o ponto de vista experimental, a rápida agregação do A $\beta$ 25-35 o torna um modelo interessante para o teste *in vitro* de moléculas anti-amiloidogênicas (Hughes, 2000).

Placas podem ser descritas como difusas ou “clássicas” (Dickson, 1997). Placas difusas são formadas por agregados amorfos de  $\beta$ -amilóide e tipicamente não estão associadas com distrofia neuronal e neurites anormais. Já as chamadas placas clássicas, contêm agregados fibrilares de A $\beta$  são frequentemente associadas com degeneração e perda de células neuronais. Peptídeos  $\beta$ -amilóide solúveis se agregam espontaneamente formando fibras que são indistinguíveis daqueles formados *in vivo*, sugerindo que a presença de placas pode ser resultado de uma elevação nos níveis de A $\beta$  (Lendon, 1997). Em concordância com esta hipótese, observa-se que camundongos transgênicos que superexpressam a proteína APP mutante, apresentam elevados níveis de  $\beta$ -amilóide e uma extensiva deposição de placas nas mesmas regiões afetadas pela AD em humanos (Lendon, 1997). Além disso, observa-se, neste modelo animal, que a formação das placas não é um resultado direto do aumento da concentração de  $\beta$ -amilóide, sendo dependente de outros fatores ainda desconhecidos.

#### 1.4 PEPTÍDEO $\beta$ -AMILÓIDE E $\alpha$ -SINUCLÉINA

Demência com Corpos de Lewy (DLB) - uma doença neurodegenerativa que sobrepõe sintomas da AD e da PD – é caracterizada pela presença de um fragmento hidrofóbico, conhecido como componente não-amilóide (NAC), da  $\alpha$ -sinucleína em placas senis constituídas de A $\beta$  no meio extracelular de neurônios (Liu, 2005). Isto pode indicar uma interação forte entre estas proteínas em condições anormais, de forma a possibilitar

uma clivagem proteolítica do fragmento NAC da  $\alpha$ -sinucleína e sua migração do meio intracelular para o meio extracelular, onde se encontram os depósitos de  $A\beta$ .

Utilizando a correlação heteronuclear de quantum-simples (HSQC), foi mostrada a presença de interações entre  $A\beta_{40}$  e  $A\beta_{42}$  e a  $\alpha$ -sinucleína em meio contendo micelas de SDS (dodecil sulfato de sódio) (Yokota, 2002). As micelas de SDS, neste caso, tiveram a função de mimetizar o ambiente da membrana lipídica. Assim, o estudo indicou a interação entre  $\alpha$ -sinucleína, com estrutura  $\alpha$ -hélice, e os peptídeos  $\beta$ -amilóide 40 e 42, na presença de micelas de SDS. Porém a interação entre o  $A\beta_{25-35}$  e a  $\alpha$ -sinucleína desenvolvida ainda não foi descrita pela técnica de RMN.

Yankner e colaboradores (1990) indicaram que  $\alpha$ -sinucleína e  $A\beta_{38}$  formam um complexo com propriedades neurotóxicas e resistente à desnaturação por SDS. Este complexo é estabilizado por interações hidrofóbicas específicas entre os 15 últimos resíduos da porção NAC da  $\alpha$ -sinucleína e os resíduos 25-35 do  $\beta$ -amilóide (Yankner, 1990). Kim e colaboradores (2001) mostraram que o  $A\beta_{25-35}$  é capaz de inibir a agregação da  $\alpha$ -sinucleína em torno de 50% numa proporção molar de 1:5 entre  $\alpha$ -sinucleína e  $A\beta$ . Além disso, este estudo mostrou que os agregados formados na presença do  $\beta$ -amilóide têm quase o dobro da toxicidade em neurônios que o formado na ausência do mesmo, além de apresentar morfologia distinta (Kim, 2001).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigação das bases moleculares da interação do peptídeo  $\beta$ -amilóide 25-35 com a  $\alpha$ -sinucleína e seu efeito sobre a formação de fibras desta proteína.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do A $\beta$ 25-35 sobre a cinética de formação de fibras da  $\alpha$ -sinucleína, na presença ou ausência de fibras maduras pré-formadas de  $\alpha$ -sinucleína;
- Avaliar os efeitos do A $\beta$ 25-35 sobre a cinética de formação de fibras da  $\alpha$ -sinucleína na presença de SDS, bem como na ausência de agitação
- Investigar a macroestrutura dos agregados formados na presença ou ausência de A $\beta$ 25-35 por microscopia de força atômica (AFM);
  - Elucidar os sítios de interação entre a proteína  $\alpha$ -sinucleína e o A $\beta$ 25-35 por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).

### 3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 3.1 – EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE $\alpha$ -SINUCLEÍNA

Os plasmídeos de  $\alpha$ -sinucleína cedidos pelo Dr. Peter Lansbury foram utilizados para a transformação de *E. coli* BL21 (DE3). A  $\alpha$ -sinucleína recombinante foi expressa e purificada conforme descrito a seguir. *E. coli* BL21 (DE3) armazenada em N<sub>2</sub> líquido foi inoculada em 50 ml de LB líquido contendo os antibióticos ampicilina (100 $\mu$ g/mL) e cloranfenicol (34 $\mu$ g/mL), sendo incubado por 12 h a 37 °C. Este pré-inóculo foi adicionado a 400 mL de LB líquido e incubado por aproximadamente 3 horas a 37°C até absorvância em 600nm atingir 0,5. Em seguida foi adicionado *Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG) na concentração final de 500  $\mu$ M e incubado novamente por 5 h a 37°C. Após a indução a cultura foi centrifugada a 4800rpm (4150 x g) por 20 min a 4°C e o precipitado ressuspendido em tampão A (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, *phenylmethanesulfonylfluoride* (PMSF) 1 mM, EDTA 1 mM). A solução foi sonicada em gelo com 25 pulsos de 20 s, alternados por 10 s sem pulso, em potência de 30% (sonicador modelo Vibracell-Sonics) e centrifugada a 13000 rpm (18000 x g) por 20 min a 4°C. No sobrenadante foi realizada a precipitação ácida das proteínas presentes pela adição de HCl 9% até pH 3,5, seguida de agitação durante 15 min à temperatura ambiente. Após esse período a amostra foi centrifugada a 13000 rpm (18000 x g) por 20 min a 4 °C e o pH do sobrenadante ajustado para 7,5 sendo dialisado por 12 h em tampão (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0). Após a primeira diálise, realizou-se a precipitação da  $\alpha$ -sinucleína com sulfato de amônio em banho de gelo (50 % de saturação a 0°C). A solução foi centrifugada a 13000rpm (18000 x g) por 20 min a 4°C e o precipitado obtido foi ressuspenso em tampão (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0) e dialisado pela segunda vez para eliminar o sulfato de amônio. Assim, a  $\alpha$ -sinucleína encontra-se preparada para liofilização. A pureza da proteína obtida é verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) e por gel filtração em uma coluna Superdex 200 10/300GL (GE Biosciences) (**Figura 4**).

### 3.2- EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE $\alpha$ -SINUCLEÍNA MARCADA COM $^{15}\text{N}$

A marcação isotópica da  $\alpha$ -sinucleína com  $^{15}\text{N}$  foi realizada baseando-se no procedimento descrito por Marley e colaboradores (2001). Foi seguido o mesmo protocolo da proteína não-marcada, porém antes da adição do IPTG, foi realizada uma troca de meio de cultura de LB líquido para meio mínimo marcado com  $^{15}\text{N}$ . Logo após a absorvância atingir 0,5, o meio foi centrifugado a 4800 rpm (4150 x g) por 20 min a 30°C, descartando o sobrenadante. Ao precipitado, foi adicionado meio mínimo M9 não-marcado e a centrifugação foi repetida com intuito de lavagem, removendo todo meio LB líquido. Após a lavagem, o precipitado foi ressuspendido em 250 ml de meio mínimo M9 marcado com  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  e o IPTG foi adicionado em concentração de 500 $\mu\text{M}$ . Os procedimentos de indução, purificação e caracterização foram os mesmos do item 3.1.

