UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
LABORATÓRIO DE NEUROCIÊNCIAS E PROTEÔMICA

CARLA ROSSINI CREPALDI

Análise interactiva da VDAC em mitocôndrias neuronais bovina e
murina

Pirassununga/SP – Brasil

2012

CARLA ROSSINI CREPALDI

Análise interactiva da VDAC em mitocôndrias neuronais bovina e murina

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Área de concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Marcelo de Cerqueira César

Pirassununga/SP – Brasil

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

C917a Crepaldi, Carla Rossini
Análise interactômica da VDAC em mitocôndrias
neurais em espécies bovina e murina / Carla Rossini
Crepaldi. -- Pirassununga, 2012.
66 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Ciências Básicas.
Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
Animal.
Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Cerqueira César.

1. VDAC 2. Hexoquinase 3. BN/SDS PAGE
4. Interactômica. I. Título.

Aos meus avôs, José e Luiza,

Vocês são meu exemplo de luta, força e determinação. Considero-me privilegiada por ter avôs como vocês. Muito obrigada por sempre terem sido tão presentes em todas as etapas fundamentais da minha vida. Por me fazer sentir que não importasse onde eu estivesse eu sempre teria o apoio e compreensão de vocês.

À minha mãe, Cleonice,

Quem proporcionou os meios e a estrutura onde eu me formei, intelectualmente e moralmente. Obrigada, pela confiança em mim depositada. As minhas conquistas serão sempre suas também.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu pai, pelo suporte para que eu pudesse alcançar todos os meus objetivos da melhor maneira possível.

À minha irmã, Caroline, por sempre me fazer sorrir em qualquer situação. Tenho muito carinho e admiração por você.

Ao Bruno, por todo seu amor, apoio, paciência e companheirismo tornando menos árdua a caminhada em busca dos meus sonhos.

À minha madrinha, Maria Luiza, pelo incentivo e palavras de carinho recebidos das mais diversas formas em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, *Prof. Dr. Marcelo de Cerqueira César*, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, por me guiar nos primeiros passos na ciência e compartilhar os seus conhecimentos, sendo uma referência como pesquisador.

Ao *Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles*, pelo apoio incondicional e ensinamentos que proporcionaram o desenvolvimento desse trabalho.

Ao *Prof. Dr. José César Rosa*, pela colaboração e conhecimentos imprescindíveis para a realização desse projeto.

À *Dra. Hélien Julie Laure*, durante o preparo das inúmeras amostras e obtenção dos resultados no espectrômetro de massas.

À *Andréa Cristina Tesch*, pela ajuda inestimável em todos os trabalhos do laboratório.

Ao *Phelipe Augusto Mariano Vitale*, por dividir comigo o anseio de “fosforilar” sobre assuntos científicos.

Ao grupo do *Centro de Química de Proteínas (FMRP/USP)*, por me acolherem tão bem durante uma etapa primordial desse projeto.

À *Dra. Flávia Simone Munim*, pela grande ajuda na execução desse projeto.

À *Globoaves* pelo fornecimento do material biológico necessário ao desenvolvimento do projeto.

À **FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, que aprovaram e financiaram a execução desse projeto.

It is an actual fact that, leaving aside the flatteries of self-love, the garden of neurology holds out to the investigator captivating spectacles and incomparable artistic emotions. In it, my aesthetic instincts found full satisfaction at last. Like the entomologist in pursuit of brightly coloured butterflies, my attention hunted, in the flower garden of the gray matter, cells with delicate and elegant forms, the mysterious butterflies of the soul, the beating of whose wings may some day – who knows ? – clarify the secret of mental life.

In some way or other, the simple admiration of the cellular form was one of my greatest delights. For even from the aesthetic point of view the nervous tissue contains the most charming attractions. Is there in our parks any tree more elegant and luxuriant than the Purkinje cell of the cerebellum or the psychic cell, that is the famous cerebral pyramid?

Santiago Ramon y Cajal

“Recollections of My Life”

RESUMO

ROSSINI CREPALDI, C. **Análise interactiva da VDAC em mitocôndrias neuronais em espécies bovina e murina**. 2012. 66f. Dissertações (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

A VDAC é a proteína mais abundante da membrana mitocondrial externa. Possui diversas funções, tais como o controle da troca de metabólitos, através da membrana, e a participação no maquinário apoptótico. Estudamos o interactoma da VDAC com as proteínas mitocondriais neuronais do cérebro bovino e murino, a fim de compreender se a expressão diferenciada da VDAC1 e VDAC2 verificada entre essas células estão associadas às diferenças nas interações da VDAC. Os complexos proteicos foram analisados por 2D Blue Native SDS-PAGE e identificados via MALDI-TOF TOF usando o software Mascot e o banco de dados NCBI nr. Foram identificados 27 e 46 spots em murino e bovino, respectivamente. Nós identificamos proteínas solúveis e incorporadas na membrana que não são participantes da fosforilação oxidativa, dentre elas a aldeído desidrogenase e muitas outras constituintes de complexos mitocondriais já conhecidos tão bem como novos, tais como a *putative stomatin-like protein 2 complex* e a *switch-associated protein 70*. Nossos resultados mostraram que os neurônios bovinos possuem mais complexos (5) contendo a VDAC do que em ratos (1), os quais indicam uma cinética diferencial de acoplamento e desacoplamento. Interessantemente, a lista contendo as proteínas identificadas inclui algumas proteínas conhecidas ou supostamente localizadas em compartimentos não-mitocondriais, por exemplo, a *myc-induced nuclear antigen*. O interactoma diferencial da VDAC entre as espécies bovina e murina, evidencia a presença de uma base comum, porém com diferentes ambientes estruturais, as quais podem ser a base da diferença entre os sítios de ligação A e B observados nas diferentes espécies.

Palavras-chave: VDAC, Hexoquinase, BN/SDS PAGE, Interactiva

ABSTRACT

ROSSINI CREPALDI, C. **Interactomic analysis of VDAC in rat and bovine mitochondria in neuronal cells.** 2012. 66p. MsC. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

The voltage dependent anion channel (VDAC) is the most abundant protein of outer mitochondrial membrane. VDAC controls metabolite exchange through this membrane and the apoptosis machinery. We studied the interactome of VDAC with mitochondrial proteins of neuronal cells from rat and bovine brain. We wished to understand if the differential expression of VDAC1 and VDAC2 verified between these cells was linked to differences in the VDAC interactions. Protein complexes were analyzed by 2D Blue Native SDS-PAGE and were identified by MALDI-TOF TOF using Mascot software against the NCBI nr database. Number of 27 e 46 spots were identified from rat and bovine brain, respectively. We identified soluble and membrane-embedded non-OXPHOS proteins, among them aldehyde dehydrogenase, and many as constituents of known mitochondrial complexes as well as novel ones such as putative stomatin-like protein 2 complex and switch-associated protein 70. Our results showed that bovine neurons had more protein complexes (5) containing VDAC than rat cells (1), which indicates a differential kinetics of assembly or disassembly. Interestingly, the identification list included some proteins known or presumed to be localized to nonmitochondrial compartments, for example, myc-induced nuclear antigen. Our results support evidences of differential apoptotic and energetic mechanisms verified in these brains. The differential VDAC interactome between bovine and murine, support evidences of a common base, but with different structural environment, which may be the basis of the difference between the binding sites A and B observed in these brains.

Keywords: VDAC, Hexokinase, BN/SDS PAGE, Interactomic

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ILUSTRAÇÃO 1. ESQUEMA DE ACOPLAMENTO DA HEXOQUINASE A VDAC. UM SISTEMA QUE UTILIZA E PRODUZ ATP EM CÉREBROS. OBSERVE OS DOIS TIPOS DE LIGAÇÃO DA HEXOQUINASE À VDAC.....	17
ILUSTRAÇÃO 2. GEL DESNATURANTE TRICINA-SDS. EM A - GEL DE CORRIDA TRICINA-SDS E 10% DE ACRILAMIDA; B - GEL DE EMPILHAMENTO TRICINA-SDS E 6% DE ACRILAMIDA; C – “SPACER” GEL TAMPÃO DE GEL NATIVO E 4% ACRILAMIDA. BN-PAGE – TIRA RECORTADA DO GEL NATIVO, PREVIAMENTE INCUBADA E FERVIDA COM 9% B-MERCAPTOETANOL E INCUBADA 125MG DE IODOACETAMIDA.	29
ILUSTRAÇÃO 3. GÉIS NATIVOS EM GRADIENTE DE 6 A 13% DE ACRILAMIDA, CORADOS COM AZUL DE COOMASSIE. A-AMOSTRA MURINA E B-AMOSTRA BOVINA.	32
ILUSTRAÇÃO 4. AMOSTRA NEURONAL MURINA TRATADA COM 1% DDM. (A)) TIRA DE GEL NATIVO EM GRADIENTE 6-13% RECORTADA, INCUBADA EM SOLUÇÃO DESNATURANTE E FERVIDA COM 9% B-MERCAPTOETANOL E INCUBADA NOVAMENTE EM 125MG DE IODOACETAMIDA/ 5 ML. (B) IMMUNOBLOTTINGS REALIZADOS P PARA VDAC1 E 2, EVIDENCIANDO A SOBRAPOSIÇÃO DAS VDACs 1 E 2, ALOCADAS NO PRIMEIRO COMPLEXO (697 KDA) DA ESPÉCIE MURINA.	33
ILUSTRAÇÃO 5. AMOSTRA NEURONAL BOVINA TRATADA COM 1% DDM. (A) TIRA DE GEL NATIVO EM GRADIENTE 6-13% RECORTADA, INCUBADA EM SOLUÇÃO DESNATURANTE E FERVIDA COM 9% B-MERCAPTOETANOL E INCUBADA NOVAMENTE EM 125MG DE IODOACETAMIDA/ 5 ML. (B) IMMUNOBLOTTINGS REALIZADOS PAR A VDAC1 E 2, EVIDENCIANDO A SOBREPOSIÇÃO DAS VDACs 1 E 2, ALOCADAS NOS CINCO PRIMEIROS COMPLEXOS, COMPLEXO 1 (678 KDA), COMPLEXO 2 (600 KDA), COMPLEXO 3 (548 KDA), COMPLEXO 4 (447 KDA) E COMPLEXO 5 (341 KDA) NA ESPÉCIE BOVINA.	33
ILUSTRAÇÃO 6. SDS-PAGE DE QUATRO PRÉ-COMPLEXOS E UM COMPLEXO ASSOCIADO À VDAC NA ESPÉCIE BOVINA.	34
ILUSTRAÇÃO 7. ESQUEMA DE ACOPLAMENTO DAS PROTEÍNAS DOS PRÉ-COMPLEXOS ATÉ A FORMAÇÃO DO SUPERCOMPLEXO PODE SER OBSERVADO EM DIFERENTES CORES, COMPLEXO I: AMARELO; PRÉ-COMPLEXO II: ROXO; PRÉ-COMPLEXO III: VERDE; PRÉ-COMPLEXO IV: AZUL E PRÉ-COMPLEXO V: ROSA.....	38
ILUSTRAÇÃO 8. SDS-PAGE DO COMPLEXO ASSOCIADO À VDAC NA ESPÉCIE MURINA.	43
ILUSTRAÇÃO 9. REPRESENTAÇÃO DAS PROTEÍNAS ENCONTRADAS NO COMPLEXO PELO BN-SDS PAGE E MS. FORAM IDENTIFICADAS 14 PROTEÍNAS EM COMUM NO SUPERCOMPLEXO DA ESPÉCIE MURINA E BOVINA. A - GEL BN/SDS PAGE ESPÉCIE AVIAR; B - GEL BN/SDS PAGE ESPÉCIE BOVINA.....	48
ILUSTRAÇÃO 10. FUNÇÕES DAS PROTEÍNAS INTERACTANTES COM A VDAC.	51

LISTA DE TABELA

TABELA 1. IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS ASSOCIADAS À VDAC NA ESPÉCIE BOVINA.....	35
TABELA 2. IDENTIFICAÇÃO RESULTANTE DOS COMPLEXOS PROTÉICOS ASSOCIADOS À VDAC NA ESPÉCIE MURINA.	44
TABELA 3. COMPONENTES PROTÉICOS DIFERENCIAIS ENTRE A ESPÉCIE BOVINA E MURINA.....	50
TABELA S1. IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS CONTIDAS NA FIGURA 5 VIA MALDI- TOF TOF, NA ESPÉCIE MURINA.	53
TABELA S2. IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS CONTIDAS NA FIGURA 5 VIA MALDI- TOF TOF, NA ESPÉCIE BOVINA.	54

LISTA DE SIMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ADP:	Difosfato de Adenosina
ANT:	<i>adenine nucleotide transporter</i>
ATP:	trifosfato de adenosina
AATM:	Aspartate aminotransferase mitochondrial
ABD12:	Monoacylglycerol lipase ABHD12
ACON:	Aconitate hydratase mitochondrial
ADT1:	ADP/ATP translocase 1
ADT2:	ADP/ATP translocase 2
ADT3:	ADP/ATP translocase 3
ATPA:	<i>ATP synthase subunit alpha</i>
AT5F1:	<i>ATP synthase subunit b mitochondrial</i>
AT5H:	<i>ATP synthase subunit d mitochondrial</i>
ATPB:	<i>ATP synthase subunit beta</i>
ATPG:	<i>ATP synthase subunit gamma mitochondrial</i>
ATPO:	<i>ATP synthase subunit O mitochondrial</i>
BAK:	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
BAX:	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl2:	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL-xL:	<i>B-cell lymphoma extra large</i>
CSA:	ciclosporina A
CHCHD3:	<i>Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3</i>
CoA:	Coenzima A
CY1:	<i>Cytochrome c1 heme protein mitochondrial</i>
DHE3:	<i>Glutamate dehydrogenase 1</i>
EF-Tu mitochondrial:	<i>mitochondrial elongation factor tu</i>
FEI:	fotoestimulação intermitente
GRP75:	<i>Stress-70 protein mitochondrial</i>
HXK:	hexoquinase
MBP:	<i>Myelin basic protein</i>
MDHM:	<i>Malate dehydrogenase mitochondrial</i>
MME:	Membrana mitocondrial externa
MMI:	Membrana mitocondrial interna
MJ:	Metil-jasmonato
MPCP:	<i>Phosphate carrier protein</i>

