



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Análise do Papel Neuroprotetor da Proteína DJ-1 na Doença de Parkinson

Daniela Filipa Flores Jacinto

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof.^a Doutora Graça Maria Fernandes Baltazar

Covilhã, outubro de 2015

Folha em branco

Agradecimentos

Se há alguém a quem tenha de agradecer, acima de tudo é à minha família. Muito Obrigada por todo o esforço e apoio ao longo destes anos para que eu pudesse hoje chegar aqui.

À minha Mãe, Avós, Irmão e Madrinha que são a base de tudo, para que tudo o resto se possa desenvolver. Avô, agora sim acabou.

Esta tese a vós é dedicada, a cada um de vós.

Um imenso obrigada à Professora Graça Baltazar por me ter permitido desenvolver este projeto, por todo o apoio, disponibilidade e dedicação demonstrada ao longo deste ano. Muito Obrigada.

Gostaria também de agradecer Professora Carla Fonseca por sempre se mostrar disponível a ajudar.

À todo o grupo de laboratório, que tão bem me acolheu.

À Rita, muito obrigada, graças a ti tudo foi muito mais simples. Obrigada por estares sempre lá quando precisei, mesmo quando não estavas.

À Julieta, obrigada sempre que foi preciso deixares o que estás a fazer para ajudar. Por todos os momentos passados contigo, por todos os dias até tarde, por toda a amizade.

Ao Diogo, com quem compartilhei este ano e com quem fui aprendendo ao longo dele, obrigada por sempre me ajudares sem hesitar.

Obrigada a vocês por todos os momentos dentro e fora do laboratório, porque mais do que colegas foram amigos.

Foi um prazer partilhar este ano com vocês.

Não quero também deixar de agradecer à Filipa e ao Diogo Neto, por todos os conhecimentos que me transmitiram.

Quero também dar um especial Obrigada à Fátima, muito obrigada por toda a disponibilidade e dedicação.

A todo o laboratório, pois todos sempre que precisei se disponibilizaram a ajudar.

Resumo

O stresse oxidativo é considerado um dos fatores chave no desencadeamento e progressão de diversas doenças neurodegenerativas. Uma vez que a perda progressiva de neurónios dopaminérgicos na *substância nigra pars compacta* constitui a principal característica da doença de Parkinson e que esta população neuronal está sujeita a elevados níveis de stresse oxidativo, sugere-se que este possa estar na base da grande vulnerabilidade destes neurónios.

A DJ-1 é uma pequena proteína com papel neuroprotetor em situações de stresse oxidativo e que tem sido associada à DP esporádica. Apesar das múltiplas funções atribuídas a esta proteína, o seu papel neuroprotetor possui grande relevância nesta patologia, uma vez que ela funciona como um sensor de stresse oxidativo. A DJ-1 é expressa quer por neurónios, quer por astrócitos, localizando-se no citoplasma, núcleo celular, mitocôndria e também extracelularmente. A sua libertação para o meio parece ser facilitada por oxidação.

Este trabalho pretendeu avaliar o papel protetor da DJ-1 extracelular usando como modelo experimental culturas primárias de neurónios do mesencéfalo ventral e co-culturas de neurónios e astrócitos. A lesão neuronal foi induzida por exposição ao estímulo oxidante, H_2O_2 , numa concentração à qual apenas os neurónios dopaminérgicos foram lesados. Ao contrário do esperado a lesão dopaminérgica não foi afetada pela presença de astrócitos. Estudos de imunodepleção da DJ-1 presente no meio mostraram que esta promove a proteção dopaminérgica quer em condições controlo quer após exposição a lesão oxidativa. Por quantificação da DJ-1 presente no meio mostrámos que esta é secretada e que a exposição a H_2O_2 estimula a sua libertação. Com recurso ao uso de DJ-1 conjugada ao fluoróforo Alexa 488 confirmámos a capacidade dos neurónios em captar a proteína extracelular. No entanto, apenas uma pequena percentagem dos neurónios apresentaram incorporação significativa e curiosamente nenhum dos neurónios dopaminérgicos presentes incorporou a proteína marcada, pelo que não é clara a relevância desta recaptura para a proteção neuronal observada.