### 3.3 CINÉTICA DE AGREGAÇÃO DE $\alpha$ -SINUCLEÍNA

A cinética de agregação foi determinada pelo monitoramento da ligação à sonda fluorescente Tioflavina-T, em intervalos de tempos pré-determinados. A ligação de Tioflavina-T foi avaliada pelo aumento do valor da fluorescência, excitando-se a amostra a 446 nm e emitindo em 485 nm utilizando o fluorímetro Cary Eclipse (Varian Inc.). A  $\alpha$ -sinucleína recombinante (100  $\mu\text{M}$ ), purificada como descrito anteriormente, foi ressuspendida no tampão de agregação (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4) e agitada a 350 rpm e 37 °C, na presença de 5  $\mu\text{M}$  de Tioflavina-T, na ausência ou presença de A $\beta$ 25-35 em concentrações equimolares. O peptídeo A $\beta$ 25-35 (Sigma Co) foi preparado ressuspendendo-se 1 mg do peptídeo em 200  $\mu\text{L}$  de ácido trifluoroacético (TFA) 100%, o qual foi mantido sob agitação por 3 horas a 4 °C. Após este período a mistura foi diluída 10X com água MilliQ e alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  (contendo 50  $\mu\text{g}$  cada) foram liofilizadas e armazenadas a -20 °C. Uma outra preparação de A $\beta$ 25-35 foi feita trocando-se TFA por água Milli-Q. Alternativamente, avaliou-se o efeito do A $\beta$ 25-35 sobre a agregação da  $\alpha$ -sinucleína (50  $\mu\text{M}$ , em 20 mM NaPB, 150 mM NaCl, pH 7.4) na ausência de agitação, utilizando-se como indutor da agregação sementes de  $\alpha$ -sinucleína (5% m/m) ou SDS 0.5 mM. As sementes de  $\alpha$ -sinucleína foram preparadas submetendo-se fibras maduras a sonicação por 60 min. Os experimentos de agregação foram realizados

em placas brancas de 96 poços utilizando-se um leitor de microplacas acoplado ao fluorímetro Cary Eclipse. Cada experimento foi realizado em triplicata e o ajuste dos pontos obtidos por regressão sigmoidal (Origin Professional 8.0).

### 3.4 ESTUDO DA MORFOLOGIA DOS AGREGADOS

A ultraestrutura de diferentes agregados de  $\alpha$ -sinucleína foi observada por estudos de microscopia de força atômica (AFM). Neste sentido, uma solução de  $\alpha$ -sinucleína, previamente, diluída foi aplicada sobre um suporte de mica e as imagens adquiridas em um MFP-3D (Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA) no modo de contato intermitente a 0.5 Hz. A análise das imagens foi realizada utilizando-se o programa Igor Pro 5.0 (WaveMetrics Inc., Portland, OR –USA).

### 3.5 CORRELAÇÃO HETERONUCLEAR DE QUANTUM-SIMPLES (HSQC)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica extremamente versátil no estudo de estrutura e dinâmica em nível atômico de moléculas, desde pequenos compostos orgânicos até proteínas e ácidos nucléicos.

HSQC é um experimento de RMN bidimensional aplicado principalmente a proteínas, onde os sinais gerados no espectro bidimensional estão relacionados ao acoplamento escalar entre os núcleos de hidrogênio amídico e seu respectivo núcleo de  $^{15}\text{N}$ . Portanto, cada resíduo de aminoácido da proteína apresentará um deslocamento químico característico no espectro de HSQC, que estará relacionado com o ambiente químico em que o grupamento  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  se encontra. Assim, o número de sinais presentes num espectro de HSQC é aproximadamente igual ao número de resíduos da proteína, acrescido dos sinais devido ao resíduo N-terminal, além dos nitrogênios amídicos das cadeias laterais da asparagina e da glutamina e decrescido do aminoácido prolina, que apresenta nitrogênio amídico terciário. Além disso, pode-se observar sobreposição de sinais em proteínas desenoveladas, como a  $\alpha$ -sinucleína, que apresentam baixa dispersão dos sinais devido ao fato do ambiente químico dos resíduos serem muito semelhantes.

Portanto, o espectro de HSQC de uma proteína pode ser visto como impressão digital da mesma (Pauleta, 2010).

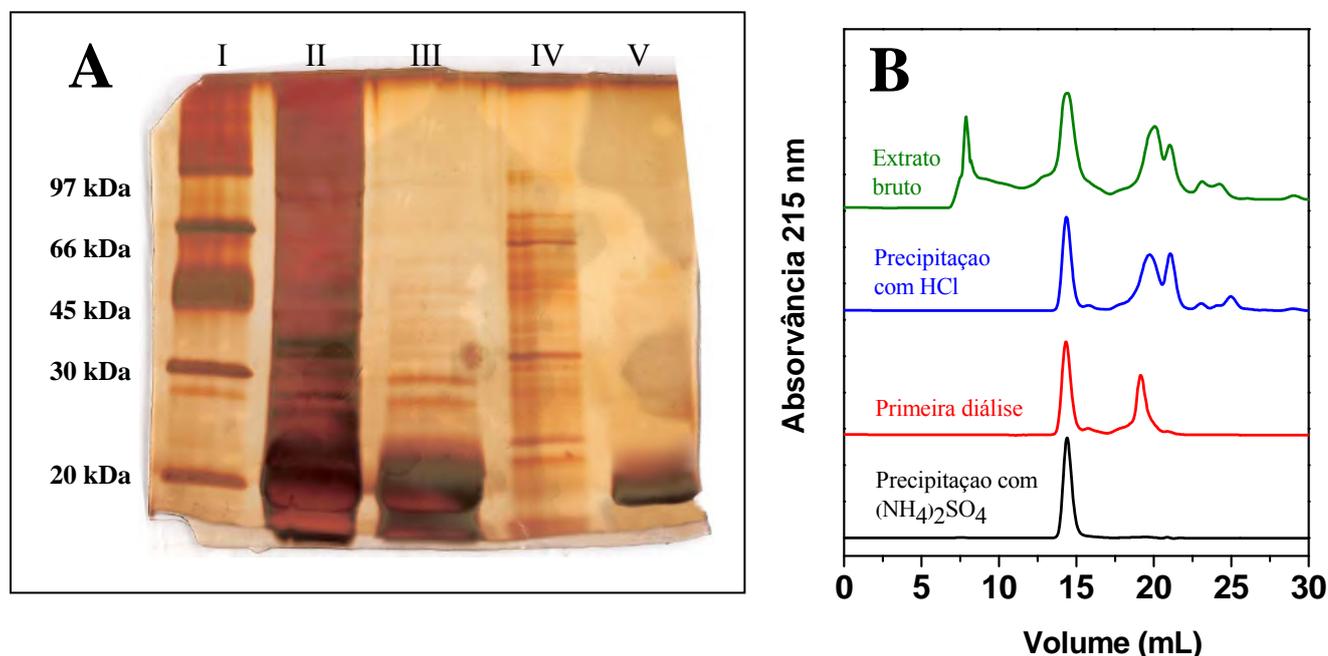
A interação proteína-ligante pode ser investigada pela análise das alterações no espectro de HSQC quando a proteína é incubada na presença do ligante. Assim, ao serem comparados os espectros de HSQC da proteína na presença e na ausência do ligante, podem ser observados desvios no deslocamento químico, bem como na intensidade dos sinais de ressonância dos resíduos envolvidos na interação, ou mesmo daqueles que foram afetados pela interação. Portanto, o HSQC pode auxiliar na elucidação dos mecanismos de interação entre um fármaco e uma proteína-alvo, ou até mesmo entre duas proteínas.