MMS22:	<i>Protein MMS22-like</i>
M2OM:	<i>Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein</i>
NNTM:	<i>NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial</i>
NDUA8:	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8</i>
NDUA9:	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9</i>
NDUAA:	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10</i>
NDUBA:	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10</i>
NDUS1:	<i>NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit mitochondrial</i>
NDUS3:	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3 mitochondrial</i>
NDUS8:	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8 mitochondrial</i>
NDUV2:	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2 mitochondrial</i>
PTP:	<i>Permeability Transition Pore</i>
PHB:	<i>Prohibitin</i>
PHB2:	<i>Prohibitin-2</i>
PTX3:	<i>Pentraxin-related protein</i>
QCR1:	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 1 mitochondrial</i>
QCR2:	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 2 mitochondrial</i>
RPC1:	<i>DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC1</i>
SRSF7:	<i>Serine/arginine-rich splicing factor 7</i>
SWAP70:	<i>Switch-associated protein 70</i>
TCPQ:	<i>T-complex protein 1 subunit theta</i>
UBP33:	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 33</i>
UCRI:	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske mitochondrial</i>
UT14A:	<i>U3 small nucleolar RNA-associated protein 14 homolog A</i>
VDAC 1:	<i>voltage dependent anion selective channel protein 1</i>
VDAC 2:	<i>voltage dependent anion selective channel protein 2</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS.....	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS IMPLICADAS NO COMPLEXO PROTÉICO HEXOQUINASE-VDAC PRESENTE NOS CÉREBROS DE RATO, BOVINO E AVIAR.....	26
3.1.1 <i>Obtenção das amostras.....</i>	26
3.1.2 <i>Isolamento mitocondrial.....</i>	27
3.1.3 <i>Solubilização das proteínas mitocondriais.....</i>	27
3.1.4 <i>Eletroforese em condições nativas (BN-PAGE).....</i>	28
3.1.5 <i>Eletroforese desnaturante bidimensional tricina-SDS PAGE.....</i>	29
3.1.6 <i>Western-blotting.....</i>	31
3.1.7 <i>Espectrometria de Massas (MALDI - TOF TOF).....</i>	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 SEPARAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTÉICOS POR BN-SDS PAGE.	32
4.2 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA INTERAÇÃO DOS COMPLEXOS PROTÉICOS ASSOCIADOS À VDAC.....	34
4.2.1 <i>Análise da função dos componentes protéicos no cérebro bovino.</i>	34
4.2.2 <i>Dinâmica de formação dos complexos protéicos na espécie bovina.....</i>	43
4.2.3 <i>Análise da função dos componentes protéicos no cérebro murino.....</i>	43
4.2.4 <i>Comparação entre os componentes proteicos dos supercomplexos de murino e bovino</i>	48
4.2.4.1 <i>Análises da expressão diferenciada dos componentes do supercomplexo protéico nas diferentes espécies.....</i>	51
5 CONCLUSÕES	53
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

1 Introdução

A VDAC (*voltage dependent anion selective channel*), também conhecida como porina, é a proteína mais abundante presente na membrana mitocondrial externa (DESAGHER; MARTINOU, 2000). Seu canal apresenta um formato ligeiramente côncavo cujas dimensões são de aproximadamente 3,5 x 3,1 x 4,0nm (BAYRHUBER *et al.*, 2008).

A VDAC é um barril β , composto por β folhas e uma α hélice N-terminal anfipática. Há muita controvérsia sobre o real número de β folhas que compõe o β barril. Segundo Abu-Hamad *et al.* (2009) e Bayrhuber *et al.* (2008), o barril é formado por 19 β folhas, já De Pinto *et al.* (2003) acreditam que sejam 13 β folhas, enquanto que Vyssokikh e Brdiczka (2004) afirmam ser 16 β folhas.

Diversos estudos discutem sobre a localização da α hélice N-terminal na VDAC: voltada ao citoplasma (DE PINTO *et al.*, 2003), atravessando a membrana (COLOMBINI, 2004), paralela à superfície da membrana externa (REYMANN *et al.*, 1995) ou posicionada no interior do poro (BAYRHUBER *et al.*, 2008). Essa divergência de localização pode ser explicada devido à flexibilidade da α hélice N-terminal. Essa flexibilidade é muito importante para o canal de voltagem e para as interações proteína-proteína da VDAC (BAYRHUBER *et al.*, 2008).

Estudos revelam que a região α hélice N-terminal da VDAC apresenta diversas funções. Verificou-se que a deleção parcial ou completa da α hélice N-terminal causa modificação na atividade eletrofisiológica da porina (KOPPEL *et al.*, 1998), já em células que super-expressam essa região, há uma diminuição na despolarização da membrana (DE PINTO *et al.*, 2007). Além dessas funções, a α hélice N-terminal tem também função crucial no desencadeamento do processo apoptótico. Experimentos realizados verificaram que a indução da apoptose, por meio da estaurosporina, resulta em aumento da oligomerização da VDAC (ABU-HAMAD *et al.*, 2009). Uma vez formado o poro intermolecular oligomérico da VDAC1, este pode servir como um canal para proteínas. No entanto, oligômeros β

barril da VDAC1 formam canais hidrofóbicos, não permitindo a passagem de proteínas com carga, tal como o citocromo c. Porém, se a região α hélice N-terminal anfipática da molécula de VDAC1 mover-se para dentro do β barril formar-se-á um poro hidrofílico, permitindo assim o transporte de proteínas através da membrana mitocondrial externa (MME). A interação de proteínas anti-apoptóticas (hexoquinase e Bcl2) com a região N-terminal da VDAC1 previne sua translocação e desse modo, a formação do poro hidrofílico, inibindo assim a liberação do citocromo c (ABU-HAMAD *et al.*, 2009).

A VDAC realiza o controle do fluxo de metabólitos entre o espaço intermembrana e o citosol através da mudança no potencial de voltagem transmembrana (COLOMBINI, 1979). Em seu estado aberto a VDAC é um canal, seu poro possui cerca de 3 nm de diâmetro (COLOMBINI, 2009) e o interior de suas paredes possuem carga positiva, tornando-o seletivo a anions, tais como o ATP (HODGE; COLOMBINI, 1997). Experimentos realizados demonstraram que o canal encontra-se em abertura máxima a 0mV, porém quando é submetido a voltagens acima de + 30mV e abaixo de - 30mV entra em estado de baixa condutividade (CHOUDHARY *et al.*, 2010).

Estas modificações na voltagem da membrana causam um rearranjo do canal protéico e mudança na seletividade das membranas. Song *et al.* (1998) relatam que a VDAC apresenta no interior de seu poro um domínio móvel com carga que se orienta de acordo com o campo elétrico, denominado sensor de voltagem. Quando ocorrem mudanças na voltagem transmembrana este sensor se desloca para o exterior do canal em direção a carga negativa, este deslocamento causa redução no tamanho do poro em cerca de 30-40% e gera uma modificação na seletividade do canal, tornando-se um canal seletivo somente a cátions (SONG *et al.*, 1998). A região α hélice N-terminal funciona como um sensor de voltagem do poro, responsável pela detecção das variações de voltagem através da membrana (COLOMBINI *et al.*, 1996; CHOUDHARY *et al.*, 2010).

Estudos revelaram que a presença da proteína citosólica tubulina causa um aumento de sensibilidade à voltagem no canal da VDAC, induzindo assim seu fechamento. Análises realizadas na presença de concentrações nanomolares de tubulina revelaram o fechamento do canal sob baixo potencial de voltagem (10mV). Acredita-se que a região C-terminal eletronegativa da tubulina penetra no interior do

lúmen do canal, bloqueando parcialmente a entrada do poro da VDAC. Esta foi identificada como um regulador citoplasmático natural da VDAC, podendo regular o fluxo de metabolitos entre a mitocôndria e o citoplasma (ROSTOVTSEVA; BEZRUKOV, 2008).

Além de realizar o transporte de ATP para dar suporte energético ao bom funcionamento das células, a VDAC também realiza interações com moléculas que necessitam ter acesso preferencial ao ATP, uma delas é a hexoquinase. A hexoquinase converte a glicose em glicose-6P, de acordo com a seguinte reação:

A isoenzima tipo I da hexoquinase representa mais de 90% do total de atividade da hexoquinase no cérebro mamífero, onde ela aparece predominantemente em uma forma ligada à mitocôndria, ao contrário de outros tecidos, nos quais sua localização é citosólica (WILSON, 1995). Esta interação entre a VDAC e a hexoquinase tem conseqüências metabólicas, uma vez que a fosforilação da glicose pela hexoquinase ligada está relacionada à produção de ATP pela fosforilação oxidativa intramitocondrial (BELTRANDELRIO; WILSON, 1992; CERQUEIRA CESAR; WILSON, 1995; CERQUEIRA CESAR; WILSON, 1998; CERQUEIRA CESAR; WILSON, 2002). Além disso, a ligação da hexoquinase–VDAC possui efeitos anti-apoptóticos, uma vez que a proteína pró-apoptótica BAX e a hexoquinase competem pelo mesmo sítio de ligação mitocondrial (CHENG *et al.*, 2003).

A hexoquinase tipo I possui uma seqüência N-terminal hidrofóbica de 15 aminoácidos (PASTORINO; HOEK, 2008), a qual se liga à α hélice N-terminal anfipática presente na VDAC. O glutamato 72 é um domínio específico da VDAC onde ocorre a ligação entre a VDAC e a hexoquinase (AL JAMAL, 2005).

Esta ligação da hexoquinase tipo I na membrana mitocondrial externa presente no cérebro apresenta dois tipos de sítios de ligação, as quais são denominadas sítios A e B, conforme demonstrado na Ilustração 1 (KABIR; WILSON, 1993).

Ilustração 1. Esquema de acoplamento da hexoquinase a VDAC. Um sistema que utiliza e produz ATP em cérebros. Observe os dois tipos de ligação da hexoquinase à VDAC.

Estudos realizados no Laboratório de Neurociência e Proteômica da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos identificaram que a hexoquinase I ligada ao sítio A é liberada após o tratamento da mitocôndria com glicose-6-P. Já a hexoquinase I ligada ao sítio B é refratária ao tratamento da mitocôndria com glicose-6-P onde ela não é liberada. A hexoquinase I se mantém ligada ao sítio B onde ela está menos acessível ao ATP intra-mitocondrial em relação àquela que está ligada ao sítio A. Esta hexoquinase ligada ao sítio B também é mais sensível a inibição pelo análogo da glicose-6-P: 1,5-AnG-6-P (CERQUEIRA CESAR; WILSON, 2002). A hexoquinase ligada ao sítio A possui um acesso preferencial ao ATP intramitocondrial que é produzido durante a fosforilação oxidativa. A proporção dos sítios tipo A:B varia em função da espécie animal a partir da qual as mitocôndrias neuronais são extraídas. Esta proporção é de 90:10, 60:40, 40:60 e 20:80 as quais correspondem ao rato, coelho, bovino e humano, respectivamente.

A base molecular para a diferença entre os sítios do tipo A e do tipo B permanecia obscura até recentemente. Trabalhos pioneiros do Laboratório de Proteômica e Neurociência, contudo, foram os primeiros a correlacionar essa heterogeneidade de sítios de ligação da hexoquinase a diferenças na expressão relativa das isoformas de VDAC seguindo um padrão espécie-dependente (POLETI *et al.*, 2010; CERQUEIRA CÉSAR; WILSON, 2004).

Esta ligação entre a VDAC e a hexoquinase tem grande importância em estudos com células cancerígenas. Experimentos realizados com o metil-jasmonato (MJ), hormônio do estresse presente em plantas, verificaram que este exibe atividade anticancerígena, uma vez que induz a morte celular do tumor através de sua ação específica na hexoquinase. Goldin *et al.* (2008) demonstraram que o MJ liga-se à hexoquinase, interferindo na sua interação com a VDAC, levando a dissociação da hexoquinase da mitocôndria. Essa dissociação desencadeia a apoptose através da liberação de citocromo c (GOLDIN *et al.*, 2008).

A ligação hexoquinase-VDAC é chave na regeneração axonal. Dessa forma, a hexoquinase apresenta importância como uso farmacológico, pois sua atividade pode auxiliar no tratamento contra o desenvolvimento de neurites (WANG *et al.*, 2008).

A VDAC possui 3 isoformas: VDAC1, VDAC2 e VDAC3 presentes em mamíferos (RAHMANI *et al.*, 1998). A super-expressão da VDAC1 em uma variedade de células promove a morte celular apoptótica através da formação do complexo pró-apoptótico VDAC1-BAX, o qual induz uma mudança no potencial da membrana e liberação do citocromo c (KROEMER *et al.*, 2007).

Células com baixa expressão da VDAC1 proliferam lentamente, devido à troca limitada de ATP/ADP entre o citosol e a mitocôndria, indicando que a VDAC1 é necessária para o crescimento normal da célula (ABU-HAMAD *et al.*, 2006).

Cheng *et al.* (2003) demonstraram que a super-expressão da VDAC2 previne a ativação da BAK e inibe a via apoptótica mitocondrial. A VDAC2 é capaz de interagir especificamente com a conformação inativa de BAK. Dessa forma, observa-se em literaturas que a VDAC1 possui propriedades pró-apoptóticas, enquanto que a VDAC2 propriedades anti-apoptóticas. Outro estudo relatando o papel das VDACs na apoptose foi aquele de Panickar *et al.* (2005), os quais demonstraram que sob estados de hipoglicemia a super-expressão do fator anti-apoptótico BCL-xL atua como um protetor celular, prolongando o estado aberto da VDAC em membranas sintéticas. Este aumento auxilia na recuperação da célula regulando a respiração celular e/ou a produção de ATP mitocondrial (PANICKAR *et al.*, 2005).