Em conjunto os resultados obtidos mostraram que neurónios e astrócitos mesencefálicos têm a capacidade de libertar DJ-1, quer em condições basais quer em condições oxidantes, e que a proteína secretada para o meio é relevante para a sobrevivência dopaminérgica. Verificámos ainda que a DJ-1 extracelular pode ser recaptada por neurónios, o que sugere uma ação parácrina desta proteína.

Palavras-chave

DJ-1; Neuroproteção dopaminérgica; Stresse oxidativo; Doença de Parkinson

Folha em branco

Abstract

Oxidative stress is considered one of the key factors in triggering and in the progression of several neurodegenerative diseases. Since the progressive loss of dopaminergic neurons in the *substantia nigra pars compacta* is the main characteristic of Parkinson's disease and that this neuronal population is subject to high levels of oxidative stress, it is suggested that this can be a cause of the great vulnerability of these neurons.

The DJ-1 is a small protein with a neuroprotective role in oxidative stress situations and has been linked to sporadic PD. In spite of the multiple tasks assigned to this protein, its neuroprotective role is very important in this pathology, since it functions as a sensor of oxidative stress. DJ-1 is expressed by brain cells and astrocytes, it is located in the cytoplasm, in the cell nuclei, in the mitochondria and also extracellularly. Its release to the medium seems to be facilitated by oxidation.

This present study aimed at evaluating the protective role of the extracellular DJ-1 using as experimental model primary neuron cultures of ventral midbrain and co-cultures of neurons and astrocytes. The neuronal lesion was induced by exposure to the oxidant stimulus H_2O_2 in a concentration at which only the dopaminergic neurons were harmed. Unlike what was expected, the extension of the dopaminergic lesion was not affected by the presence of astrocytes. Studies in which DJ-1 was immunodepleted from the extracellular milieu showed that it promotes dopaminergic protection, either in basal conditions or after exposure to an oxidative lesion. Quantifying the extracellular DJ-1 present in the medium showed that DJ-1 is released and that the addition of H_2O_2 stimulates its secretion. By using the DJ-1 conjugated to fluorophore Alexa 488, the ability of neurons to capture the extracellular protein was confirmed. However, only a small percentage of neurons showed a significant incorporation, and, curiously, none of the dopaminergic neurons present in the preparations incorporated the marked protein, thus, it is not clear the relevance of this uptake for the neuronal protection observed.

Taken together the results obtained showed that midbrain neurons and astrocytes have the capacity to release DJ-1, both in basal and oxidizing conditions, and that the protein secreted into the medium is relevant for the dopaminergic survival. It was also verified that the extracellular DJ-1 can be recaptured by neurons, suggesting a paracrine action of this protein.

Keywords

DJ-1; Dopaminergic neuroprotection; Oxidative stress; Parkinson's disease

Folha em branco

Índice

Lista de Figuras	xiv
Lista de Tabelas.....	xvi
Lista de Acrónimos	xviii
Capítulo 1 Introdução	1
1. Etiologia e Patologia da Doença de Parkinson	1
2. Stresse Oxidativo	3
2.1. Principais fontes de stresse oxidativo produzidas pelos ND da SNpc	4
2.1.1. Metabolismo da Dopamina	4
2.1.2. Disfunção Mitocondrial	6
2.1.3. Neuroinflamação	7
2.2. Sistema Antioxidante	7
3. Proteína DJ-1	8
3.1. Função Neuroprotetora	9
3.1.1.A DJ-1 na homeostasia mitocondrial.....	11
3.1.2.A DJ-1 na regulação da transcrição	11
3.1.3.A DJ-1 em vias de mecanismos contra o estresse oxidativo	12
Capítulo 2 Objetivos.....	14
Capítulo 3 Métodos	15
1. Animais	15
2. Culturas Primárias de Mesencéfalo.....	15
2.1. Recolha dos Embriões.....	15
2.2. Preparação da Suspensão Celular.....	15
2.3. Cultura de Neurónios e Co-cultura de Neurónios e Astrócitos.....	16
3. Imunodepleção de DJ-1	16
4. Análise da DJ-1 secretada para o meio.....	17
4.1. Preparação das Amostras	17
4.2. Dot Blot.....	18
4.3. Western Blot.....	19
5. Análise da incorporação de DJ-1 exógena	20
5.1. Marcação de DJ-1.....	20
5.2. Aplicação do conjugado Alexa 488-DJ-1	20
6. Imunocitoquímica	21
7. Análise Estatística.....	22
Capítulo 4	23
1. Participação da DJ-1 extracelular na sobrevivência dopaminérgica em condições controlo e de stresse oxidativo	23
2. Avaliação da secreção de DJ-1 em condições controlo e de stresse oxidativo	27
3. Avaliação da capacidade de incorporação de DJ-1 exógena.....	30