Para conhecer melhor quais sítios da  $\alpha$ -sinucleína são capazes de interagir com o peptídeo A $\beta$ 25–35, foram feitos espectros de  $^{15}\text{N}$ -HSQC utilizando equipamento Bruker DRX 800 MHz, localizado no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear (CNRMN/UFRJ). Para tanto, foram adquiridos espectros da  $\alpha$ -sinucleína- $^{15}\text{N}$  (200 $\mu\text{M}$ ), em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM na ausência ou presença de A $\beta$ 25-35 (relação molar 1:1 e 1:2). Todos os espectros foram adquiridos a 15°C. Para avaliar-se o efeito do SDS sobre a interação da  $\alpha$ -sinucleína com o peptídeo  $\beta$ -amilóide, os experimentos acima foram realizados na presença de SDS 100 mM, sendo os espectros adquiridos neste caso a 30 °C. O assinalamento dos picos dos espectros da  $\alpha$ -sinucleína na ausência de SDS foi feito de acordo com o trabalho publicado por Rao *et al.* (2009). No caso dos espectros das amostras contendo SDS, a referência adotada para o assinalamento foi o trabalho publicado por Chandra *et al.* (2003). O programa utilizado para os assinalamentos foi CcpNmr Analysis 2.1.5.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA $\alpha$ -SINUCLEÍNA

A  $\alpha$ -sinucleína humana foi produzida de forma recombinante e purificada utilizando-se um método desenvolvido pelo nosso grupo (dado não publicado). Este método permite a obtenção da proteína com um alto grau de pureza e homogeneidade. A **Figura 4A** mostra o perfil em gel de eletroforese (SDS-PAGE 15%) das várias etapas da purificação da  $\alpha$ -sinucleína. Apesar da  $\alpha$ -sinucleína ser uma proteína de massa molecular de 14 kDa, já é conhecido que ela comporta-se como uma proteína de 18 kDa em SDS-PAGE, possivelmente devido a sua estrutura desenovelada. Pela análise em cromatografia líquida (**Figura 4B**) pode-se observar um aumento da proporção da  $\alpha$ -sinucleína durante a purificação, bem como a presença de um pico de eluição condizente com o tamanho esperado para o monômero desenovelado.

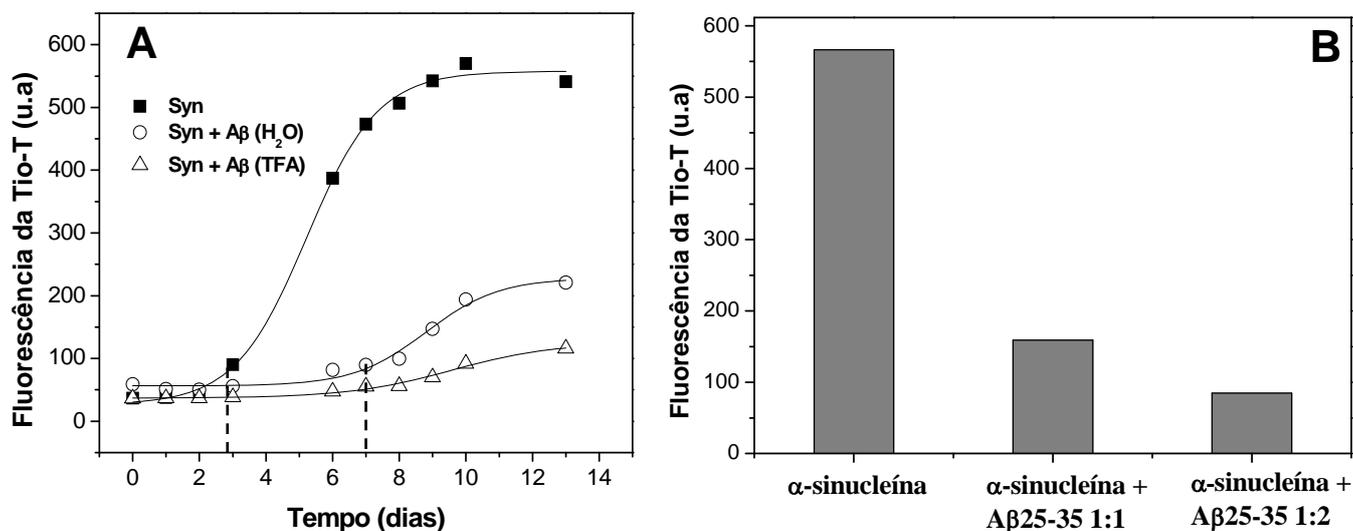


**Figura 4.** Caracterização de amostras de cada etapa da purificação da  $\alpha$ -sinucleína: (A) Gel de eletroforese SDS-PAGE 15% revelado por prata. (I) Padrões de peso; (II) Extrato bruto; (III) Sobrenadante pós-precipitação com HCl; (IV) Sobrenadante pós-tratamento com sulfato de amônio; (V) Precipitado pós-tratamento com sulfato de amônio. (B) Análise em cromatografia de exclusão molecular [Superdex 200 10/300GL (GE Biosciences)] das várias etapas da purificação da  $\alpha$ -sinucleína.

## 4.2 EFEITOS DO A $\beta$ 25–35 NA AGREGAÇÃO DA $\alpha$ -SINUCLEÍNA

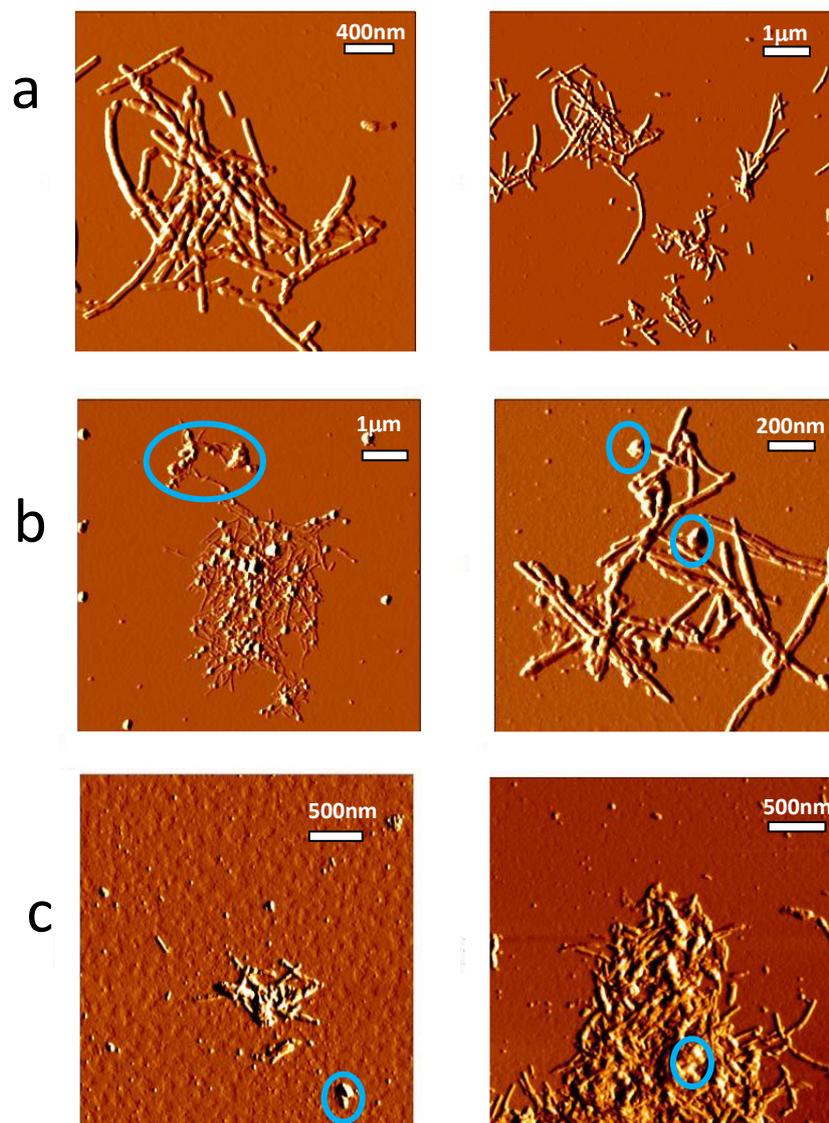
A **Figura 5A** mostra a cinética de agregação da  $\alpha$ -sinucleína na presença ou ausência do peptídeo A $\beta$ 25-35. Pode-se observar uma redução na ligação da Tioflavina-T à amostra de  $\alpha$ -sinucleína incubada na presença de A $\beta$ 25-35. A Tioflavina-T é uma sonda fluorescente que liga, preferencialmente, à agregados fibrilares, o que nos sugere uma redução dessas espécies na amostra de  $\alpha$ -sinucleína incubada na presença do A $\beta$ 25-35. O tratamento do A $\beta$ 25-35 com TFA tem por objetivo remover formas agregadas do  $\beta$ -amilóide, aumentando a concentração de monômeros do peptídeo, o que não ocorre no tratamento com água. Desta forma, pode-se observar que A $\beta$ 25-35/TFA teve um maior efeito inibitório sobre a formação de fibras da  $\alpha$ -sinucleína em relação ao peptídeo ressuspendido em água, sugerindo que o  $\beta$ -amilóide monomérico seja, provavelmente, a espécie responsável pelo efeito observado. Além disso, pode-se notar que o efeito do A $\beta$ 25-35 é dependente da concentração deste (**Figura 5B**). Os controles contendo apenas peptídeo A $\beta$ 25-35 mantiveram baixa e constante a ligação à Tioflavina-T durante todo o experimento de agregação (dado não mostrado).