A VDAC é uma proteína importante por estar associada primeiramente à regulação de trocas metabólicas, em segundo pela morte celular apoptótica e por fim, ao desenvolvimento de doenças (TÖMROTH-HORSEFIELD; NEUTZE, 2008).

Neste sentido o desarranjo das VDACs pode mediar processos apoptóticos, mitocondriais e disfunções sinápticas, que estão associadas a desordens neurodegenerativas. Em pacientes com Mal de Alzheimer observou-se uma diminuição dos níveis totais de VDAC1 no córtex frontal e tálamo. No cerebelo de pacientes com Síndrome de Down a VDAC1 apresentou maior expressão, enquanto que a VDAC2 não mostrou alterações significantes. Esses resultados podem estar associados à perda sináptica e neuronal comum em pacientes com Mal de Alzheimer e Síndrome de Down (YOO *et al.*, 2001). Em pacientes com Mal de Alzheimer há um acúmulo de VDAC em neurites distróficas que apresentam placas β amilóides. A microscopia eletrônica de placas amilóides correlaciona a VDAC com grandes quantidades de mitocôndrias alteradas e lisossomos preenchidos com debris junto a vesículas. Ainda não se sabe se o acúmulo de VDAC é o resultado de um *turnover* prejudicado e uma remoção diminuída de mitocôndrias danificadas, ou se a lesão às mitocôndrias nas neurites distróficas seja resultante de uma alteração da função da VDAC (FERRER, 2009).

Além das alterações acima mencionadas, outros estudos identificaram que a VDAC1 apresenta-se como uma proteína nitrada no hipocampo de pacientes com Mal de Alzheimer, levando a alterações em seu funcionamento. Observou-se que a nitração desta proteína pode impedir a interação da VDAC com proteínas anti-apoptóticas (BCL-xL), possibilitando um aumento dos níveis de proteínas pró-apoptóticas (BAX e BAK) associadas à VDAC, essa condição facilita a liberação de citocromo c através da VDAC (SULTANA *et al.*, 2006).

A acroleína é um aldeído, proveniente da peroxidação de lipídios. Esta é encontrada em grande quantidade em diversas condições patológicas associadas a estresse oxidativo, tais como injúrias da coluna vertebral, diabetes neuropática e na doença de Alzheimer. O experimento realizado por Mello *et al.* (2007) identificou 5 proteínas oxidadas pela acroleína, entre elas estão a VDAC, a isoforma 2 da trompomiosina-3-gama, a trompomiosina-5, a β -actina e a EF-Tu mitocondrial. Todas essas proteínas estão envolvidas com funções neuronais vitais, tais como: produção de energia, liberação de neurotransmissores e plasticidade neuronal (MELLO *et al.*, 2007).

A VDAC também altera-se no Mal de Parkinson. Trata-se de uma doença que acomete cerca de 1-2% da população, sendo assim a segunda doença

neurodegenerativa mais comum na população com idade acima de 65 anos. A doença de Parkinson é caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos presentes na substância nigra *pars compacta*. A disfunção mitocondrial é um dos principais fatores responsáveis por essa patologia. Sob condições de estresse oxidativo a estrutura química da dopamina tem o potencial de formar uma toxina endógena, a qual promoverá a disfunção mitocondrial e danos oxidativos, acelerando assim a morte celular dos neurônios dopaminérgicos. Sob condições normais a dopamina sintetizada é armazenada em vesículas sinápticas sob concentrações milimolares, porém problemas no armazenamento vesicular de dopamina levam a um aumento na concentração de dopamina no citoplasma, gerando metabólitos reativos, tais como o ácido dihidroxifenilacético ou a dopamina quinona.

Estudos revelam que a dopamina quinona causa a inativação da função de diversas proteínas, contribuindo assim para o desenvolvimento do processo degenerativo presente na doença de Parkinson (HASTINGS, 2009). Neste estudo identificou-se quais proteínas mitocondriais foram alteradas após serem expostas à dopamina quinona. Os resultados obtidos revelaram a alteração de: subunidade de 75 KDa do complexo I NADH desidrogenase, creatina quinase mitocondrial, mortalina/GRP75, mitofilina, isocitrato desidrogenase, succinato ligase CoA, aldeído desidrogenase, peroxiredoxina 3, subunidade de 30 KDa do complexo I NADH oxidoreductase, VDAC1 e VDAC2 (HASTINGS *et al.*, 2009). Trabalhos recentes do Laboratório de Neurociência e Proteômica identificaram que a subunidade de 75 KDa do complexo I NADH desidrogenase interagem com a VDAC no complexo Hexoquinase-VDAC-ANT (Resultados não Publicados).

A VDAC também compõe o poro de transição de permeabilidade da membrana (PTP), o qual também é constituído pelo ANT (adenine nucleotide transporter) na membrana interna e ciclofilina D na matriz mitocondrial. O PTP é um complexo multiprotéico transmembrana com cerca de 600 KDa (FAUSTIN *et al.*, 2004), seus componentes podem estar envolvidos em diversos subcomplexos. No entanto, outros autores contestam este modelo, afirmando que a VDAC não está presente no poro de transição de permeabilidade (BAINES *et al.* 2007).

O PTP realiza o contato entre a membrana externa e a membrana interna da mitocôndria. A abertura desse canal ocorre quase que universalmente durante a

apoptose o que tem repercussões letais como, a interrupção da fosforilação oxidativa e a liberação mitocondrial de proteínas apoptóticas necessárias a ativação da cascata de caspases e endonucleases (RODRIGUEZ-ENRIQUEZ *et al.*, 2004). Em células saudáveis o PTP fornece mecanismos pelos quais mitocôndrias senescentes são removidas da célula via autofagia.

A ciclofilina D liga-se à ANT, levando à permeabilização da MMI a moléculas com peso molecular acima de 1500 Da. O aumento da permeabilidade da MMI a pequenas moléculas medeia o equilíbrio de todos os osmólitos de baixo peso molecular enquanto retêm proteínas dentro de seus respectivos compartimentos (HALESTRAP *et al.*, 2009). Deste modo a concentração de proteínas na matriz será maior do que aquela presente no citosol e no espaço intermembrana, exercendo, assim, pressão osmótica coloidal, levando a turgescência do compartimento da matriz. A turgescência pode ocorrer sem a ruptura da MMI, devido ao desdobramento das cristas, porém a matriz expande-se exercendo uma pressão na MME, o que pode levar ao seu rompimento (HALESTRAP *et al.*, 2009). Deste modo, há a liberação de citocromo c e outras proteínas pró-apoptóticas, as quais têm o potencial de iniciar a apoptose.

O agente imunossupressor ciclosporina A (CSA) inibe a transição de permeabilidade do poro através da sua ligação com a ciclofilina D, mantendo em seu estado fechado o poro de permeabilidade da membrana mitocondrial.

Verifica-se, porém que alterações na função fisiológica dos componentes do PTP influenciam no destino da célula, podendo levar a casos de patologias tanto severas como crônicas, incluindo: envelhecimento precoce, doenças neurodegenerativas, diabetes *mellitus*, doenças vasculares e carcinogênese (LE BRAS *et al.*, 2005).

Quando ocorre um derrame cerebral, neurônios que são diretamente afetados pela falta de oxigênio e glicose na região isquêmica morrem rapidamente por necrose. No entanto, após um derrame agudo ou lesão traumática, a maioria dos neurônios que morrem ao redor da região diretamente afetada (penumbra) o fazem por meio da apoptose (ROBERTSON *et al.*, 2000). Experimentos realizados com cérebros de animais que sofreram traumatismo, lesão na medula espinhal e derrame demonstraram que as células adjacentes ao epicentro da lesão podem ser salvas através de manipulações que suprimam a via apoptótica. Dessa forma, o estudo de

uso de agentes que bloqueiem os componentes do PTP pode prevenir a morte neuronal em pacientes que sofreram um derrame ou algum traumatismo (MATTSON; KROEMER, 2003).

A VDAC aparece ainda associada a processos epiléticos. A ave doméstica (Fayoumi) é um valioso modelo para pesquisa epilética (CRAWFORD, 1970). Este autor reportou que aves epiléticas exibiram crises tônico-clônicas generalizadas em resposta à fotostimulação intermitente (FEI) e acústica. A partir deste estudo, a caracterização bioquímica e fisiológica das aves epiléticas continua a fornecer uma visão dos mecanismos básicos de epilepsia generalizada (CRAWFORD, 1970). Trata-se de um modelo bem adequado para explorar a relação entre tremores periódicos generalizados e patologia neuronal (GONG *et al.*, 2003).

Além disso, as aves epiléticas correspondem similarmente, por uma perspectiva farmacológica, ao ser humano epilético. Os medicamentos anticonvulsivantes comuns, usados em pessoas que apresentam epilepsia do tipo grande-mal, foram igualmente eficazes na prevenção de tremores induzidos por fotostimulação intermitente em aves epiléticas. As benzodiazepinas amplamente utilizadas em síndromes epiléticas são um poderoso anticonvulsivante em aves epiléticas. Portanto, de uma perspectiva comportamental, farmacológica, bioquímica, histológica e anatômica, as aves são um razoável modelo biológico para epilepsia do tipo grande-mal em humanos (KENDALL *et al.*, 2002).

Alguns tipos de epilepsia que acometem humanos têm origem genética, no entanto, a sua base fisiológica é pobremente estudada. Este modelo é, portanto, um interessante veículo para investigar as origens bioquímicas dessas desordens. Tornando-se útil para examinar as implicações do desenvolvimento de tremores periódicos e a relação entre frequência de tremores e a capacidade neuronal (KENDALL *et al.*, 2002).

Neste sentido Jiang *et al.* (2007) reportaram a correlação da epilepsia com alterações na função mitocondrial. Valores elevados no nível de VDAC1 e baixos níveis de VDAC2 foram observados em grupo de pacientes fármaco-resistentes à epilepsia, o que pode estar relacionado com a diminuição da produção e translocação de ATP mitocondrial, esta diminuição causa falha energética e agrava a disfunção mitocondrial.

Além de ser utilizada como modelo de estudos de indução de epilepsia as aves também vem sendo estudadas como modelo biológico em estudos sobre os efeitos das lesões no hipocampo, que causam danos tanto na memória quanto no aprendizado. Há diversas razões para utilizar a ave como modelo biológico, dentre elas podemos citar: a) a capacidade das aves em obter informação visual e espacial já é bem conhecida e pode ser usada em todos os ensaios de aprendizado e memória que são aplicados aos macacos e ratos; b) as aves são o objeto de vários estudos comportamentais, e por isso, os mecanismos comportamentais que constituem a base do desempenho das tarefas espaciais e visuais são mais bem documentados e compreendidos em aves do que em ratos e macacos; c) o hipocampo da ave é um homólogo funcional do hipocampo de mamíferos, pois há diversas similaridades morfológicas entre eles. Isso pode ser explicado devido ao fato do hipocampo da ave e dos mamíferos terem a mesma origem embrionária, o telencéfalo. Em relação à neuroquímica, os neurotransmissores e neuropeptídeos do hipocampo de aves e mamíferos são bastante similares (COLOMBO; BROADBENT *et al.*, 2000).

Foram encontradas diferenças significativas entre o nível de expressão da VDAC1 e a VDAC2 nas espécies bovina, murina e aviar (POLETI *et al.*, 2010). A VDAC1 foi a isoforma mais expressa em todas as espécies, porém apenas no cérebro aviar a VDAC1 apresentou uma expressão significativamente maior em relação à VDAC2, quadro semelhante ao observado na epilepsia fármaco-resistente (JIANG *et al.*, 2007). A espécie murina apresentou a menor expressão da VDAC1 em relação às outras espécies. Já a VDAC2 apresentou os níveis mais altos de expressão em mitocôndrias de cérebro bovino em relação à ave, que apresenta os menores níveis de VDAC2. Nas mitocôndrias do cérebro de murino os valores de VDAC2 foram intermediários. A isoforma VDAC3 não foi encontrada neste estudo (POLETI *et al.*, 2010). Tais resultados indicam diferenças significativas quanto ao metabolismo energético no cérebro aviar, sendo também uma possível explicação molecular da sensibilidade das aves à epilepsia, e de sua utilização no estudo da relação epilepsia-patologia neuronal.

O presente projeto trará como contribuição a identificação das proteínas envolvidas no complexo VDAC-ANT-HXK nos cérebros de rato, bovino e frango e a determinação da estequiometria desse complexo. Nosso objetivo é identificar se as

expressões diferenciadas da VDAC1 e VDAC2 verificadas nos cérebros murino, aviar e bovino, estão associadas a diferenças nos interactomas dessas proteínas nesses cérebros.

2 Objetivos

O objetivo do presente projeto foi o de identificar se a base molecular da diferença entre os sítios de ligação A e B verificadas nos cérebros murino e bovino, estão associadas a diferenças nos interactomas dessas proteínas.

3 Materiais e métodos

3.1 Identificação das proteínas implicadas no complexo protéico Hexoquinase-VDAC presente nos cérebros de rato, bovino e aviar.

3.1.1 Obtenção das amostras

Os córtices cerebrais de bovinos foram retirados e pesados logo após o abate dos animais no matadouro escola da USP, Campus de Pirassununga. Esse material foi utilizado ainda fresco ou imediatamente congelado em nitrogênio líquido para uso posterior. Para cada extrato foram utilizados 5g de córtex.

Para aves e ratos, os cérebros íntegros foram retirados, pesados e imediatamente utilizados ou congelados em nitrogênio líquido, logo após o sacrifício dos animais. Foram utilizados 5g de cérebro (3 cérebros para aves e ratos) em cada extração. Essa amostragem diferenciada entre bovinos e ratos e aves, deve-se ao fato de a massa cinzenta no bovino ser extremamente superficial ao cérebro,

enquanto ratos e aves possuem o córtex mais espesso, permitindo o uso do órgão em sua totalidade.