Capítulo 5 Discussão.....	38
Capítulo 6 Conclusões e Perspetivas Futuras	40
Capítulo 7 Referências Bibliográficas	42

Folha em branco

Lista de Figuras

Figura 1. Redução do oxigénio a água, com produção de espécies reativas de oxigénio.....	3
Figura 2. Esquema ilustrativo da degradação da dopamina.....	5
Figura 3. Estrutura monomérica e dimérica da DJ-1.....	9
Figura 4. Oxidação das cisteínas e consequente ativação proteolítica de DJ-1.....	10
Figura 5. Esquema ilustrativo de ativação do gene que codifica a enzima tirosina hidroxilase (TH), com recurso a DJ-1.....	12
Figura 6. Representação esquemática do procedimento usado nos ensaios de imunodepleção de DJ-1 e estimulação celular com H ₂ O ₂	17
Figura 7. Representação esquemática do procedimento experimental usado na estimulação celular para análise da secreção de DJ-1.....	18
Figura 8. Efeito da imunodepleção de DJ-1 na sobrevivência dopaminérgica em culturas de neurónios e co-culturas de neurónios e astrócitos em condições basais e após exposição a H ₂ O ₂	25
Figura 9. Efeito da imunodepleção de DJ-1 na sobrevivência neuronal geral quando culturas de Neurónios são estimuladas com H ₂ O ₂	26
Figura 10. Efeito da exposição a H ₂ O ₂ na secreção de DJ-1 em culturas de Neurónios - Dot Blot.....	27
Figura 11. Efeito da exposição a H ₂ O ₂ na secreção de DJ-1 em culturas de Neurónios - Western Blot.....	28
Figura 12. Efeito da exposição a H ₂ O ₂ na secreção de DJ-1 em culturas Co-culturas de neurónio-astrócitos - Dot Blot.....	29
Figura 13. Efeito da exposição a H ₂ O ₂ na secreção de DJ-1 em Co-culturas de Neurónio-astrócitos - Western Blot.....	29
Figura 14. Verificação de co localização de Alexa 488-DJ-1 e marcação para DJ-1.....	32
Figura 15. Análise da localização de Alexa 488 e marcação para DJ-1.....	33
Figura 16. Incorporação de DJ-1 - Análise da localização de Alexa 488-DJ-1 e marcação para MAP-2.....	35
Figura 17. Incorporação de DJ-1 - Análise da localização de Alexa 488-DJ-1 e marcação para TH.....	36
Figura 18. Incorporação de DJ-1 - Análise da localização de Alexa 488-DJ-1 e marcação para GFAP.....	37

Folha em branco

Lista de Tabelas

Tabela 1. Descrição dos anticorpos utilizados na técnica de imunocitoquímica.....	22
---	----

Folha em branco

Lista de Acrónimos

ADNmt	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ATP	Adenosina trifosfato
C106	Cisteína 106
DA	Dopamina
DP	Doença de Parkinson
ERA	Espécies Reativas de Azoto
ERO	Espécies Reativas de Oxigénio
FBS	Soro Fetal de Bovino
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogénio
MAP2	Proteína associada aos microtúbulos do tipo 2
MV	Mesencéfalo Ventral
MV	Mesencéfalo ventral
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
ND	Neurónios dopaminérgicos
ND	Neurónios Dopaminérgicos
NO	Óxido nítrico
PBS	Tampão fosfato salino
PBS-T	Tampão fosfato salino com 0,1% de Tween
PDL	Poli-D-Lisina
PFA 4%	Paraformaldeído 4%
SN	<i>Substancia nigra</i>
SNC	Sistema nervoso central
SNpc	<i>Substancia nigra pars compacta</i>
SOD	Superóxido dismutase
TBS	Solução salina tamponizada com Tris
TBS-T	Solução salina tamponizada com Tris 0,1% de Tween
TH	Tirosina hidroxilase