Outro efeito interessante do  $\beta$ -amilóide sobre a cinética de agregação foi o de aumentar o tempo da fase de nucleação que é uma etapa lenta relacionada à formação de oligômeros precursores das fibras. Enquanto que, o controle (ausência de A $\beta$ 25-35) apresentou uma fase de nucleação em torno de 3 dias, na presença do peptídeo este tempo foi de 7 dias.



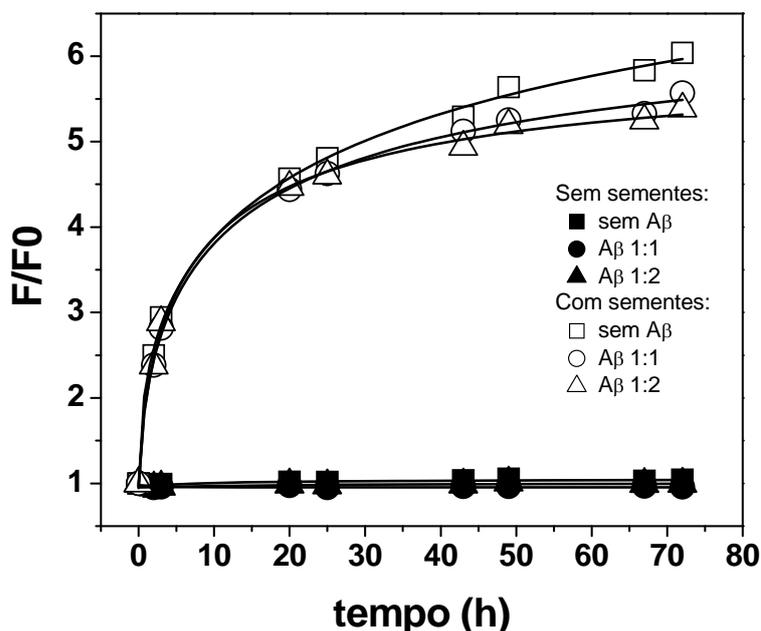
**Figura 5:** Efeitos do β-amilóide na fibrilação da α-sinucleína. (A) Cinética de agregação da α-sinucleína a 37°C e 350 rpm, em tampão Tris 20mM, NaCl 150mM, pH 7,4, em ausência ou presença de Aβ25-35, preparado em diferentes condições (TFA e H<sub>2</sub>O). (B) Conteúdo de fibras de α-sinucleína, medido pela ligação à Tioflavina-T, na ausência ou presença de Aβ25-35/TFA, na etapa final da agregação.

A **Figura 6** mostra as imagens obtidas por AFM dos agregados no tempo final de fibrilação (13 dias). São mostradas duas imagens de cada condição de agregação, que diferem entre si pelo campo visualizado. Em todas as situações pode-se observar a presença de fibras, mesmo quando na presença de Aβ25-35. Na presença de Aβ25-35/TFA, as fibras parecem mais fragmentadas que nas outras condições, e nota-se a presença de agregados amorfos na presença de Aβ25-35, o que não é observado no controle. Nossos dados sugerem que Aβ25-35, na concentração utilizada, não inibe completamente a formação de fibras de α-sinucleína apesar da baixa ligação a tioflavina-T observada. Alternativamente, a formação de fibras de α-sinucleína com baixa afinidade pela sonda fluorescente poderia estar ocorrendo na presença de Aβ25-35, uma hipótese ainda não investigada.



**Figura 6:** Imagens de AFM das amostras no tempo final de agregação: (a)  $\alpha$ -sinucleína, (b)  $\alpha$ -sinucleína +  $\beta$ -amilóide (H<sub>2</sub>O) e (c)  $\alpha$ -sinucleína +  $\beta$ -amilóide (TFA). Cada condição apresenta duas imagens, que diferem entre si pelo campo visual escolhido. Nota-se principalmente a presença de fibras em todas as condições e agregados amorfos (alguns estão destacados por círculos azuis) apenas em (b) e (c).

O efeito do A $\beta$ 25-35 sobre a formação de fibras da  $\alpha$ -sinucleína pode estar ocorrendo via modificação das espécies presentes na fase de nucleação ou alteração do crescimento da fibra que ocorre na fase exponencial da cinética de fibrilação. Com o intuito de investigar em qual etapa da cinética de agregação da  $\alpha$ -sinucleína o A $\beta$ 25-35 possa estar interferindo, foram realizados experimentos de agregação na ausência de agitação e presença de sementes de  $\alpha$ -sinucleína. Sementes de  $\alpha$ -sinucleína são geradas através da fragmentação de fibras maduras por ultrassom. Estas fibras fragmentadas funcionam como moldes para o crescimento da fibra em presença dos monômeros da proteína. A Figura 7 mostra que na presença de sementes (5 % m/m) o efeito do A $\beta$ 25-35 é abolido, mesmo utilizando-se uma relação molar 1:2 entre  $\alpha$ -sinucleína e A $\beta$ 25-35. Na ausência de sementes e agitação pode-se observar a inexistência de qualquer aumento na ligação à Tioflavina-T, na presença ou ausência de A $\beta$ 25-35. Estes dados sugerem que o efeito do A $\beta$ 25-35 esteja restrito a fase de formação do núcleo (etapa lenta) do processo de agregação. Visto que os dados de AFM indicam que, mesmo em presença de A $\beta$ 25-35, ocorre a formação de fibras, pode-se especular que a interação da  $\alpha$ -sinucleína com o A $\beta$ 25-35 leva a formação de uma estrutura alterada na fase de nucleação, a qual evolui para fibras com menor ligação da Tioflavina-T. No entanto, uma vez em presença de fragmentos de fibras (sementes), o peptídeo A $\beta$ 25-35 não apresenta efeito sobre a extensão da fibra.