3.1.2 Isolamento mitocondrial

As amostras foram finamente picotadas em aproximadamente 40mL de meio de isolamento (Sacarose 0,25M, EGTA 0,1mM, MOPS 0,2mM pH 7,4 e 1% de Inibidores de Protease - Amersham Biosciences) refrigerado a 4°C. Esse material foi lavado 3 vezes para remover todo o sangue. Os homogenatos foram obtidos em homogeneizador tipo Potter, com aproximadamente 15mL de meio de isolamento e, em seguida, o volume foi ajustado com meio de isolamento para 30 mL.

O homogenato foi centrifugado a 1940g, 3 min em centrífuga Beckman, rotor JA-21. Foram transferidos 15mL do sobrenadante para outro tubo e centrifugado a 16000g 8 min. O sobrenadante foi descartado e a parede do tubo limpa com gaze para remover a gordura. O pellet foi re-suspenso em 6mL de meio de ficoll 3% e colocado no topo de um tubo contendo 25 mL de meio de ficoll 6% (0,24M Manitol, 0,1mM EGTA, 60mM Sacarose, 5mM MOPS, 6% ficoll e 1% de inibidores de protease) e centrifugado a 14600g por 30 min. O pellet foi re-suspenso em 6mL de meio de isolamento e centrifugado a 15100g por 10 min em rotor JA-20. O sobrenadante foi descartado e o pellet re-suspenso em 0,4mL de meio de isolamento. As proteínas totais foram determinadas pelo kit BCA Protein Assay Kit (Pierce) utilizando como padrão uma solução de albumina bovina. As mitocôndrias isoladas foram armazenadas em nitrogênio líquido.

3.1.3 Solubilização das proteínas mitocondriais

Para a solubilização das proteínas mitocondriais foi utilizado o detergente Dodecylmaltoside (DDM) a 1% segundo proposto por Reisinger & Eichacker (2007), que recomendam uma concentração entre 0,055% e 7%, diluído em tampão de Lise contendo 50mM Bis-Tris e 500mM ácido 6-aminohexanóico (aminocapróico) pH 7,0. Foi adicionado Mix de inibidores de protease (Protease Inhibitor Mix – Amersham

Biosciences) numa proporção de 1:100 (v:v) e as amostras foram incubadas por 1h em gelo, e re-suspensas a cada 15 min. As amostras foram centrifugadas em microcentrífuga a 15000 rpm a 4°C durante 1 hora. Após a centrifugação foi medido o volume de cada amostra e então adicionado o tampão da amostra constituído por 500mM ácido 6-aminohexanóico e 8% de Coomassie Blue G250, numa proporção de 4 DDM:1 Coomassie (v:v) e mix de inibidores de protease 1:100 (v:v) antes da aplicação dessas em gel de eletroforese em condições nativas.

3.1.4 Eletroforese em condições nativas (BN-PAGE)

A eletroforese em condições nativas foi realizada segundo técnica descrita por Schägger *et al.* (1994) com algumas modificações. O BN-PAGE foi executado utilizando-se tampão contendo 50 mM de Bis-Tris e 500 mM ácido aminocapróico pH 7,0 em géis (18 x 16 x 0.15 cm) de gradiente linear de 6 a 13% de acrilamida, sob um gel de empilhamento de acrilamida a 4%. Foram aplicadas, aproximadamente, 200µg de proteína em cada poço do gel.

Para a separação das proteínas foi utilizado tampão do cátodo, composto por 15mM de Bis-Tris (pH 7.0), 50mM de Tricina e Coomassie Blue G-250 0.002% (p/v), e tampão do ânodo contendo 50mM de Bis Tris (pH 7.0). O padrão utilizado nos géis nativos foi o de alto peso molecular para eletroforese nativa da Amersham Biosciences. Foi utilizado, para a corrida eletroforética 100V e 15mA até a faixa de migração percorrer o gel de empilhamento (aproximadamente 1h e 20min), passando então a voltagem para 200V e 15mA até o final da corrida (aproximadamente 14 horas).

Após o final da eletroforese, o gel foi fixado em solução contendo ácido acético (10%) e metanol (40%), por 1h. A coloração foi realizada durante 2h com azul de Coomassie (0,1% Coomassie Blue G-250 em 10% ácido acético) e descorado em solução descorante (10% Ácido Acético), trocada após a primeira meia hora e ficando overnight sob leve agitação.

A captura de imagens foi realizada pelo ImageScanner PowerLook 1120 (Amersham Biosciences), sendo os arquivos salvos com extensão .TIF e analisadas com auxílio do software ImageQuant TL da Amersham Biosciences.

3.1.5 Eletroforese desnaturante bidimensional tricina-SDS PAGE

Após a análise do gel em condições nativas, uma tira foi corada e uma tira sem coloração foi recortada, incubada por 10 min com uma solução desnaturante preparada segundo Swamy *et al.* (2006) (12,5 mM Tris, 4% SDS, 20% Glicerol e 0,02% de Azul de Bromofenol, pH 6,8) acrescida de 9% β -Mercaptoetanol. Após a incubação, as tiras foram fervidas imersas nessa solução, na qual ficaram por mais 20 minutos. Após o resfriamento, as tiras foram retiradas da solução fervida e mergulhadas em solução de desnaturação acrescida de 125mg de Iodoacetamida por tira, incubadas novamente por 15 minutos antes da montagem do gel desnaturante da segunda dimensão.

As eletroforeses em condições desnaturantes foram realizadas com o intuito de separar as diferentes proteínas formadoras do complexo VDAC-ANT-HK, o qual estaria em uma das bandas detectadas nos géis nativos.

O gel da segunda dimensão foi realizado como descrito por Schagger e Jagow (1987), montando-se as placas contendo uma tira do gel nativo, que foi posicionada na parte superior da placa de vidro, tomando-se o cuidado de retirar (com papel filtro), ao máximo possível, a solução contendo β -mercaptoetanol, que dificulta a polimerização do gel. O gel de separação, 10% acrilamida, foi colocado na região inferior da placa, com uma pipeta de vidro, sendo recoberto pelo gel de empilhamento, contendo 6% de acrilamida e, por último, o gel “spacer” com 4% de acrilamida, feito com tampão do gel nativo. Após a colocação de cada gel, adicionamos um pequeno volume de água na superfície, a fim de que o gel polimerizasse de maneira uniforme. Após a polimerização de cada gel, a água foi retirada para permitir a colocação do próximo gel. A montagem do gel desnaturante Tricina-SDS PAGE está ilustrada na Ilustração 2.

As corridas eletroforéticas ocorreram a 100V e 17,5mA por gel, por aproximadamente 3 horas, até que a frente azul de corrida migrasse do gel de

empilhamento para o gel de separação. Após esse tempo, a voltagem foi aumentada para 300V mantendo a corrente constante. Essa etapa durou aproximadamente 15h. O tampão utilizado para o cátodo foi o Tris-Tricina-SDS pH 8,25 (0,1M Tris, 0,1M Tricina, 0,1% SDS) e o tampão do ânodo Tris pH 8,9 (0,2M Tris).

Ao final da corrida os géis utilizados para análises foram corados com uma solução contendo 0,1% de Comassie R250, 10% ácido acético e 40% metanol e descorados com uma solução descorante composta por 10% de ácido acético e 40% metanol, antes de serem escaneados e analisados através do programa ImageMaster da Amersham Biosciences.

Por sua vez, os géis utilizados para os Western-blottings, foram imediatamente mergulhados em tampão de transferência.

Ilustração 2. Gel desnaturante Tricina-SDS. Em A - gel de corrida Tricina-SDS e 10% de acrilamida; B - Gel de empilhamento Tricina-SDS e 6% de acrilamida; C – “spacer” gel tampão de gel nativo e 4% acrilamida. BN-PAGE – tira recortada do gel Nativo, previamente incubada e fervida com 9% β -mercaptoetanol e incubada 125mg de Iodoacetamida.

3.1.6 Western-blotting

Após a eletroforese, os géis foram transferidos a 80V e 400 mA por 1h40min para uma membrana de nitrocelulose com poros de 0,45µm (Bio-Rad) utilizando a unidade de transferência TE 62 (Amersham Biosciences) e o sistema de tampão de Towbin *et al.* (1979). As membranas foram bloqueadas pela incubação overnight à 4°C em TBS (20mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7.5) contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé) e 1% gelatina. As membranas foram incubadas com anticorpos primários anti-VDAC1, anti-VDAC2, anti-HXK e anti-ANT e anticorpos secundários conjugados com peroxidase (Bio-Rad). Os anticorpos foram diluídos em TBS contendo 1% gelatina. Em seguida, a quimioluminescência foi detectada usando o sistema SuperSignal West Pico da Pierce Chemical (Rockford, IL) e revelada em filme de raio-X (CL-X posure film – Pierce) no hospital veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo - campus de Pirassununga. Entre as etapas, os blottingss foram lavados por 3 vezes de 10 min com TBS contendo 0,1% de Tween 20 e 1 vez de 10 min com TBS.

3.1.7 Espectrometria de Massas (MALDI - TOF TOF)

A captura de imagens foi realizada pelo ImageScanner PowerLook 1120 (Amersham Biosciences), sendo os géis nativos analisados com o auxílio do software ImageQuant TL (Amersham Biosciences) e os géis desnaturantes analisados com o auxílio do Image Master (Amersham Biosciences). Após a marcação dos spots estes foram lavados com solução de bicarbonato de amônio 50mM e acetonitrila (50%) (v/v) para a remoção de SDS e corante, sendo em seguida adicionado a acetonitrila. As bandas foram completamente secas em SpeedVac e mantidas em freezer até o momento da digestão trípica para posterior análise no espectrômetro de massas.

As amostras foram submetidas à digestão com tripsina por 18h a 37°C, utilizando 0,5µg de tripsina (Promega, Madison, EUA). Os peptídeos trípticos foram dessalinizados numa microponteira preenchida com resina POROS R2 (PerSeptive,

Biosystem), previamente equilibrada ácido fórmico em 0,2%. A mistura de peptídeos foi eluída com uma mistura contendo 60% de metanol e 5% ácido fórmico para análise por espectrometria de massa (MS). O amostrador ("plate") foi preparado pela adição de partes iguais da mistura de peptídeos e da matriz (ácido 4-hidroxicinâmico 10mg/mL). As análises por espectrometria de massas (MS-MALDI) foram realizadas no espectrômetro de massas Axima Performance MALDI –TOF TOF (Shimadzu-Kratos, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan).

A caracterização da sequência de aminoácidos das proteínas foi realizada com base nas análises do perfil de massas dos peptídeos tripticos ("MS-fingerprint") e do padrão de fragmentação de íons b e y de alguns peptídeos selecionados em experimentos por dissociação por colisão (CID-MS/MS). Os espectros de CID foram submetidos diretamente a análise no banco de dados MASCOT (<http://matrixscience.com>) no National Center for Biotechnology Information (NCBI).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Separação dos complexos protéicos por BN-SDS PAGE.

Após a incubação com 1% de DDM e centrifugação, as amostras foram aplicadas em gel em condições nativas com gradiente linear de 6 a 13% de acrilamida, sob um gel de empilhamento de acrilamida a 4%. Na Ilustração 3 estão esquematizados géis nativos realizados para as amostras mitocondriais bovina e murina. As amostras murina e bovina apresentaram 10 bandas (Ilustração 3A e B).

As tiras de gel nativo com os complexos protéicos solubilizados foram submetidas a um processo de desnaturação, seguido de uma segunda dimensão em SDS-PAGE, evidenciando, assim, para cada complexo protéico seus diferentes componentes. Trabalhos prévios demonstraram que aliada à técnica de Western

blotting, foi possível identificar os complexos nos quais as VDACs 1 e 2 estavam presentes. Tratava-se do complexo I na espécie murina (Ilustração 4) e dos complexos I a V na espécie bovina (Ilustração 5).

Ilustração 3. Géis nativos em gradiente de 6 a 13% de acrilamida, corados com azul de Coomassie. A-amostra murina e B-amostra bovina.

Ilustração 4. Amostra neuronal murina tratada com 1% DDM. (A) Tira de gel nativo em gradiente 6-13% recortada, incubada em solução desnaturante e fervida com 9% β -mercaptoetanol e incubada novamente em 125mg de iodoacetamida/ 5 ml. (B) Immunoblottings realizados para VDAC1 e 2, evidenciando a sobreposição das VDACS 1 e 2, alocadas no primeiro complexo (697 KDa) da espécie murina.

Ilustração 5. Amostra neuronal bovina tratada com 1% DDM. (A) Tira de gel nativo em gradiente 6-13% recortada, incubada em solução desnaturante e fervida com 9% β -mercaptoetanol e incubada novamente em 125mg de iodoacetamida/ 5 ml. (B) Immunoblottings realizados para VDAC1 e 2, evidenciando a sobreposição das VDACS 1 e 2, alocadas nos cinco primeiros complexos, complexo 1 (678 KDa), complexo 2 (600 KDa), complexo 3 (548 KDa), complexo 4 (447 KDa) e complexo 5 (341 KDa) na espécie bovina.

4.2 Identificação e análise da interação dos complexos protéicos associados à VDAC

4.2.1 Análise da função dos componentes protéicos no cérebro bovino.

De acordo com a estratégia proposta por Reisinger e Eichcker (2007), a técnica BN/SDS PAGE permite a análise estequiométrica da subunidade específica de um complexo protéico, bem como a cinética de montagem desse complexo protéico.

Os diferentes complexos proteicos no BN-PAGE foram individualmente separados pela segunda dimensão via SDS-PAGE. As bandas, na segunda dimensão foram excisadas, digeridas e identificadas via MS-MALDI. As proteínas identificadas e seus scores MASCOT correspondentes, sequência de cobertura e

número de matches de MS/MS estão listadas nas tabelas suplementares TS1 e TS2 das espécies murina e bovina, respectivamente.