Folha em branco

Capítulo 1

Introdução

1. Etiologia e Patologia da Doença de Parkinson

O aumento da longevidade em associação com a queda da natalidade abrem portas ao fenómeno global de envelhecimento da população, ao qual se associa a deterioração do estado de saúde e por acréscimo a vulnerabilidade ao aparecimento de determinadas doenças neurodegenerativas, onde o envelhecimento é fator-chave. O stresse oxidativo parece estabelecer um elo de ligação entre o envelhecimento e doenças neurodegenerativas. Existem evidências de que o aumento do stresse oxidativo em associação com apoptose estão no centro da patogénese de distintas doenças neurodegenerativas relacionadas com a idade (1). De entre as teorias que tentam explicar o processo de envelhecimento a mais aceite sugere que alterações associadas a este resultam da acumulação de efeitos das espécies reativas de oxigénio (ERO) ao longo da vida (2,3).

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, enquadrando-se neste grupo de doenças cujo principal fator de risco é a idade (4,5). Foi descrita inicialmente pelo neurologista inglês James Parkinson em 1817 na sua monografia intitulada “An Essay on Shaking Palsy” (6) mas só reconhecida décadas mais tarde quando Jean Martin Charcot a denominou como atualmente é conhecida (7).

Esta doença caracteriza-se pela perda progressiva de neurónios dopaminérgicos (ND) na *substância nigra pars compacta* (SNpc), assim como por presença de inclusões eosinofílicas em consequência de acumulação anormal da proteína α -sinucleína, designadas corpos de Lewy (8). À perda de ND associa-se a perda seletiva de dopamina (DA) no estriado, causando desregulação dos circuitos dos núcleos da base que conduzem ao aparecimento de tremor em repouso, rigidez muscular, bradicinesia e instabilidade postural, sinais cardinais desta doença (9), e que normalmente surgem de forma assimétrica (10). No entanto sintomas não motores podem antecipar os motores, nomeadamente alterações do sono REM e depressão as quais constituem uma importante causa de incapacidade funcional (11).

Em termos epidemiológicos, como referido anteriormente a idade é o maior fator de risco (12), atingindo 1-2% da população com mais de 60 anos e 3-4% da população com mais de 80 anos (7). O género também parece influenciar, sendo vários os estudos que demonstram existir maior incidência nos indivíduos do sexo masculino. Neste contexto os estrogénios têm sido apontados por possuir possíveis efeitos neuroprotetores, no entanto este ainda é um ponto controverso (13). Fatores ambientais estão igualmente associados, hipótese que se

intensificou após identificação de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), subproduto da síntese de heroína, que causa degeneração seletiva dos neurónios dopaminérgicos, principalmente os da via nigroestriatal, por inibição do complexo I da mitocôndria (14). De facto a exposição a poluentes tóxicos, como pesticidas e metais tem sido sugerida como causa de neurotoxicidade dopaminérgica. Fungicidas e inseticidas, entre eles a rotenona, um inibidor do complexo I da cadeia respiratória, têm sido associados à DP (15). Para além dos fatores ambientais também fatores genéticos parecem contribuir para a predisposição para a doença, no entanto os primeiros parecem mais ligados a DP de início tardio e os segundos à DP de início precoce (16). A identificação de distintas formas hereditárias monogénicas da doença despertou o interesse dos estudos genéticos na DP (8). Embora somente 5-10% dos pacientes tenham mutação num dos genes já identificados como causadores de formas autossómicas dominantes ou recessivas, há evidências de que estes mesmos genes possam desempenhar forte papel tanto na forma esporádica da doença quando associados a fatores ambientais (7,8,11).