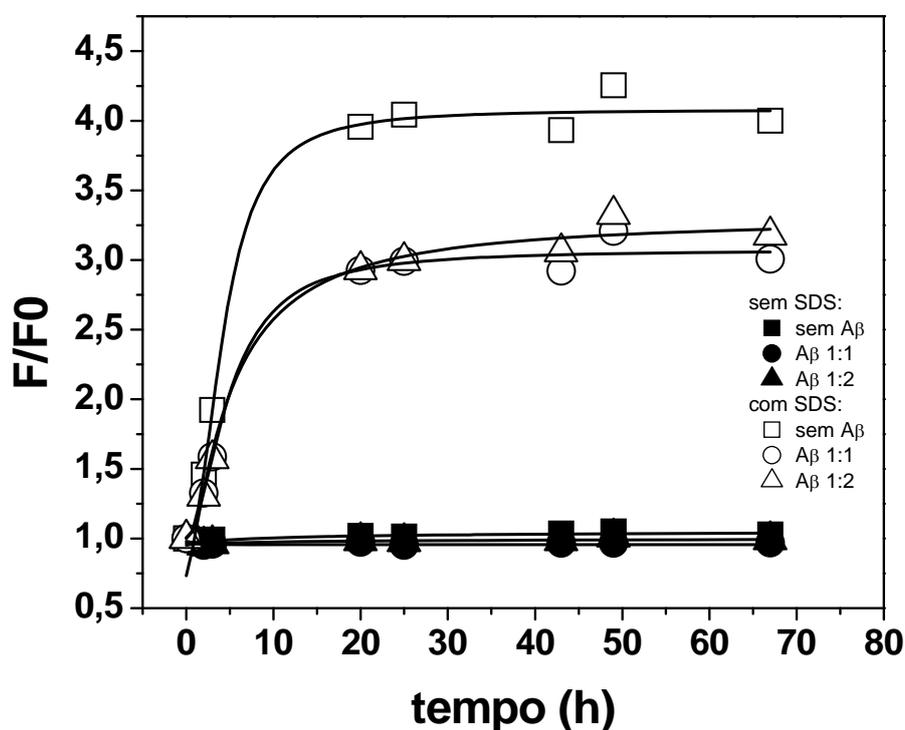


**Figura 7.** Agregação da  $\alpha$ -sinucleína  $50\mu\text{M}$  sem agitação, em tampão fosfato de sódio  $20\text{mM}$ ,  $\text{NaCl}$   $150\text{mM}$ ,  $\text{pH}$   $7,4$ , na presença ou ausência de sementes de  $\alpha$ -sinucleína ( $5\%$  m/m) e  $\text{A}\beta_{25-35}$  nas proporções molares de  $1:1$  ou  $1:2$  ( $\alpha$ -sinucleína: $\text{A}\beta_{25-35}$ ). Nota-se que na ausência de sementes, a fibrilação não ocorre, enquanto que na presença de sementes, ela ocorre e não é afetada pelo  $\text{A}\beta_{25-35}$ .

Fibras de  $\alpha$ -sinucleína podem ser geradas na ausência de agitação ou de sementes utilizando-se concentrações submicelares de SDS (Giehm, 2010). Fibras formadas na presença de SDS apresentam ligação à tioflavina-T semelhante ao observado com fibras geradas com agitação e na ausência de SDS, porém com estrutura mais curvilínea (“*worm-like*”) do que observada com as fibras clássicas que são mais retilíneas (dados não mostrados). O processo de formação de fibras de  $\alpha$ -sinucleína induzida por SDS ocorre apenas em relações estequiométricas na faixa de  $\sim 1:12$  entre  $\alpha$ -sinucleína e SDS. Concentrações superiores de SDS levam a uma inibição da formação de fibras. Além disso, em presença de SDS a fibrilação não é dependente da nucleação. Assim, fibras formadas na presença de SDS representam uma rota alternativa de fibrilação em relação às fibras formadas por agitação.

O efeito do peptídeo  $\text{A}\beta_{25-35}$  sobre a formação de fibras de  $\alpha$ -sinucleína em presença de SDS e na ausência de agitação foi investigada. A Figura 8 mostra que  $\alpha$ -sinucleína incubada a  $37^\circ\text{C}$ , na ausência de agitação, é incapaz de formar fibras no tempo

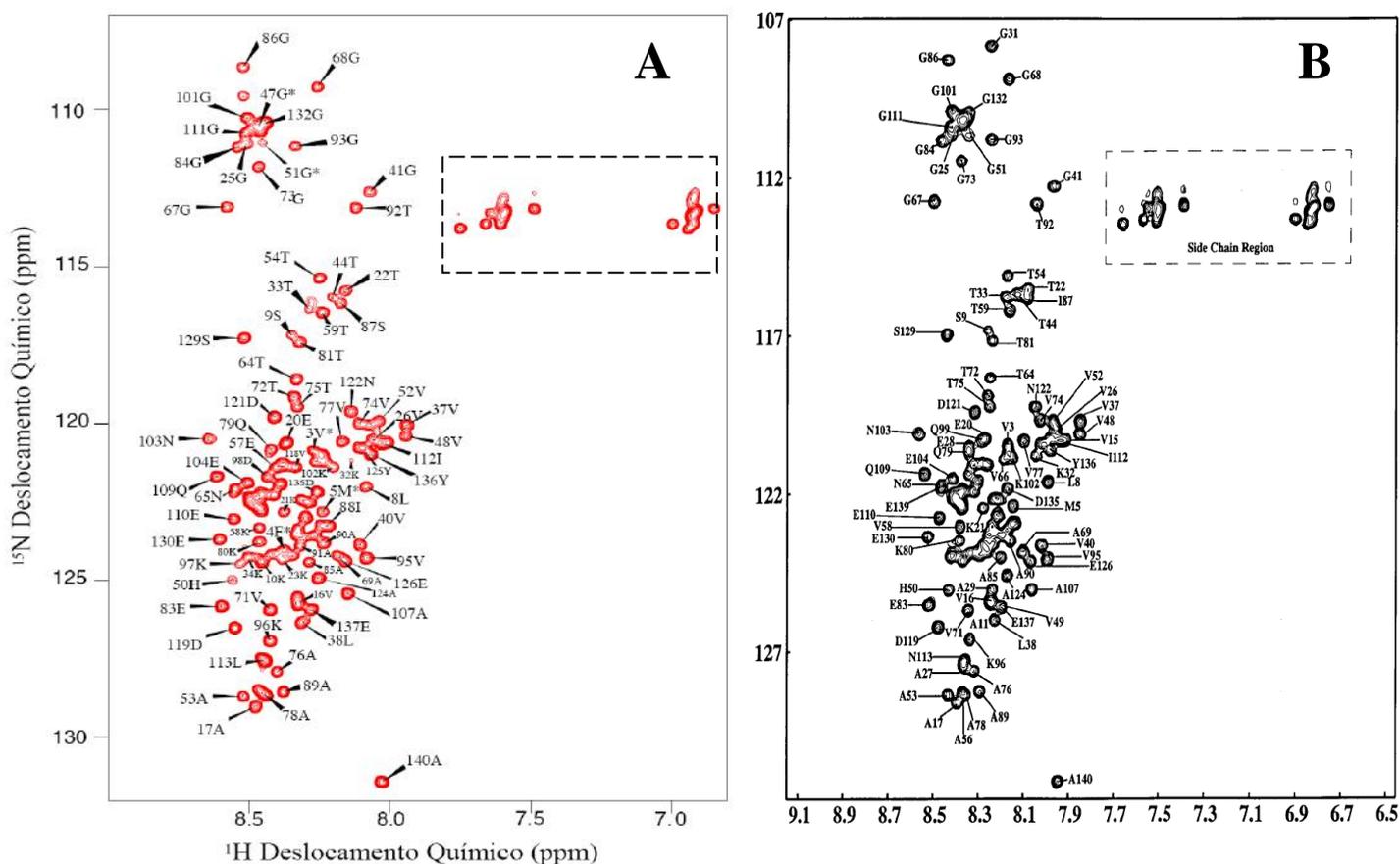
investigado, mesmo na presença ou ausência do peptídeo A $\beta$ 25-35. No entanto, quando a proteína é incubada na presença de SDS ocorre um rápido aumento na ligação à tioflavina-T, não sendo observada a etapa de nucleação da cinética de agregação. Este aumento rápido na formação de fibras ocorre mesmo em baixas concentrações de proteína. Em nossos experimentos, foram utilizadas concentrações de 50  $\mu$ M de  $\alpha$ -sinucleína. A cinética de agregação na ausência de agitação apresenta um comportamento que independe da concentração da proteína, sendo dependente apenas da relação entre a concentração de SDS e  $\alpha$ -sinucleína. Na presença do peptídeo A $\beta$ 25-35, pode-se observar um efeito inibidor sobre a formação de fibras, sendo que quantidades equimolares entre  $\alpha$ -sinucleína e o peptídeo A $\beta$ 25-35 apresentaram um efeito inibitório máximo; um aumento da concentração do peptídeo foi incapaz de aumentar a inibição. Este resultado contrasta com o observado na agregação induzida por agitação e na ausência de SDS, onde a inibição aumenta com o aumento na concentração do inibidor.