A identificação das subunidades proteicas que compõe os pré-complexos até a formação do supercomplexo nas mitocôndrias neuronais da espécie bovina pode ser visualizada na Ilustração 6. A identificação dos componentes proteicos que realizam a montagem do supercomplexo em bovino estão inseridas na Tabela 1.

Ilustração 6. SDS-PAGE de quatro pré-complexos e um complexo associado à VDAC na espécie bovina.

Ao todo foram observadas, em mitocôndrias cerebrais, 46 proteínas interactivas com a VDAC na espécie bovina (Tabela 1). As proteínas interactivas com a VDAC possuem uma grande variedade de funções essenciais às vias metabólicas mitocondriais: fosforilação oxidativa (43%), ácido cítrico (9%), metabolismo de aminoácidos (4,3%), transportadoras (13%), chaperonas (9%), entre outras na espécie bovina.

Tabela 1. Identificação das proteínas associadas à VDAC na espécie bovina.

I	II	III	IV	V
AATM	AATM	AATM	ADT1	ADT1
ABD12	ABD12	ABD12	ADT3	
	ADT2	ADT2		ADT2
AT5F1	AT5F1	AT5F1	ACON	
ATP5H	ATP5H	ATP5H		
ATPA	ATPA	ATPA	ATPA	ATPA
ATPB	ATPB	ATPB		
	ATPG	ATPG		
ATPO	ATPO	ATPO		
CHCH3	CY1	CY1	CY1	DHE3
			GRP75	
KCRU	KCRU	KCRU	KCRU	G3P
MBP	LDH6B			LETM1
NDUA8	MDHM	MDHM	MDHM	M2OM
NDUA9			MPCP	MPCP
NDUAA			MMS22	NNTM
NDUBA			UT14A	UT14A
NDUS1				PTX3
NDUS3				
NDUS8				
NDUV2	SRSF7	SRSF7		
PHB		UBP33		
PHB2		UCRI		
RPC1		RPC1		
QCR1	QCR1	QCR1		
QCR2	QCR2	QCR2		
SWP70				
TCPQ				
VDAC1	VDAC1	VDAC1	VDAC1	VDAC1
VDAC2	VDAC2	VDAC2	VDAC2	VDAC2

Legenda dos componentes proteicos observados na Tabela 1.

- **Pré-complexo V (coloração rosa)**

- ADT1: ADP/ATP translocase 1
- ADT2: ADP/ATP translocase 2
- ATPA: ATP synthase subunit alpha
- DHE3: Glutamate dehydrogenase 1
- G3P: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
- LETM1: LETM1 and EF-hand domain-containing protein 1
- MPCP: Phosphate carrier protein
- M2OM: Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein
- NNTM: NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial
- PTX3: Pentraxin-related protein
- UT14A: U3 small nucleolar RNA-associated protein 14 homolog A
- VDAC1: Voltage dependent anion selective channel protein 1
- VDAC2: Voltage dependent anion selective channel protein 2

- **Pré-complexo IV (coloração azul)**

- ADT3: ADP/ATP translocase 3
- ACON: Aconitate hydratase mitochondrial
- CY1: Cytochrome c1 heme protein mitochondrial
- GRP75: Stress-70 protein mitochondrial
- KCRU: Creatine kinase U-type mitochondrial
- MDHM: Malate dehydrogenase mitochondrial
- MMS22: Protein MMS22-like

- **Pré-complexo III (coloração verde)**

- AATM: Aspartate aminotransferase mitochondrial
- ABD12: Monoacylglycerol lipase ABHD12
- AT5F1: ATP synthase subunit b mitochondrial
- AT5H: ATP synthase subunit d mitochondrial
- ATPB: ATP synthase subunit beta
- ATPG: ATP synthase subunit gamma mitochondrial
- ATPO: ATP synthase subunit O mitochondrial
- QCR1: Cytochrome b-c1 complex subunit 1 mitochondrial
- QCR2: Cytochrome b-c1 complex subunit 2 mitochondrial

- RPC1DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC1
- SRSF7: Serine/arginine-rich splicing factor 7
- UBP33: Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 33
- UCRI: Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske mitochondrial
- **Pré-complexo II (coloração roxo)**
 - LDH6B: L-lactate dehydrogenase A-like 6B
- **Supercomplexo I (coloração amarelo)**
 - CHCHD3: Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3 mitochondrial
 - MBP: Myelin basic protein
 - NDUA8: NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8
 - NDUA9: NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9 mitochondrial
 - NDUA8: NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10 mitochondrial
 - NDUBA: NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10
 - NDUS1: NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit mitochondrial
 - NDUS3: NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3 mitochondrial
 - NDUS8: NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8 mitochondrial
 - NDUV2: NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2 mitochondrial
 - PHB: Prohibitin
 - PHB2: Prohibitin-2
 - SWAP70: Switch-associated protein 70
 - TCPQ: T-complex protein 1 subunit theta

Ilustração 7. Esquema de acoplamento das proteínas dos pré-complexos até a formação do supercomplexo pode ser observado em diferentes cores, complexo I: amarelo; pré-complexo II: roxo; pré-complexo III: verde; pré-complexo IV: azul e pré-complexo V: rosa.

O pré-complexo de menor peso molecular (V) (342kDa) apresenta as proteínas NAD(P) transhydrogenase mitochondrial (NNTM), ADP/ATP translocase 1 e 2 (ADT1 e ADT2), ATP synthase subunit alpha (ATPA), Glutamate dehydrogenase 1 (DHE3), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3P), LETM1 and EF-hand domain-containing protein 1 (LETM1), Pentraxin-related protein (PTX3), U3 small nucleolar RNA-associated protein 14 homolog A (UT14A), Phosphate carrier protein (MPCP) e Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein (M2OM).

Diversas proteínas observadas apresentam funções importantes na fisiologia e patologia do sistema nervoso central. Tais como a LETM1 atuante na regulação da morfologia mitocondrial. Alterações nesta podem gerar a perda da viabilidade celular, sendo sua deleção associada à epilepsia em pacientes que apresentam a Síndrome de Wolf-Hirshhorn (DIMMER *et al.*, 2008; PAN *et al.*, 2011).

Datta *et al.* (2011) reportaram que a isquemia está associada à liberação aguda de uma quantidade maciça de glutamato. A superexpressão da DHE3 é responsável pela liberação do glutamato estocado nas vesículas sinápticas.

A proteína PTX3 está associada à modulação das funções fagocitárias da microglia, sendo um biomarcador em potencial no auxílio do diagnóstico de desordens inflamatórias cerebrais e predição de resposta à fármacos (JEON *et al.*, 2010).

A ativação da cascata de sinalização apoptótica dependente da p53 é modulada por diversas proteínas. O sensor de estresse nuclear, UT14A, auxilia na estabilização da biogênese de ribossomos. Sua deleção pode levar à ativação da via p53, a qual desencadeia a suspensão do ciclo celular e apoptose (HU *et al.*, 2011). Já a enzima glicolítica, G3P, quando superexpressa transloca-se ao núcleo neuronal precedendo o declínio do potencial de membrana mitocondrial. Por isso, seu acúmulo nuclear é considerado um indicador apoptótico na substância nigra da Doença de Parkinson (TATTON, 2000).

No pré-complexo IV (Tabela 1, Ilustração 7) foi observado o acoplamento de sete novas proteínas, tais como a Aconitate hydratase mitochondrial (ACON), ADP/ATP translocase 3 (ADT3), Creatine kinase U-type mitochondrial (KCRU), Cytochrome c1 heme protein mitochondrial (CY1), Malate dehydrogenase mitochondrial (MDHM), Protein MMS22-like (MMS22) e Stress-70 protein mitochondrial (GRP75).

O estresse oxidativo mitocondrial é um fator que contribui na etiologia das doenças de Parkinson, esclerose amiotrófica lateral e acidente vascular cerebral. A superexpressão da ACON resulta em aumento da produção de H_2O_2 e Fe^{2+} agindo como um fator neurotóxico (CANTU *et al.*, 2009). Sob condições de estresse oxidativo, micro RNAs aumentam a atividade da MDHM, condição observada em cérebro de pacientes com Mal de Alzheimer (SHI; GIBSON, 2011). A GRP75 atua na manutenção da homeostase mitocondrial, protegendo a célula através da inibição do acúmulo das espécies oxidativas de oxigênio durante a privação da glicose. Estudos observaram baixa expressão desta em pacientes com Doença de Parkinson (YANG *et al.*, 2011).

A proteína MMS22 interage com diversas cromatinas remodeladoras e fatores de replicação/reparo do DNA, contribuindo para a estabilidade do genoma (PIWKO *et al.*, 2010).

No terceiro pré-complexo (Tabela 1, Ilustração 7) há a adição de 13 proteínas novas, sendo estas a Aspartate aminotransferase mitochondrial (AATM), Monoacylglycerol lipase ABHD12 (ABD12), ATP synthase subunit b mitochondrial (AT5F1), ATP synthase subunit beta (ATPB), ATP synthase subunit d mitochondrial (AT5H), ATP synthase subunit gamma mitochondrial (ATPG), ATP synthase subunit O mitochondrial (ATPO), Cytochrome b-c1 complex subunit 1 mitochondrial (QCR1), Cytochrome b-c1 complex subunit 2 mitochondrial (QCR2), Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske mitochondrial (UCRI), DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC1 (RPC1), Serine/arginine-rich splicing factor 7 (SRSF7), Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 33 (UBP33).

Foi recentemente reportado que mutações no gene ABD12 são relacionadas à doença neurodegenerativa conhecida como PHARC – polineuropatia, perda de audição, ataxia, retinitis pigmentosa e catarata (SAVINAINEN *et al.*, 2012). A RCP1 contribui para a atividade catalítica da polimerase, sendo estas associadas a desordens hipomielinizantes autossomal recessivas (SAITSU *et al.*, 2011).

Foi verificado que a SRSF7 é diretamente regulada por diversas proteínas nas células gliais, tendo efeito sobre o fator transcripcional nas vias de neurodegeneração, tais como a Doença de Alzheimer (ABEL *et al.*, 2011). Trabalhos sugerem que a proteína USP33 esteja envolvida no direcionamento axonal sendo um possível componente da via de sinalização *Slit* (YUASA-KAWADA *et al.*, 2009).

No segundo pré complexo houve somente a adição de uma nova proteína (Tabela 1, Ilustração 7), a L-lactate dehydrogenase A-like 6B (LDH6B) o qual cataliza a interconversão reversível de piruvato e lactato, sendo esta uma etapa metabólica chave na glicolise e em outras vias metabólicas (HOLMES *et al.*, 2009).

No supercomplexo houve a adição de 14 novas proteínas (Tabela 1, Ilustração 7), sendo esta a Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3 mitochondrial (CHCH3), Myelin basic protein (MBP), NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8 (NDUA8), NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9 mitochondrial (NDUA9), NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10 mitochondrial (NDUAA), NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10 (NDUBA), NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit mitochondrial (NDUS1), NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3 mitochondrial (NDUS3), NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8 mitochondrial (NDUS8), NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2 mitochondrial (NDUV2), Prohibitin (PHB), Prohibitin-2 (PHB2), Switch-associated protein 70 (SWAP70) e T-complex protein 1 subunit theta (TCPQ).

A estrutura altamente organizada dos complexos proteicos mitocondriais permite detectar o ambiente celular e regular a síntese de ATP, metabolismo e outros processos fisiológicos conforme suas exigências energéticas. A CHCH3 mantém a estrutura da crista mitocondrial, seu silenciamento resultou em mudanças nos níveis de diversas proteínas mitocondriais, como a redução em 40% dos níveis da VDAC na fração da membrana (DARSHI *et al.*, 2011). Estudos observaram que níveis elevados da proteína de membrana mitocondrial MBP estão associados à neuropatologia, sua presença é um fator de distinção importante em análises separando o controle da esclerose múltipla (BROADWATER *et al.*, 2011).

Em gliomas malignos a SWP70 encontra-se altamente expressa, atuando na migração e invasão de gliomas em tecidos adjacentes (SEOL *et al.*, 2009). Bourke *et al.* (2002) reportaram a TCP-1 promove a manutenção e polimerização de proteínas do citoesqueleto.

4.2.2 Dinâmica de formação dos complexos protéicos na espécie bovina

Na Ilustração 7 é possível observar a dinâmica de formação do supercomplexo, onde o pré-complexo V (rosa) é composto por 11 componentes proteicos, no pré-complexo IV (azul) ocorre a adição de 11 novas proteínas, no pré-complexo III houve o acoplamento de 13 novas proteínas (verde), já no pré-complexo II foi observado o acoplamento de 1 nova proteína (roxo) e finalmente o acoplamento de 16 novas proteínas no supercomplexo de maior massa molecular. O esquema de acoplamento das proteínas demonstra que os componentes do supercomplexo I apresentam 44% de proteínas provenientes a partir dos pré-completos (II a V).

4.2.3 Análise da função dos componentes protéicos no cérebro murino.

A identificação das subunidades protéicas que compõe o complexo associado às VDACs 1 e 2 nas mitocôndrias neuronais murina pode ser visualizada na Ilustração 8 e a identificação dos componentes do complexo pode ser visualizada na tabela 2. Na Tabela 2 são citadas as proteínas identificadas como interactantes da VDAC na espécie murina.

Ilustração 8. SDS-PAGE do complexo associado à VDAC na espécie murina.

Com relação às proteínas interactantes com as VDACs 1 e 2 nos neurônios, identificamos 25 proteínas de diversas funções tais como fosforilação oxidativa (52%), ciclo do ácido cítrico (8%), biogênese dos ribossomos (8%), chaperonas (8%), entre outras. É possível observar similaridade entre as proporções das funções protéicas identificadas nas diferentes espécies estudadas, o que demonstra uma estrutura básica semelhante, diferenciando-se assim de acordo com o ambiente metabólico.

Tabela 2. Identificação resultante dos complexos protéicos associados à VDAC na espécie murina.