2. Stresse Oxidativo

Como referido anteriormente o stresse oxidativo tem sido associado a várias doenças neurodegenerativas, incluindo a DP, devido à sua capacidade de alterar a função e estrutura de lípidos celulares, proteínas e ácidos nucleicos, provocando dano oxidativo nestas biomoléculas (1,17,18). Espécies reativas de oxigénio, assim como espécies reativas de azoto (ERA), são produtos do metabolismo celular e podem ter efeitos quer benéficos quer prejudiciais consoante a situação (19). As ERO e ERA são benéficas quando em concentrações baixas a moderadas, tendo aí função sobre inúmeros sistemas de sinalização, na defesa contra agentes infecciosos e na indução de resposta mitogénica (2). No entanto quando produzidas em excesso ocorre desequilíbrio entre defesas antioxidantes e agentes oxidantes que resulta no stresse oxidativo (1,2). Sabe-se que grande percentagem das ERO celulares são produzidas na mitocôndria, ao nível da cadeia transportadora de eletrões ou cadeia respiratória (23). Durante este processo de transporte de eletrões através da cadeia respiratória há eletrões que reagem com o oxigénio, o que leva à formação das chamadas ERO, assim sendo cerca de 1-3% das moléculas de oxigénio são transformadas em espécies reativas (20,22,23) (Fig. 1).

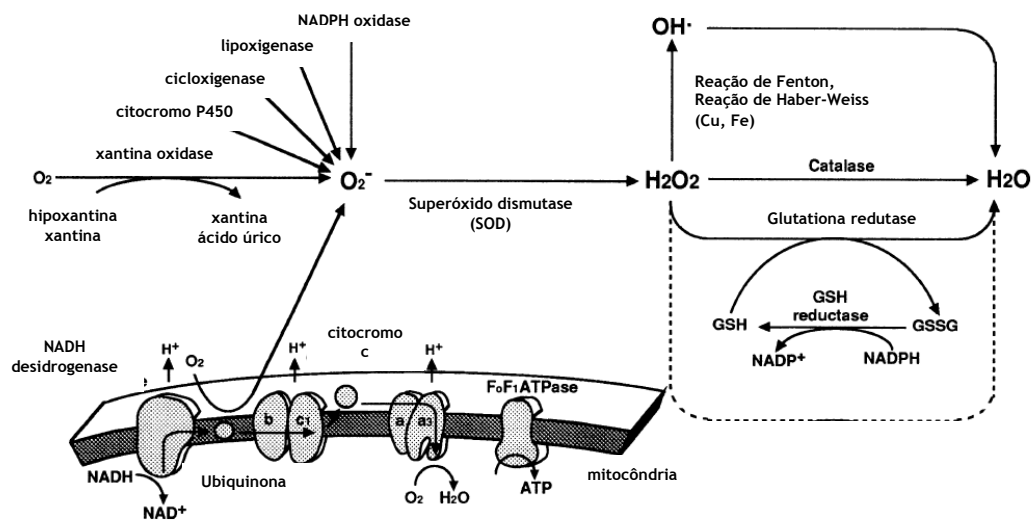


Figura 1. Redução do oxigénio a água, com produção de espécies reativas de oxigénio. O O_2 é reduzido na cadeia transportadora de eletrões presente na membrana interna da mitocôndria e é convertido pela xantina oxidase em radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), podendo este também ser produzido pela citocromo P450, ciclooxigenase, lipoxigenase e NADPH oxidase. Seguidamente ocorre conversão em peróxido de hidrogénio (H_2O_2), pela superóxido dismutase (SOD). Grande parte do H_2O_2 é transformado em água (H_2O) pela glutatona peroxidase e catalase, no entanto parte do H_2O_2 dá origem também ao radical hidróxido (HO^{\cdot}) pela reação de Fenton ou de Haber-Weiss. Adaptado de Valko et al 2004 e Kamata et al 1999 (20,21).

A ERO que se encontra em maiores quantidades e possui um tempo de semivida mais elevado é o H_2O_2 . Sabendo que esta espécie reativa pode originar HO^\bullet , em conjunto com o facto de o H_2O_2 possuir capacidade de atravessar membranas celulares, faz com que este, apesar de ser considerado uma ERO de baixa reatividade, seja considerado um importante mediador do stresse oxidativo (24).