**Figura 8.** Agregação da  $\alpha$ -sinucleína 50 $\mu$ M sem agitação, em tampão fosfato de sódio 20mM, NaCl 150mM, pH 7,4, na presença e ausência de SDS e A $\beta$ 25-35. Nota-se que na ausência de SDS, a fibrilação não ocorre, enquanto que na presença de SDS, ela ocorre, sendo inibida pelo A $\beta$ 25-35. Esse efeito inibitório é bastante semelhante para proporções 1:1 e 1:2 de  $\alpha$ -sinucleína para A $\beta$ 25-35.

4.3 INTERAÇÃO ENTRE  $\alpha$ -SINUCLÉINA E  $\beta$ -AMILÓIDE

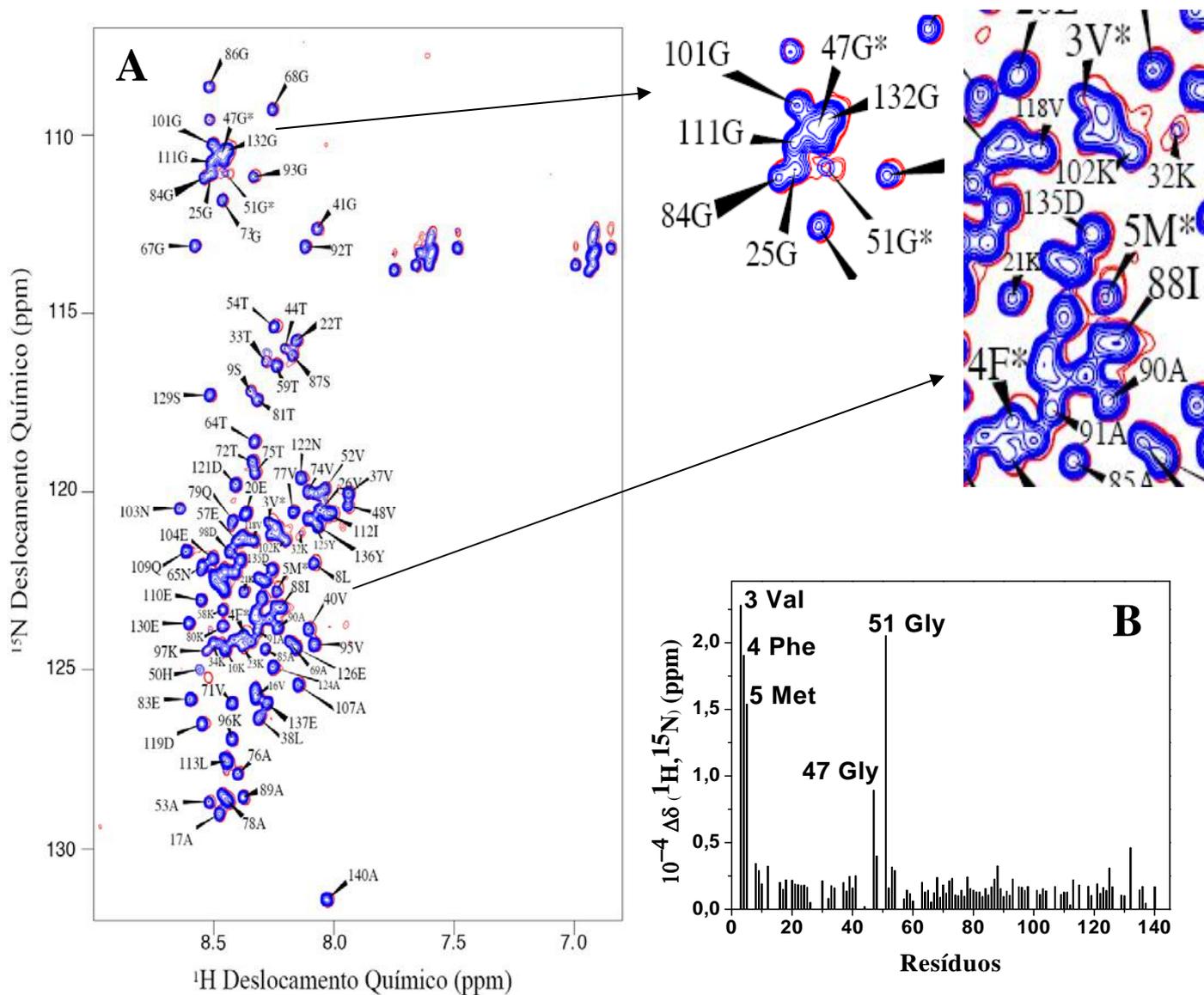
As bases moleculares da interação entre a  $\alpha$ -sinucleína e o peptídeo A $\beta$ 25-35 foram investigadas por RMN  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC. A **Figura 9** mostra os espectros de HSQC da  $\alpha$ -sinucleína obtida por nosso grupo (A) em comparação com o espectro descrito na literatura para o monômero desenovelado (B) (Eliezer, 2001). Pode-se observar que os espectros são altamente concordantes, confirmando a natureza monomérica e não estruturada da  $\alpha$ -sinucleína utilizada em nossos experimentos.



**Figura 9.** Espectros de  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC da (A)  $\alpha$ -sinucleína marcada preparada em tampão fosfato de sódio 10mM, NaCl 150mM, pH 7,4, contendo 10% de água deuterada, obtido a 15°C e (B) dado na literatura (Eliezer, 2001)

A **Figura 10** mostra o espectro de  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC da  $\alpha$ -sinucleína em presença do peptídeo A $\beta$ 25-35 numa relação molar 1:2 ( $\alpha$ -sinucleína:A $\beta$ 25-35). Os espectros da  $\alpha$ -sinucleína na ausência (em vermelho) e presença do A $\beta$ 25-35 (azul) foram sobrepostos para visualização das diferenças entre os espectros (painel A) e a variação de deslocamento químico para cada aminoácido ( $\Delta\delta$ ) foi determinada conforme Lenden e colaboradores (2009) (painel B). Nota-se que para os resíduos Val3, Phe4, Met5, Gly47 e Gly51, os valores de  $\Delta\delta$  foram 4 a 10 vezes maiores que para os demais resíduos, sugerindo que estes resíduos da  $\alpha$ -sinucleína possam estar envolvidos na interação com o peptídeo A $\beta$ 25-35. No entanto, os valores absolutos de  $\Delta\delta$  obtidos foram muito pequenos, o que pode indicar uma fraca interação entre os resíduos da proteína e o A $\beta$ 25-35. Experimentos em concentrações mais elevadas de A $\beta$ 25-35 são necessários para confirmar esta hipótese. Por outro lado, o resíduo His50 apresentou um  $\Delta\delta$  bastante elevado, o que pode ser atribuído ao fato deste resíduo ser muito sensível a pequenas variações de pH.

$\alpha$ -Sinucleína em presença de micelas de SDS, que resulta na formação de estrutura em  $\alpha$ -hélice na proteína, foi investigada na presença ou ausência do  $\beta$ -amilóide, por HSQC. Este estudo é relevante, pois se suspeita que a  $\alpha$ -sinucleína esteja envolvida no controle da fusão de vesículas pré-sinápticas, e, para tal, ela adota uma conformação em  $\alpha$ -hélices que possibilita a associação com vesículas. Este ambiente pode ser mimetizado *in vitro* através da adição de SDS em proporção 1:100 ( $\alpha$ -sinucleína:SDS). Além disso, a  $\alpha$ -sinucleína nesta conformação é mais propensa a agregar (Lee, 2002), apesar de não se saber exatamente se ela está envolvida com o início do processo de agregação. Comparando-se a **Figura 11** com a **Figura 10** pode-se observar que o espectro de HSQC da proteína na presença de SDS apresenta sinais mais dispersos que na ausência do detergente, o que é concordante com o fato da  $\alpha$ -sinucleína ter se estruturado. Na presença do peptídeo A $\beta$ 25-35 foi observado o descolamento em alguns sinais no espectro de HSQC em relação à proteína na ausência do peptídeo. Os aumentos mais significativos nos valores de  $\Delta\delta$  foram observados para os resíduos de Ala17, Ala19, Glu24, Gly47 e Gly51. Os valores absolutos de  $\Delta\delta$  mais uma vez foram muito pequenos.