I
IMMT
NDUS1
MINA
ODP2
ATPA
QCR2
ATPB
NDUS2
M3K12
FOXG1
NDUAA
GNAO
STML2
NDUA9
VDAC1
VDAC2
MDHM
PHB2
PHB
ATPG
UBP1
DPP6
MYPT1
NDUS3
NDUV2
AT5F1
ATP5H

- **Supercomplexo**

- ATPA: ATP synthase subunit alpha
- AT5F1: ATP synthase subunit b mitochondrial
- ATPB: ATP synthase subunit beta
- ATPG: ATP synthase subunit gamma, mitochondrial
- AT5H: ATP synthase subunit d mitochondrial
- DPP6: Dipeptidyl aminopeptidase-like protein 6
- FOXG1: Forkhead box protein G1
- GNAO: Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha
- IMMT: Mitofilin
- MINA: Myc-induced nuclear antigen
- MDHM: Malate dehydrogenase, mitochondrial
- MYPT1: Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A
- M3K12: Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 12

- NDUA9: NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9 mitochondrial
- NDUA9: NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10 mitochondrial
- NDUS1: NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit mitochondrial
- NDUS2: NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial
- NDUS3: NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3 mitochondrial
- NDUV2: NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2 mitochondrial
- ODP2: Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial
- PHB: Prohibitin
- PHB2: Prohibitin-2
- QCR2: Cytochrome b-c1 complex subunit 2 mitochondrial
- STML2: Stomatin-like protein 2
- UBP1: Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1
- VDAC1: Voltage dependent anion selective channel isoform 1
- VDAC2: Voltage dependent anion selective channel isoform 2

O complexo proteico da VDAC constitui-se de ATP synthase subunit alpha (ATPA), ATP synthase subunit b (AT5F1), ATP synthase subunit beta (ATPB), ATP synthase subunit gamma (ATPG), ATP synthase subunit d (AT5H), Cytochrome b-c1 complex subunit 2 (QCR2), Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex (ODP2), Dipeptidyl aminopeptidase-like protein 6 (DPP6), Forkhead box protein G1 (FOXG1), Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha (GNAO), Malate dehydrogenase (MDHM), Mitofilin (IMMT), Myc-induced nuclear antigen (MINA), Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 12 (M3K12), NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9 (NDUA9), NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10 (NDUA9), NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit (NDUS1), NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2 (NDUS2), NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3 (NDUS3), NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1 (NDUV1), NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2 (NDUV2), Prohibitin (PHB), Prohibitin-2 (PHB2), Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A

(MYPT1), Stomatin-like protein 2 (STML2) e Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1 (UBP1).

Dentre as proteínas interactantes com a VDAC observadas no cérebro murino, não encontrada no interactoma bovino, há a presença de proteínas relevantes ao crescimento e desenvolvimento de células neuronais, tais como a proteína M3K12 que exerce um papel significativo na regulação da migração radial e projeção axonal de neurônios neocorticais de ratos (HIRAI *et al.*, 2006); além de participar como ativadora da via M3K12-JNK (c-Jun N-terminal Kinase) participando na regeneração/degeneração axonal e plasticidade sináptica de uma ampla variedade de tecidos neurais (HIRAI *et al.*, 2011).

Outra proteína ligada ao crescimento neuronal, ausente no cérebro bovino, é a MYPT1 (myosin phosphatase target subunit), cuja função é vital na manutenção da integridade física e funcional da fosfatase da miosina (TWOMEY *et al.*, 2010), ao ligar-se à miosina fosforilada; defosforilando-a (WYLIE *et al.*, 1998). Com o mesmo enfoque identificamos a proteína GNAO, tradutora das informações de receptores transmembrana, identificada como o principal componente do cone de crescimento da membrana neuronal (STRITTMATTER *et al.*, 1990). Estudos *in vivo* em embriões aviários demonstraram que a superexpressão de FOXG1 resulta em um espessamento do neuroepitélio e crescimento excessivo do telencéfalo e mesencéfalo (AHLGREN *et al.*, 2003). Além disso, essa proteína promove a sobrevivência de neurônios pós-mitóticos. Adicionalmente, mutações na FOXG1 aparecem associadas com doenças associadas ao desenvolvimento neurológico como a epilepsia (DASTIDAR *et al.*, 2011). A associação dessa proteína à VDAC pode elucidar vários processos metabólicos dos quais ambas podem atuar durante o funcionamento celular.

Outra proteína observada apenas no cérebro de rato é uma proteína reguladora dos canais iônicos, tal como a DPP6 uma glicoproteína de membrana expressa predominantemente no SNC (CLARCK *et al.*, 2008). DPP6 associa-se com subunidades formadoras de poros em canais e facilitando o seu tráfego e membrana alvo, reconstitui as propriedades dos canais nativos em sistemas de expressão heterólogos e é coexpressa com as subunidades formadoras de poros no compartimento somatodendrítico de neurônios do sistema nervoso central (NADAL *et al.*, 2003). Mutações no gene codificador da proteína DPP6 vem sendo

associados a diversas doenças, tais como esclerose amiotrófica lateral (ALS) e autismo (CLARCK *et al.*, 2008).

Exclusivamente também no cérebro de rato, há também a presença de proteínas reguladoras da proliferação celular como a MINA53 (Myc-induced nuclear antigen) (TSUNEOKA *et al.*, 2002). Além disso, MINA53 regula a remodelagem da cromatina, o que parece em grande parte afetar os padrões de expressão genica (TSUNEOKA *et al.*, 2002).

Estudos recentes confirmaram a STOML2 (Stomatin-like protein 2) como tendo localização mitocondrial (LAPATSINA *et al.*, 2011). Observou-se que a STOML-2 interage com proibitinas, fato também observado no presente estudo. Sua depleção causa a STOML-2 leva a degradação de proibitinas e de subunidades dos complexos da cadeia respiratória I e IV (LAPATSINA *et al.*, 2011). A presença da proteína UBCL1 participante do sistema ubiquinona-proteassomo é responsável pela degradação de varias proteínas citosólicas e nucleares em células eucarióticas (GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002). Obtendo assim uma função chave na regulação de diversos processos celulares sob diversas condições fisiológicas e patológicas (ELDRIDGE; O'BRIEN, 2010).

4.2.4 Comparação entre os componentes proteicos dos supercomplexos de murino e bovino

Os supercomplexos de VDAC nos neurônios bovinos e murinos são bastante distintos. Nos supercomplexos de VDAC neuronal murina e bovina havia cerca de 50% de proteínas comuns, como pode ser visualizado na Ilustração 9. Este esquema colorido demonstra os componentes, em murinos, que não possuem a coloração laranja são proteínas encontradas em comum com a espécie bovina. A identificação das proteínas encontradas em comum nas duas espécies é listada na tabela abaixo.

Ilustração 9. Representação das proteínas encontradas no complexo pelo BN-SDS PAGE e MS. Foram identificadas 14 proteínas em comum no supercomplexo da espécie murina e bovina. A - Gel BN/SDS PAGE espécie aviar; B - Gel BN/SDS PAGE espécie bovina.

Legenda dos componentes proteicos observados, em comum, nos supercomplexos das duas espécies estudadas.

- ATPA: ATP synthase subunit alpha
- AT5F1: ATP synthase subunit b mitochondrial
- ATPB: ATP synthase subunit beta
- AT5H: ATP synthase subunit d mitochondrial
- QCR2: Cytochrome b-c1 complex subunit 2 mitochondrial
- NDUA9: NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9 mitochondrial
- NDUA10: NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10 mitochondrial
- NDUS1: NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit mitochondrial
- NDUS3: NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3 mitochondrial
- NDUF2: NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2 mitochondrial
- PHB: Prohibitin
- PHB2: Prohibitin-2
- VDAC1: Voltage dependent anion selective channel isoform 1
- VDAC2: Voltage dependent anion selective channel isoform 2

A identificação de cerca de 50% de proteínas idênticas entre as espécies bovina e murina, nos supercomplexos, evidencia a presença de uma base comum, porém com diferentes ambientes estruturais. Isto porque a VDAC encontra-se nos dois sistemas (murino e bovino) face a 60% de ligantes diferentes. Estes interactomas diferenciados podem explicar o porquê da existência de diferentes proporções de sítios A e B nos neurônios murino e bovino.

4.2.4.1 Análises da expressão diferenciada dos componentes do supercomplexo protéico nas diferentes espécies.

Verificou-se a possibilidade de existir diferenças significativas de expressão entre os componentes proteicos em comum nas espécies bovina e murina. Foram considerados candidatos a expressão diferencial os spots que apresentavam o valor médio da %Volume acima de 1,5x, como podem ser visualizadas na Tabela 3.

Tabela 3. Componentes protéicos diferenciais entre a espécie bovina e murina.

Nome da proteína	Relação % volume em bovino e murino
ATPA	1,52x
ATPB	3,82x
VDACs 1 e 2	1,58x
NDUS3, QCR2	0,24x
PHB2	0,64x
PHB	0,58x

Conforme demonstrado na tabela 3, a proteína ATPB é 3,8 vezes mais expressas em bovino em comparação ao murino, enquanto na espécie murina as proteínas NDUS3 e QCR2 foram cerca de 4 vezes mais expressas em relação a espécie bovina. Cerca de 57% das proteínas, observadas em comum nas espécies murina e bovina, demonstram uma expressão do spot diferenciada (valor acima de 1,5x).

Tais proteínas superexpressas na espécie murina, com exceção das chaperonas (PHB e PHB2), participam do processo de fosforilação oxidativa.

Estudos do Laboratório de Neurociência e Proteômica verificaram que através do sítio A ocorre o acesso preferencial ao ATP intramitocondrial, gerado pelo processo de fosforilação oxidativa ativa (CERQUEIRA CÉSAR; WILSON, 2002). Esta relação em murino é de 90%, ou seja, 90% da HXK acoplada à mitocôndria cerebral é dependente do ATP gerado intramitocondrialmente pela fosforilação oxidativa.

Apesar da função primária da mitocôndria ser a de fornecer e regular a energia celular, também tem sido demonstrada estar envolvida em diversos processos neurodegenerativos incluindo excitotoxicidade, produção de espécies

reativas de oxigênio, desregulação celular da homeostase de cálcio e apoptose. Adicionalmente, toxinas que possuem como alvo específico a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial são estudadas a fim de reproduzir a patogênese e avaliar a progressão das doenças de Huntington e Parkinson, respectivamente (ADHIHETTY; BEAL, 2008).

Além das proteínas identificadas como participantes do metabolismo energético, identificamos proteínas associadas à VDAC com atuações relevantes em outros processos metabólicos (Ilustração 10), tais como: manutenção estrutura/morfologia mitocondrial (LETM1, CHCH3, TCP-1), regulação da liberação das espécies reativas de oxigênio (ACON, MDHM, GRP75), reparo do DNA (MMS22), controle da ativação da via apoptótica p53 (UT14A, G3P), atuação gliomas (SWP70), regeneração/degeneração axonal (M3K12), crescimento neuronal (MYPT1, GNAo, FOXG1), regulação canais iônicos (DPP6), entre outras.

Ilustração 10. Funções das proteínas interactivas com a VDAC.

O presente estudo evidenciou um padrão dissonante de complexação das VDACs 1 e 2 em neurônios das espécies murina (I) e bovina (V). Observamos a presença de diversas proteínas singulares nos cérebros bovino e murino. Tais

diferenças nos interactomas das proteínas associadas à VDAC evidenciam a presença de um ambiente metabólico distinto, as quais podem ser a base da diferença entre os sítios de ligação A e B observados nas diferentes espécies.

A utilização do Western Blotting e a confirmação das proteínas do interactoma da VDAC via espectrometria de massa, não permitiu – nos evidenciar uma interação permanente entre a hexoquinase-VDAC. Tal constatação, contudo não exclui uma possível interação transitória, uma vez que a mesma depende da situação fisiológica da célula.

Segundo Wittig e Schagger (2009) a interação proteína-proteína obtida através da metodologia do BN/SDS-PAGE possibilita a identificação de interações proteicas permanentes. Tendo em vista que a HXK é uma enzima citosólica e que sua ligação à VDAC seja transitória, ou seja, sua atividade é requerida de acordo com a necessidade do metabolismo energético neuronal, os resultados aqui obtidos são plausíveis com o descrito na literatura. Visando a identificação das interações não-permanentes/dinâmicas da VDAC-hexoquinase, realizaremos estudos futuros usando a metodologia do cross-linking, seguido pela técnica de BN/SDS PAGE e a identificação dos componentes proteicos via espectrometria de massas.

5 Conclusões

Os resultados reportados sinalizam que a etiologia desses sítios está ligada aos diferentes interactantes da VDAC observados em mitocôndrias de células murinas e bovinas. Observamos haver uma diferença de 50% no interactoma da VDAC nesses dois sistemas. Corolário dessa constatação é a existência de ambientes diferenciados nessas mitocôndrias, aos quais liga-se a hexoquinase. A proporção diferenciada de sítios A e B reportada nessas duas espécies, com certeza deve-se a esses diferentes interactomas.