2.1. Principais fontes de stresse oxidativo produzidas pelos ND da SNpc

2.1.1. Metabolismo da Dopamina

Uma das causas de stresse oxidativo na SNpc, prende-se com o metabolismo da dopamina (DA). A síntese de DA ocorre por hidroxilação do aminoácido tirosina em 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA) que requer oxigénio e Fe^{2+} e é catalisada pela enzima tirosina hidroxilase (TH), seguida de descarboxilação de L-DOPA em DA, por ação da enzima descarboxilase dos aminoácidos L aromáticos, existindo libertação de dióxido de carbono (CO_2) (25). Em condições normais a dopamina é captada para as vesículas secretoras por ação do transportador vesicular de monoaminas do tipo 2 (VMAT-2) onde o lúmen ácido das vesículas protege a dopamina da auto-oxidação. Alterações no transporte da dopamina levam à sua acumulação no citoplasma onde o pH mais elevado propicia a sua oxidação que produz ERO. O acúmulo de dopamina desencadeia também a síntese de neuromelanina, um pigmento produzido a partir da oxidação desta amina e que pode constituir uma forma de redução da toxicidade da dopamina. No entanto, a neuromelanina também acumula ferro e perante elevadas concentrações deste metal, este pigmento torna-se indutor de toxicidade (25-30). A dopamina é também oxidada por ação enzimática. A metabolização da dopamina pela monoamina oxidase B (MAO-B) leva à produção de ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA), assim como de O_2 , H_2O_2 e dopamina quinonas (1) (Fig. 2). A produção de H_2O_2 , pela reação de Fenton na presença de elevados níveis de ferro, irá conduzir à produção de $^\bullet OH$, que como já mencionado é altamente reativo (27).

Os ND encontram-se especialmente sujeitos ao stresse oxidativo, pois para além de armazenarem uma molécula propícia à oxidação com geração de ERO possuem também grande quantidade de ferro e baixos níveis de componentes antioxidantes como a glutathiona reduzida (GSH) (4,30).