**Figura 10:** (A) Sobreposição dos espectros de HSQC assinalados da  $\alpha$ -sinucleína isolada (vermelho) e na presença de de A $\beta$ 25-35 (azul) na proporção 1:2, em tampão fosfato de sódio 10mM, NaCl 150mM, pH 7,4, contendo 10% de água deuterada. Os aminoácidos com maior desvio estão destacados com um \* nos espectros, sendo as regiões onde eles se encontram ampliadas á direita. (B) gráfico de barras mostrando a diferença de deslocamento químico ( $\Delta\delta$ ) entre cada resíduo de aminoácido assinalado de cada espectro.



## 5 DISCUSSÃO

Estudos anteriores indicaram que os resíduos mais deslocados no espectro de HSQC da  $\alpha$ -sinucleína incubada com A $\beta$ 42 na presença de SDS são Gly67, Ala69, Gly73, Val74 e Thr81 (Mandal, 2006). Em nossos estudos, nenhum destes resíduos parecem estar envolvidos na interação da proteína com o A $\beta$ 25-35. Estudos da interação entre  $\alpha$ -sinucleína e A $\beta$ 25-35 na ausência de SDS por  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC não constam na literatura.

Embora  $\alpha$ -sinucleína fibrilar seja o maior componente nos corpos de Lewy (Conway, 2000b), alguns dados sugerem que estas estruturas podem ser inertes ou até mesmo protetoras na PD. Primeiro, no modelo dos camundongos transgênicos expressando a  $\alpha$ -sinucleína, observa-se que os sintomas característicos de PD são acompanhados pela formação de inclusões citoplasmáticas NÃO fibrilares de  $\alpha$ -sinucleína. Segundo, demonstrou-se que estruturas intermediárias da agregação da  $\alpha$ -sinucleína (protofibras) são capazes de promover permeabilização de vesículas e esta propriedade é sensível às mutações da proteína ligadas a PD familiar (Conway, 2000a).

Por outro lado, protofibras de  $\alpha$ -sinucleína são intermediários transientes do processo de agregação, que apresentam diversas morfologias e propriedades biológicas. Dessa forma, ao incubar a  $\alpha$ -sinucleína com um inibidor de sua agregação, pode ocorrer um aumento ou diminuição da toxicidade dos agregados formados, o que vai depender do mecanismo de inibição, que, por sua vez, determina quais espécies são estabilizadas pela molécula moduladora. Íons  $\text{Cu}^{2+}$ , por exemplo, inibem a agregação da  $\alpha$ -sinucleína ao mesmo tempo em que aumentam a citotoxicidade das espécies formadas no tempo final de agregação (Kim, 2001). Este mesmo trabalho mostrou que eosina também inibe a agregação, porém tem efeito contrário ao cobre, reduzindo a toxicidade dos agregados de  $\alpha$ -sinucleína. Já selegilina, um fármaco com atividade anti-parkinsoniana utilizado no tratamento sintomático de PD, é capaz de retardar a fase de nucleação da agregação da  $\alpha$ -sinucleína e reduzir o conteúdo de fibras formadas. Interessantemente, selegilina não altera significativamente o espectro de HSQC da proteína (Braga, 2011) assim como observado em nossos dados com o peptídeo A $\beta$ 25-35 e na interação com dopamina (Moussa, 2008)

O aumento do tempo da “fase lag” também é um dado importante relacionado à agregação da  $\alpha$ -sinucleína na presença do A $\beta$ 25-35. Já foi reportado que outras proteínas, como a  $\alpha$ (s1)-caseína são capazes de produzir um efeito semelhante na agregação do

A $\beta$ 40 (Carrotta, 2012), enquanto que o fármaco selegilina aumenta a duração da fase lag da agregação da  $\alpha$ -sinucleína (Braga, 2011).

Doenças que envolvem agregação concomitante de  $\alpha$ -sinucleína e dos peptídeos A $\beta$  são geralmente mais severas e mais raras que as patologias típicas de PD ou AD, como é o caso da Demência com Corpos de Lewy (DLB) e a Doença de Parkinson com Demência (PDD). Assim, a interação entre estas proteínas pode ser associada à formação de espécies mais tóxicas a neurônios. Porém, seria necessária a realização de ensaios de neurotoxicidade dos diferentes agregados de  $\alpha$ -sinucleína, formados na ausência ou presença de A $\beta$ 25-35, para confirmar esta hipótese. Kim *et al.* (2011) mostrou que no tempo final de agregação, os agregados de  $\alpha$ -sinucleína gerados na presença de A $\beta$ 25-35 possuem toxicidades semelhantes aos agregados de  $\alpha$ -sinucleína ou A $\beta$ 25-35 (Kim, 2011). Entretanto, é possível que a influência do A $\beta$ 25-35 sobre a toxicidade dos agregados de  $\alpha$ -sinucleína ocorra numa fase específica da agregação como, por exemplo, na etapa de formação de protofibras. Assim, a inibição da fibrilação da  $\alpha$ -sinucleína por A $\beta$ 25-35 poderia resultar em protofibras mais tóxicas ou com um tempo de vida maior e, portanto, resultar em uma sinergia entre estas proteínas no sentido de aumentar a toxicidade dos agregados.

Em nosso trabalho, apenas a agregação da  $\alpha$ -sinucleína foi observada nas condições de agregação utilizadas; A $\beta$ 25-35, na ausência de  $\alpha$ -sinucleína, não gerou aumento na ligação à tioflavina-T, sugerindo ausência de fibras. Porém, outras espécies, como oligômeros solúveis ou agregados amorfos do peptídeo, poderiam estar sendo gerados e, assim, estarem envolvidos na atividade anti-fibrilogênica do A $\beta$ 25-35. Esta hipótese poderia ser verificada pela obtenção de imagens de microscopia dos agregados de A $\beta$ 25-35 gerados durante a agregação. Estudos futuros visarão aprofundar o entendimento dos mecanismos da interação da  $\alpha$ -sinucleína com os diferentes estados do A $\beta$ 25-35 e, assim, fornecer novas informações sobre a relação entre a  $\alpha$ -sinucleína, o peptídeo A $\beta$ 25-35 e as demências com corpos de Lewy.

## 6 CONCLUSÕES

- O peptídeo A $\beta$ 25-35 foi capaz de retardar a formação de fibras de  $\alpha$ -sinucleína, como verificado pela redução na ligação à sonda fluorescente da Tioflavina-T.
- As imagens de AFM revelaram que os agregados formados na presença de A $\beta$ 25-35 apresentam estrutura fibrilar, além de estruturas amorfas.
- Os espectros de  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC revelaram uma pequena variação de deslocamento químico ( $\Delta\delta$ ) nos aminoácidos Val3, Phe4, Met5, Gly47 e Gly51 entre os espectros na presença e ausência de A $\beta$ 25-35.
- Na presença de SDS, onde a  $\alpha$ -sinucleína adquire estrutura em  $\alpha$ -hélice, os maiores  $\Delta\delta$  foram observados para os resíduos Ala17, Ala19, Gln24, Gly47 e Gly51. Apesar das variações serem grandes se comparadas a outros resíduos, seus valores absolutos são muito pequenos, não sendo possível afirmar definitivamente que estes são os sítios de interação entre as proteínas.
- No conjunto, este trabalho traz novos indícios para a interação entre o peptídeo A $\beta$ 25-35 e a  $\alpha$ -sinucleína. A interação entre proteína e peptídeo e o fato destas fibras e agregados de  $\alpha$ -sinucleína formados na presença de  $\beta$ -amilóide poderem ter estruturas diferenciadas podem auxiliar na compreensão de doenças que envolvem a formação de corpos de Lewy concomitante com as placas senis, como a DLB.

## 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como continuidade deste trabalho, propõe-se estudos comparativos de RMN no estado sólido das fibras de  $\alpha$ -sinucleína formadas na ausência e presença de A $\beta$ 25-35, ensaios de neurotoxicidade dos agregados e obtenção dos espectros de HSQC da  $\alpha$ -sinucleína na presença de maiores concentrações de A $\beta$ 25-35.