Tabela S1. Identificação das proteínas contidas na Figura 5 via MALDI- TOF TOF, na espécie murina

COMPLEXO I							
Spot	Número acesso	Nome da proteína	Mascot score	Sequência cobertura (%)	Matches MS/MS	Teórico pI	Mr
1	IMMT	Mitochondrial inner membrane protein (Fragment)	487	13,3	10	5,57	67176
2	NDUS1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	858	16,5	15	5,65	79411
3	MINA	Myc-induced nuclear antigen	36	2,8	2	6,45	53215
4	ODP2	Dihydropyridyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	144	4,9	4	8,76	67165
5	ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	1113	17,5	14	9,22	59867
6	QCR2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	35	3,1	2	9,16	48396
7	ATPB	ATP synthase beta subunit	76	6,1	3	4,92	51202
8	NDUS2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	656	24,2	16	6,52	52561
	M3K12	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 12	39	1,1	2	5,81	96306
	FOXG1	Forkhead box protein G1	38	2,3	2	8,99	51466
9	ATPB	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	1527	27,4	18	5,19	56353
10	NDUAA	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	161	10,1	6	7,64	40493
	GNAO	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha	148	8,2	4	5,34	40068
	STML2	Stomatin-like protein 2	48	3,1	1	8,74	38414
11	NDUA9	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial	450	17,8	14	9,83	42559
12	VDAC1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	756	32,5	11	8,62	30755
	VDAC2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	96	6,8	2	7,44	31745
	MDHM	Malate dehydrogenase, mitochondrial	38	4,7	1	8,93	35683
13	PHB2	Prohibitin-2	736	28,4	14	9,83	33312
14	PHB	Prohibitin	605	21,3	10	5,57	29820
	ATPG	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	128	4	2	8,87	30190
	UBP1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1	59	1,5	2	5,31	87328
	DPP6	Dipeptidyl aminopeptidase-like protein 6	40	1,3	2	5,95	97301
	MYPT1	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A	37	0,9	2	5,35	115281
	NDUS3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	301	14	6	7,07	30226
16	NDUV2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	427	18,5	6	6,23	27378
17	NDUV2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	230	18,5	5	6,23	27378
	AT5F1	ATP synthase subunit b, mitochondrial	110	7,8	4	9,39	28868
18	ATP5H	ATP synthase subunit d, mitochondrial	477	39,8	9	6,17	18763

Tabela S2. Identificação das proteínas contidas na Figura 5 via MALDI- TOF TOF, na espécie bovina.

COMPLEXO I							
Spot	Accession	Name of protein	Mascot score	Sequence coverage (%)	Matches MS/MS	Theoretical pI	Mr
1	AATM	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	370	16,0	6	9,19	47513
	KCRU	Creatine kinase U-type, mitochondrial	305	13,2	5	8,60	46896
2	NDUS1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	361	7,8	8	5,82	79441
3	ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	683	15,6	11	9,21	59719
4	ATPB	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	1127	29,0	18	5,15	56283
5	QCR1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	201	5,2	3	5,94	52735
	TCPQ	T-complex protein 1 subunit theta	40	1,5	2	5,40	59609
6	QCR2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	534	20,8	11	8,80	48148
	NDUS3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	312	19,5	5	6,54	30284
8	AATM	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	388	19,5	10	9,19	47513
	RPC1	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC1	32	1,5	3	8,81	155789
	ABD12	Monoacylglycerol lipase ABHD12	25	2,3	2	8,98	45219
9	NDUAA	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	293	10,2	8	6,52	39264
10	NDUA9	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial	583	24,2	15	9,57	42848
11	VDAC1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	781	36,0	12	8,62	30740
	VDAC2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	49	6,8	2	7,48	31619
12	PHB2	Prohibitin-2	637	38,8	18	9,85	33357
13	PHB	Prohibitin	465	21,3	10	5,57	29804
	SWP70	Switch-associated protein 70	41	1,7	2	5,82	68920
14	NDUS3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	558	27,1	12	6,54	30284
	QCR2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	57	4,2	1	8,80	48148
15	CHCH3	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3, mitochondrial	151	10,6	4	8,52	26100
	NDUS3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	74	9,8	4	6,54	30284
16	NDUBA	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	320	32,4	10	8,74	20965
	NDUV2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	165	10,4	4	8,21	27307
	AT5F1	ATP synthase subunit b, mitochondrial	65	3,1	2	9,42	28821
17	ATP5H	ATP synthase subunit d, mitochondrial	478	47,2	12	5,99	18692
	NDUS8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial	109	10,8	3	6,45	23896
18	ATPO	ATP synthase subunit O, mitochondrial	146	12,2	3	9,91	23319
	NDUA8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8	116	15,1	4	8,10	20091
	MBP	Myelin basic protein	45	10,1	1	11,28	18323

PRÉ-COMPLEXO II							
Spot	Accession	Name of protein	Mascot score	Sequence coverage (%)	Matches MS/MS	Theoretical pI	Mr
1	SRSF7	Serine/arginine-rich splicing factor 7	29	3,8	2	11,87	26941
2	ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	38	2,4	2	9,21	59719
3	ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	118	5,2	3	9,21	59719
4	ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	669	15,6	12	9,21	59719
5	ATPB	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	1155	33	20	5,15	56283
6	QCR1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	454	12,7	10	5,94	52735
7	QCR2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	467	16,1	11	8,80	48148
8	KCRU	Creatine kinase U-type, mitochondrial	389	13,2	8	8,60	46896
9	AATM	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	317	12,3	9	9,19	47513
	LDH6B	L-lactate dehydrogenase A-like 6B	31	2,6	2	8,91	41592
	ABD12	Monoacylglycerol lipase ABHD12	31	2,3	2	8,98	45219
10	VDAC1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	531	27,9	9	8,62	30740
	MDHM	Malate dehydrogenase, mitochondrial	92	4,1	2	8,82	35668
	VDAC2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	33	6,8	2	7,48	31619
11	ATPG	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	290	11,1	6	9,34	33072
	CY1	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial	78	4,9	2	9,14	35296
	ADT2	ADP/ATP translocase 2	33	3	2	9,79	32955
12	AT5F1	ATP synthase subunit b, mitochondrial	264	12,5	7	9,42	28821
13	ATP5H	ATP synthase subunit d, mitochondrial	441	41	9	5,99	18692
14	ATPO	ATP synthase subunit O, mitochondrial	80	6,6	2	9,91	23319

PRÉ-COMPLEXO III							
Spot	Accession	Name of protein	Mascot score	Sequence coverage (%)	Matches MS/MS	Theoretical pI	Mr
2	SRSF7	Serine/arginine-rich splicing factor 7	28	3,8	1	11,87	26941
3	ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	756	17,5	13	9,21	59719
4	ATPB	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	907	23,7	16	5,15	56283
5	QCR1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	418	10,2	8	5,94	52735
6	QCR2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	583	20,8	14	8,80	48148
7	KCRU	Creatine kinase U-type, mitochondrial	443	13,5	11	8,60	46896
8	AATM	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	397	16,0	14	9,19	47513
	RPC1	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC1	35	1,5	3	8,81	155789
	ABD12	Monoacylglycerol lipase ABHD12	34	2,3	2	8,98	45219
	UBP33	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 33	32	1,3	2	5,61	103322
9	VDAC1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	506	26,7	8	8,55	30740
	MDHM	Malate dehydrogenase, mitochondrial	140	7,4	4	8,82	35668
	VDAC2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	43	6,8	1	7,48	31619
10	ATPG	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	286	11,1	6	9,34	33072
	CY1	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial	76	4,9	2	9,14	35296
	ADT2	ADP/ATP translocase 2	43	3,0	1	9,79	32955
11	UCRI	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	195	8,0	4	9,04	29546
12	AT5F1	ATP synthase subunit b, mitochondrial	254	12,5	7	9,42	28821
13	ATP5H	ATP synthase subunit d, mitochondrial	380	30,4	9	5,99	18692
14	ATPO	ATP synthase subunit O, mitochondrial	138	12,2	4	9,91	23319

PRÉ-COMPLEXO IV							
Spot	Accession	Name of protein	Mascot score	Sequence coverage (%)	Matches MS/MS	Theoretical pI	Mr
1	ACON	Aconitate hydratase, mitochondrial	258	9,2	10	7,87	85358
3	GRP75	Stress-70 protein, mitochondrial	50	4,3	3	5,97	73741
4	MMS22	Protein MMS22-like	37	1,0	2	6,75	142273
5	ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	521	13,0	10	9,21	59719
6	KCRU	Creatine kinase U-type, mitochondrial	195	13,2	8	8,60	46896
7	KCRU	Creatine kinase U-type, mitochondrial	536	13,7	13	8,60	46896
8	VDAC1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	726	36,0	12	8,62	30740
	MDHM	Malate dehydrogenase, mitochondrial	97	4,1	2	8,82	35668
	VDAC2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	37	6,8	2	7,48	31619
9	ADT3	ADP/ATP translocase 3	148	9,4	6	9,82	32877
	ADT1	ADP/ATP translocase 1	148	10,1	6	9,84	32967
	CY1	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial	112	9,8	4	9,14	35296
	MPCP	Phosphate carrier protein, mitochondrial	41	3,3	2	9,39	40139
	UT14A	U3 small nucleolar RNA-associated protein 14 homolog A	35	1,0	1	8,29	88086

PRÉ-COMPLEXO V							
Spot	Accession	Name of protein	Mascot score	Sequence coverage (%)	Matches MS/MS	Theoretical pI	Mr
1	NNTM	NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial	489	7,6	13	8,40	113852
2	PTX3	Pentraxin-related protein PTX3	34	3,4	1	5,08	42020
3	LETM1	LETM1 and EF-hand domain-containing protein 1, mitochondrial	35	2,5	1	6,34	81817
4	DHE3	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	505	15,1	12	7,25	61511
5	ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	630	15,6	12	9,21	59719
6	G3P	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	66	4,2	2	8,50	35868
	PTX3	Pentraxin-related protein PTX3	32	3,4	2	5,08	42020
7	VDAC1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	726	36,0	12	8,62	30740
	VDAC2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	37	6,8	2	7,48	31619
8	ADT1	ADP/ATP translocase 1	402	20,5	10	9,84	32967
	ADT2	ADP/ATP translocase 2	381	21,1	9	9,79	32955
	MPCP	Phosphate carrier protein, mitochondrial	55	3,3	2	9,39	40139
	M2OM	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	53	3,8	1	9,89	34172
	UT14A	U3 small nucleolar RNA-associated protein 14 homolog A	41	1,0	2	8,29	88086

6 Referências Bibliográficas

ABEL, D. *et al.* **SFRS7-Mediated Splicing of Tau Exon 10 Is Directly Regulated by STOX1A in Glial Cells.** *PLoS ONE*, v.6, n.7, e.21994. 2011.

ABU-HAMAD S., SIVAN S., SHOSHAN-BARMATZ V. **The expression level of the voltage-dependent anion channel controls life and death of the cell.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* vol. 103, p. 5787-5792. 2006.

ABU-HAMAD S. **The VDAC1 N-terminus is essential both for apoptosis and the protective effect of anti-apoptotic proteins.** *Journal of Cell Science* vol. 122, p. 1906-1916. 2009.

ADHIHETTY, P.J. & BEAL, M.F. **Creatine and Its Potential Therapeutic Value for Targeting Cellular Energy Impairment in Neurodegenerative Diseases.** *Neuromol. Med.*, vol.10, p.275-290. 2008.

AHLGREN, S. *et al.* **Excess FoxG1 Causes Overgrowth of the Neural Tube.** *J Neurobiol*, vol.57, p.337-349. 2003.

AL JAMAL J. A. **Involvement of Porin N,N-dicyclohexylcarbodiimide-Reactive Domain in Hexokinase Binding to the Outer Mitochondrial Membrane.** *The Protein Journal* 24, p.1-8, 2005.

BAINES C. *et al.* **Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death.** *Nature* vol. 9, p. 550-555. 2007.

BAYRHUBER M. *et al.* **Structure of the human voltage-dependent anion channel.** *Proceedings of National Academy of Science USA* vol. 105, p. 15370-15375. 2008.

BELTRANDELRIO H. & WILSON J. E. **Interaction of Mitochondrially Bound Rat Brain Hexokinase with Intramitochondrial Compartments of ATP Generated by Oxidative Phosphorylation and Creatine Kinase** *Archives of Biochemistry and Biophysics* vol. 296, p. 667 – 677, 1992.

BOURKE, G.J. *et al.* **Slow Axonal Transport of the Cytosolic Chaperonin CCT With Hsc73 and Actin in Motor Neurons.** *Journal of Neuroscience Research*, vol.68, p.29-35. 2002.

BROADWATER, L. *et al.* **Analysis of the mitochondrial proteome in multiple sclerosis cortex.** *Biochemica et Biophysica Acta*, vol.1812, p.630-641. 2011.

CANTU, D.; SCHAACK, J.; PATEL, M. **Oxidative Inactivation of Mitochondrial Aconitase Results in Iron and H₂O₂-Mediated Neurotoxicity in Rat Primary Mesencephalic Cultures.** *PLoS ONE*, vol.9, n.4, e.7095. 2009.

CERQUEIRA CESAR M. E WILSON, J. E. **Application of a Double Isotopic Labeling Method to a Study of the Interaction of Mitochondrially Bound Rat Brain Hexokinase with intramitochondrial Compartments of ATP Generated by Oxidative Phosphorylation.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* vol. 324, p. 9- 14. 1995.

CERQUEIRA CESAR M. & WILSON, J. E. **Further Studies on the Coupling of Mitochondrially Bound Hexokinase to Intramitochondrially Compartmented ATP, Generated by Oxidative Phosphorylation.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* vol. 350, p. 109-117. 1998.

CERQUEIRA CESAR M. E WILSON, J. E. **Functional Characteristics of Hexokinase Bound to the Type A and Type B Sites of Bovine Brain Mitochondria.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* vol. 397, p. 106-112. 2002.

CERQUEIRA CESAR M. E WILSON, J. E. **All three isoforms of the voltage-dependent anion channel (VDAC1, VDAC2, and VDAC3) are present in mitochondria from bovine, rabbit, and rat brain** *Archives of Biochemistry and Biophysics* vol. 422 p. 191-196. 2004.

CHENG E. *et al.* **VDAC2 Inhibits BAK Activation and Mitochondrial Apoptosis** *Science* vol. 301, p. 513-517. 2003.

CHOUDHARY O. *et al.* **The electrostatics of VDAC: implications for selectivity and gating.** *Journal of Molecular Biology* vol. 396, p. 580-592. 2010.

COLOMBINI M. **A candidate for the permeability pathway of the outer mitochondrial membrane.** *Nature* vol. 279, p. 643-645. 1979.

COLOMBINI M., BLACHLY-DYSON E. & FORTE M. **VDAC, a channel in the outer mitochondrial membrane.** *Ion Channels* vol. 4, p. 169-202. 1996.

COLOMBINI M. **VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol.** *Molecular and Cellular Biochemistry* vol. 256, p.107-115. 2004.

COLOMBINI M. **The published 3D structure of the VDAC channel: native or not?** *Trends in Biochemical Sciences* vol. 34, p. 382-389. 2009.

COLOMBO M. & BROADBENT N. **Is the avian hippocampus a functional homologue of the mammalian hippocampus?** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* vol. 24, p. 465-484. 2000.

CLARCK, B.C. *et al.* **DPP6 localization in brain supports function as a Kv4 channel associated protein.** *Frontiers in Molecular Neuroscience*, vol.1, art.8, p.1-11. 2008.

CRAWFORD R. D. **Epileptiform seizures in domestic fowl.** *Journal of Heredity* vol. 61, p.185-188. 1970.

DATTA A. *et al.* **Quantitative neuroproteomics of an in vivo rodent model of focal cerebral ischemia/reperfusion injury reveals a temporal regulation of novel pathophysiological molecular markers.** *Proteome Research* vol. 10, p. 5199-5213. 2011.

DARSHI, M. *et al.* **ChChd3, an Inner Mitochondrial Membrane Protein, Is Essential for Maintaining Crista Integrity and Mitochondrial Function.** *The Journal of Biological Chemistry*, vol.286, n.4, p.2918-2932. 2011.

DASTIDAR, S.G.; LANDRIEU, P.M.Z.; D'MELLO, S.R. **FoxG1 Promotes the Survival of Postmitotic Neurons.** *The Journal of Neuroscience*, vol.31, n.2, p.402-413. 2011.

DE PINTO V. *et al.* **New functions of an old protein: the eukaryotic porin or voltage dependent anion selective channel (VDAC).** *The Italian Journal of Biochemistry* vol. 52, p. 17-24. 2003.

DE PINTO V. *et al.* **Determination of the Conformation of the Human VDAC1 N-terminal Peptide, a Protein Moiety Essential for the Functional Properties of the Pore** *ChemBioChem* 8, p. 744-756, 2007.

DESAGHER S. & MARTINOU J. **Mitochondria as the central control point of apoptosis.** *Trends in Cell Biology* vol. 10, p. 369-377. 2000.

DIMMER, K.S. **LETM1, deleted in Wolf-Hirschhorn syndrome is required for normal mitochondrial morphology and cellular viability.** *Human Molecular Genetics*, vol. 17, n. 2, p.201-214. 2008.

ELDRIDGE & O'BRIEN **Therapeutic strategies within the ubiquitin proteasome system.** *Cell Death and Differentiation* vol. 17, 4–13. 2010.

FAUSTIN B. *et al.* **Mobilization of adenine nucleotide translocators as molecular bases of the biochemical threshold effect observed in mitochondrial diseases.** *The Journal of Biological Chemistry* vol. 279, p. 20411-20421. 2004.

FERRER I. **Altered mitochondria, energy metabolism, voltage-dependent anion channel, and lipid rafts converge to exhaust neurons in Alzheimer's disease** *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* vol. 41, p. 425-431. 2009.

GLICKMAN G. H. & CIECHANOVER A. **The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction.** *Physiol Rev* vol. 82, p. 373–428. 2002.

GOLDIN N. **Methyl jasmonate binds to and detaches mitochondria-bound hexokinase** *Oncogene* vol. 27, p. 4636-4634. 2008.

GONG Z., OBENAU A., LI N., SARTY G. E KENDALL E. **Recurrent nonstatus generalized alter the developing chicken brain** *Epilepsia* vol. 44, p.1380-1387. 2003.

HALESTRAP A. **What is the mitochondrial permeability transition pore?** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* vol. 46, p.821-831. 2009.

HASTINGS T. **The role of dopamine oxidation in mitochondrial dysfunction: implications for Parkinson's disease.** *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* vol 41, p. 469-472. 2009.

HIRAI, S. *et al.* **The c-Jun N-Terminal Kinase Activator Dual Leucine Zipper Kinase Regulates Axon Growth and Neuronal Migration in the Developing Cerebral Cortex.** *Journal of Neuroscience*, vol. 26, n.46, p.11992-12002. 2006.

HIRAI, S. *et al.* **Axon Formation in Neocortical Neurons Depends on Stage-Specific Regulation of Microtubule Stability by the Dual Leucine Zipper Kinase– c-Jun N-Terminal Kinase Pathway.** *Journal of Neuroscience*, vol.31, n.17, p.6468-6480. 2011.

HODGE T. & COLOMBINI M. **Regulation of Metabolite Flux through Voltage-Gating of VDAC Channels** *The Journal of Membrane Biology* vol. 157, p. 271-279. 1997.

HOLMES, R.S.; GOLDBERG, E. **Computational analyses of mammalian lactate dehydrogenases: human, mouse, opossum and platypus LDHs.** *Comput Biol Chem.*, v.33, n.5, p.379-385. 2009.

HU, L. *et al.* **A Small Ribosomal Subunit (SSU) Processome Component, the Human U3 Protein 14A (hUTP14A) Binds p53 and Promotes p53 Degradation.** *The Journal of Biological Chemistry*, vol.286, n.4, p.3119-3128. 2011.

JEON, H. *et al.* **Analysis of glial secretome: the long pentraxin PTX3 modulates phagocytic activity of microglia.** *Journal of Neuroimmunology*, vol.229, p.63-72. 2010.

JIANG W. *et al.* **Preliminary explorations of the role of mitochondrial proteins in refractory epilepsy: some findings from comparative proteomics.** *Journal of Neuroscience Research* vol. 85, p. 3160-3170. 2007.

KABIR F. & WILSON J. E. **Mitochondrial hexokinase in brain of various species: differences in sensitivity to solubilization by Glucose-6 phosphate** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 300, p. 641-650, 1993.

KENDALL E. *et al.* **Physical and chemical characterization of neurological injury in an avian model of primary generalized epilepsy.** *Image and Analysis and Stereology* vol. 21, p. 77-86. 2002.

KOPPEL D. *et al.* **Bacterial expression and characterization of the mitochondrial outer membrane channel. Effects of n-terminal modifications.** *The Journal of Biological Chemistry* vol. 273, p. 13794-13800. 1998.

KROEMER G., GALLUZZI L. & BRENNER C. **Mitochondrial membrane permeabilization in cell death.** *Physiological Reviews* vol. 87, p. 99-163. 2007.

LAPATSINA, L. *et al.* **Stomatin-domain proteins.** *European Journal of Cell Biology*. 2011.

LE BRAS M., CLÉMENT M.V., PERVAIZ S E BRENNER C. **Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death.** *Histology Histopathology* vol. 20, p. 205-220. 2005.

Mattson M. P. e Kroemer G. **Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection** *Nature* 9, p. 196-205, 2003.

MELLO C. *et al.* **Acrolein induces selective protein carbonylation in synaptosomes.** *Neuroscience* vol. 147, p. 674-679. 2007.

NADAL, M.S. *et al.* **The CD26-Related Dipeptidyl Aminopeptidase-like Protein DPPX Is a Critical Component of Neuronal A-Type K⁺ Channels.** *Neuron*, vol.37, p.449-461. 2003.

PAN, S.; RYU, S.Y.; SHEU, S.S. **Distinctive characteristics and functions of multiple mitochondrial Ca^{2+} influx mechanisms.** *Sci China Life Sci*, vol. 54, n.8, p.763-769. 2011.

PANICKAR K., NONNER D. & BARRETT J. **Overexpression of Bcl-xl protects septal neurons from prolonged hypoglycemia and from acute ischemia-like stress.** *Neuroscience* vol. 135, p. 73-80. 2005.

PASTORINO J. & HOEK J. **Regulation of hexokinase binding to VDAC.** *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* vol. 40, 171-182. 2008.

POLETI M. *et al.* **Relationship Between Expression of Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC) Isoforms and Type of Hexokinase Binding Sites on Brain Mitochondria** *Journal of Molecular Neuroscience* vol. 41, p. 48-54. 2010.

PIWKO, W. *et al.* **RNAi-based screening identifies the Mms22L-Nfkbil2 complex as a novel regulator of DNA replication in human cells.** *The EMBO Journal*, vol.29, p.4210-4222. 2010.

RAHMANI Z., MAUNOURY C. & SIDDIQUI A. **Isolation of a novel human voltage-dependent anion channel gene** *European Journal of Human Genetics* vol. 6, p. 337-340. 1998.

REISINGER V. & EICHACKER L. **How to Analyze Protein Complexes by 2D Blue Native SDS-PAGE** *Practical Proteomics* vol. 1, p. 6-16. 2007.

REYMANN S. *et al.* **Further evidence for multitopological localization of mammalian porin (VDAC) in the plasmalemma forming part of a chloride channel complex affected in cystic fibrosis and encephalomyopathy.** *Biochemical and Molecular Medicine* vol. 54, 75-87. 1995.

ROBERTSON G.S. **Neuroprotection by the inhibition of apoptosis** *et al. Brain Pathology* 10, p. 283-292, 2000.

RODRIGUEZ-ENRIQUEZ S., HE L. & LEMASTERS J. **Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* vol. 36, p. 2463-2472. 2004.

ROSTOVTSEVA T. & BEZRUKOV S. **VDAC regulation: role of cytosolic proteins and mitochondrial lipids** *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* vol. 40, p. 163-170. 2008.

SAVINAINEN, J.R.; SAARIO, S.M.; LAITINEN, J.T. **The serine hydrolases MAGL, ABHD6 and ABHD12 as guardians of 2-arachidonoylglycerol signalling through cannabinoid receptors.** *Acta Physiol*, vol.204, p.267-276. 2012.

SAITSU, H. *et al.* **Mutations in POLR3A and POLR3B Encoding RNA Polymerase III Subunits Cause an Autosomal-Recessive Hypomyelinating Leukoencephalopathy.** *The American Journal of Human Genetics*, vol.89, p.644-651. 2011.

SCHÄGGER H. & JAGOW G. **Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.** *Analytical Biochemistry* vol. 166, p. 368-379. 1987.

SCHÄGGER H., CRAMER W. & JAGOW G. **Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis.** *Analytical Biochemistry* vol. 217, p. 220-230. 1994.

SEOL, H.J. *et al.* **The Guanine Nucleotide Exchange Factor SWAP-70 Modulates the Migration and Invasiveness of Human Malignant Glioma Cells.** *Translational Oncology*, vol.2, n.4, p.300-309. 2009.

SHI, Q.; GIBSON, G.E. **Up-regulation of the Mitochondrial Malate Dehydrogenase by Oxidative Stress is Mediated by miR-473a.** *Journal of Neurochemistry*, vol.118, p.440-448. 2011.

SONG J., MIDSON C., BLACHLY-DYSON E., FORTE M. & COLOMBINI M. **The Sensor Regions of VDAC Are Translocated from within the Membrane to the Surface during the Gating Processes** *Biophysical Journal* vol. 74, p. 2926-2944. 1998.

STRITTMATTER, S.M. *et al.* **G0 is a major growth cone protein subject to regulation by GAP-43.** *Nature*, vol. 344, p.836-841. 1990.

SULTANA R. *et al.* **Identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain using a redox proteomics approach.** *Neurobiology of Disease* vol. 22, p. 76-87. 2006.

SWAMY M. *et al.* **Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE) for the Identification and Analysis of Multiprotein Complexes.** *Science Signaling* vol. 345, p. 1-17. 2006.

TATTON, N. **Increased Caspase 3 and Bax Immunoreactivity Accompany Nuclear GAPDH Translocation and Neuronal Apoptosis in Parkinson's Disease.** *Experimental Neurology*, vol.166, p.29-43. 2000.

TÖRNROTH-HORSEFIELD S. & NEUTZE R. **Opening and closing the metabolite gate.** *Proceedings of National Academy of Science USA* vol. 105, p. 19565-19566. 2008.

TSUNEOKA, M. *et al.* **A Novel Myc Target Gene, mina53, That Is Involved in Cell Proliferation.** *The Journal of Biological Chemistry*, vol.227, n.38, p.35450-35459. 2002.

TWOMEY, E. *et al.* **Regulation of MYPT1 stability by the E3 ubiquitin ligase SIAH2.** *Experimental Cell Research*, vol.316, p.68-77. 2010.

VYSSOKIKH M. & BRDICZKA D. **VDAC and peripheral channelling complexes in health and disease.** *Molecular and Cellular Biochemistry* vol. 256, p.117-126. 2004.

WANG Z., GARDINER N. & FERNYHOUGH P. **Blockade of hexokinase activity and binding to mitochondria inhibits neurite outgrowth in cultured adult rat sensory neurons.** *Neuroscience Letters* vol. 434, p. 6-11. 2008.

WILSON J. E. **Hexokinases** *Review of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 126, p. 65-198, 1995.

WYLIE S. R., WU P., PATEL H., CHANTLER P. D. **A conventional myosin motor drives neurite outgrowth.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* V. vol. 95, p. 12967–12972. 1998.

WITTIG I. & SCHAGGER H. **Native electrophoretic techniques to identify protein–protein interactions** *Proteomics*, vol. V. 9, p. 5214-5223. 2009.

WITTIG I., BECKHAUS T., WUMAIER Z., KARAS M. E SCHÄGGER H. **Mass estimation of native proteins by blue-native electrophoresis: principles and practical hints** *Molecular & Cellular Proteomics* vol. 20, p. 1-22. 2010.

YANG H. *et al.* **Proteomic approaches to the analysis of multiprotein signaling complexes** *Biochem. and Biophysical Research Commun.* 410, p.114–120, 2010.

YOO B. *et al.* **Changes of voltage-dependent anion-selective channel proteins VDAC1 and VDAC2 brain levels in patients with Alzheimer's disease and Down syndrome.** *Electrophoresis* 22, p. 172-179, 2001.

YUASA-KAWADA J. *et al.* **Midline crossing and Slit responsiveness of commissural axons require USP33.** *Nature Neuroscience* vol. 9, p. 1087-1089. 2009.