## 8 REFERÊNCIAS

- ABELIOVICH, A. *et al.* Mice lacking  $\alpha$ -synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. **Neuron**, v. 25, p. 239-252, 2000.
- BETARBET, R. *et al.* Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nat. Neurosci.** v. 3, p.1301–1306, 2000.
- BRAGA, C.A. *et al.* The anti-Parkinsonian drug selegiline delays the nucleation phase of  $\alpha$ -synuclein aggregation leading to the formation of nontoxic species. **J. Mol. Biol.** v.405, p.254–273, 2011.
- CARROTA *et al.* Inhibiting the effect of  $\alpha$ (s1)-casein on A $\beta$ (1-40) fibrillogenesis. **Biochim. Biophys. Acta.** v.1820, no.2, p.124-132, 2012.
- CHANDRA, S. *et al.* A broken alpha-helix in folded alpha-synuclein. **J. Biol. Chem.** v.278, n.17, p.15313-15318, 2003.
- CONWAY, K.A. *et al.* Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both  $\alpha$ -synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.97, p.571–576, 2000a.
- CONWAY, K.A.; HARPER, J.D.; LANSBURY, P.T. Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. **Biochemistry**, v.39, p.2552–2563, 2000b.
- DICKSON, Donald W. The pathogenesis of senile plaques. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** v.56, p.321-339, 1997
- ELIEZER, D. *et al.* Conformational properties of  $\alpha$ -synuclein in its free and lipid-associated States. **J. Mol. Bio.** v.307, p.1061-1073, 2001
- FEANY, M.B.; BENDER, W. A Drosophila model of Parkinson's disease. **Nature**, v. 404, p. 394–398, 2000.
- FEARNLEY, J.M.; LEES, A.J. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. **Brain**, v. 114, p.2283–2301, 1991.
- GEORGE, J. M. *et al.* Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. **Neuron**, v.15, 361–372, 1995.
- GIBB, W.R.; LEES, A.J. Anatomy, pigmentation, ventral and dorsal sub-populations of the substantia nigra and differential cell death in Parkinson's disease. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v. 54, p.388–396, 1991.

GIEHM, L. *et al.* SDS-Induced Fibrillation of  $\alpha$ -Synuclein: An Alternative Fibrillation Pathway. **J. Mol. Biol.** v.401, p.115-133, 2010.

GOEDERT, Michel. The significance of tau and alpha-synuclein inclusions in neurodegenerative diseases. **Curr. Opin. Genet. Dev.** v.11, p.343-51, 2001.

GOEDERT, M.; SPILLANTINI, M.G.; DAVIES, S.W. Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases. **Curr. Opin. Neurobiol.** v.8, p.616-632, 1998.

HUGHES, E.; BURKE, R.M.; DOIG, A.J. Inhibition of toxicity in the  $\beta$ -amyloid peptide fragment  $\beta$ -(25-35) using N-methylated derivatives. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, no.33, p.25109-25115, 2000

IWAI, A. *et al.* The precursor protein of non-A $\beta$  component of Alzheimer's disease amyloid (NACP) is a presynaptic protein of the central nervous system. **Neuron**, v. 14, p.467-475, 1995.

JENCO, J.M. *et al.* Regulation of phospholipase D2: Selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by - and -synucleins. **Biochemistry**, v. 37, p. 4901-4909, 1998.

JENSEN ,P.H. *et al.* Binding of -synuclein to rat brain vesicles is abolished by familial Parkinson's disease mutation. **J Biol Chem**, v. 273, pp. 26292-26294, 1998.

KIM, Y.S. *et al.* Multiple ligand interaction of  $\alpha$ -synuclein produced various forms of protein aggregates in the presence of A $\beta$ 25-35, copper, and eosin. **Brain Research**, v.908, p.93-98, 2001.

KISH, S.J., *et al.* Aging produces a specific pattern of striatal dopamine loss: implications for the etiology of idiopathic Parkinson's disease. **J. Neurochem.** v. 58, p.642-648, 1992.

LEE, V.M. *et al.* **Fatal attractions: protein aggregates in neurodegenerative Disorders.** Berlin ; New york: Springer, 2000.

LEE, H.J; CHOI, C.; LEE, S.J. Membrane-bound alpha-synuclein has a high aggregation propensity and the ability to seed the aggregation of the cytosolic form. **J. Biol. Chem.** V.277, p.671-678, 2002.

LENDEL, C. *et al.* On the mechanism of nonspecific inhibitors of protein aggregation: dissecting the interactions of alpha-synuclein with Congo red and lacmoid. **Biochemistry**, v.48, p.8322-8334, 2009 .

LONDON, C.L.; ASHALL, F.; GOATE, A.M. Exploring the etiology of Alzheimer disease using molecular genetics. **J. Am. Med. Assoc.** v.277, p.825-831, 1997.

LIU, C.W. *et al.* A precipitating role for truncated alpha-synuclein and the proteasome in alpha-synuclein aggregation- implications for pathogenesis of Parkinson's Disease. **J. Biol. Chem.** v.280, p.22670-22678, 2005.

MALIASH, E. *et al.* Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice; implications for neurodegenerative disorders. **Science**, v.287, p.1265–1267, 2000.

MANDAL, P.K. *et al.* Interaction between A $\beta$  Peptide and  $\alpha$ -Synuclein: Molecular Mechanisms in Overlapping Pathology of Alzheimer's and Parkinson's in Dementia with Lewy Body Disease. **Neurochem. Res.** V.31, p.1153-1162, 2006.

MARSDEN, Charles David. Parkinson's disease. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v.57, p.672–681, 1994.

MCGEER, P.L.; MCGEER, E.G.; SUZUKI, J.S. Aging and extrapyramidal function. **Arch Neurol**, v. 34, p.33–35, 1977.

McKHANN, G. *et al.* Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force. **Neurology**, v.34, p.939–944, 1984

MOUSSA, C. E. H. *et al.* Dopamine differentially induces aggregation of A53T mutant and wild type alpha-synuclein: Insights into the protein chemistry of Parkinson's disease. **Biological Sciences**, v.365, no. 4, p.833-839, 2008.

PAULETA, S.R.; MOURA, J.J.G. RMN biomolecular – desenvolvimentos recentes. Aplicações modernas da RMN a biologia. **Química**, 117:31-37 (2010)

POLYMEROPOULOS, M.H. *et al.* Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. **Science**, v.276, p.2045–2047, 1997.

RAO, J.N. *et al.* Effect of pseudorepeat rearrangement on alpha-synuclein misfolding, vesicle binding, and miscelle binding. **J. Mol. Biol.** v.390 n.3, p.516-529, 2009.

RAY, W.J.; ASHALL, F.; GOATE, A.M. Molecular pathogenesis of sporadic and familial forms of Alzheimer's disease. **Mol. Med. Today** v.4, no.4, p.151-157, 1998.

SCHERMAN, D. *et al.* Striatal dopamine deficiency in Parkinson's disease: role of aging. **Ann. Neurol.** v. 26, p. 551–557, 1989.

SERPELL, L.C. *et al.* Fiber diffraction of synthetic -synuclein filaments shows amyloid-like cross- conformation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p.4897–4902, 2000.

SPILLANTINI, M.G. *et al.* Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 95, p. 6469–6473, 1998.

TROJANOWSKI, J.Q. *et al.* Fatal attractions: abnormal protein aggregation and neuron death in Parkinson's disease and Lewy body dementia. **Cell Death & Differentiation**, v.5, p.832-837, 1998.

TROJANOWSKI, J.Q.; LEE, V.M. "Fatal attractions" of proteins. A comprehensive hypothetical mechanism underlying Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v.924, p.62-67, 2000.

YANKNER, B.A.; DUFFY, L.K.; KIRSCHNER, D.A. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid  $\beta$  protein: Reversal by tachykinin neuropeptides. **Science**, v.250, p.279-282, 1990.

YOKOTA, O. *et al.* NACP/alpha-synuclein, NAC, and beta-amyloid pathology of familial Alzheimer's disease with the E184D presenilin-1 mutation: a clinicopathological study of two autopsy cases. **Acta Neuropathol.** v.104, p.637–648, 2002.