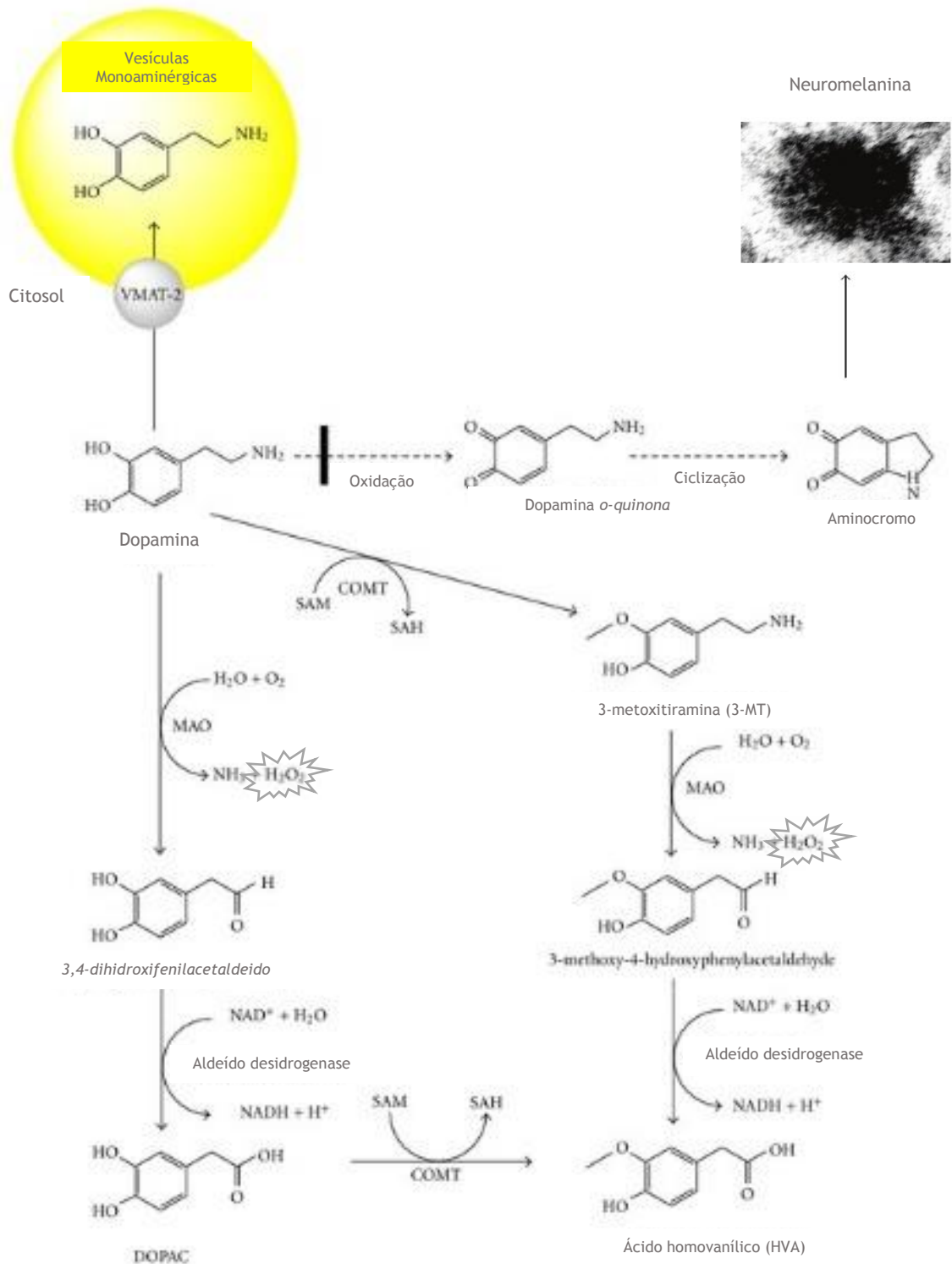


Figura 2. Esquema ilustrativo da degradação da dopamina. Degradação da dopamina que se encontra no citosol com recurso à enzima monoamina oxidase (MAO), ocorrendo produção de ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA) e libertação de H_2O_2 . Transportador vesicular de monoamina 2 (VMAT-2); catecol-O-metiltransferase (COMT); S-adenosilmetionina (SAM). Adaptado de Muñoz et al 2012 (31).

2.1.2. Disfunção Mitocondrial

Uma vez que as mitocôndrias são um dos locais de maior produção de ERO, também acabam por ser um dos primeiros alvos da ação destes. Como já referido anteriormente a cadeia respiratória encontra-se na membrana mitocondrial interna, logo existe grande proximidade entre o local de produção de ERO e a membrana da mitocôndria onde estão presentes lípidos em grande quantidade, existindo por isso maior probabilidade de peroxidação do lípido cardiolipina, que é afetado pelo stresse oxidativo, resultando na libertação de citocromo c para o citosol e no desencadear do processo de apoptose (32-34). Por outro lado a peroxidação lipídica, desencadeia a formação de produtos de oxidação acessórios, uma vez que os lípidos reativos formados vão reagir com proteínas. As proteínas que formam os complexos da cadeia respiratória ou mesmo na ATP sintase podem ser alvo destes produtos de peroxidação, comprometendo em consequência a síntese de ATP (18).

Também a α -sinucleína parece estar relacionada com o stresse oxidativo, uma vez que a oxidação desta a torna mais propensa a agregação. Por outro lado, concentrações elevadas de α -sinucleína podem também ser indutoras de stresse oxidativo (35).

O ADN mitocondrial (ADNmt) também é um dos primeiros alvos do stresse oxidativo, por falta de associação com histonas e pela proximidade com o local de produção de ERO (33). Por conseguinte a acumulação de danos acaba por conduzir a disfunção mitocondrial e posteriormente a morte celular (20). Os neurónios dopaminérgicos da SNpc são particularmente sensíveis às mutações no ADN mitocondrial, facto comprovado por ocorrência de morte neuronal dopaminérgica uma vez atingido um limite crítico de mutação de 60% em moléculas de ADNmt (29). O complexo I da cadeia respiratória parece ser especialmente sensível aos danos provocados no ADNmt, uma vez que sete das suas subunidades são codificadas por este. Os dados existentes sugerem que a atividade do complexo I se apresenta reduzida no SNC de indivíduos com DP, em resultado da lesão oxidativa (30).

Sabendo que o sistema nervoso central (SNC) contém grande número de mitocôndrias altamente ativas, necessitando de cerca de 20% do suprimento energético do organismo, e que possui baixa capacidade de regeneração celular, é fácil compreender a sua enorme vulnerabilidade ao stresse oxidativo (1,17).

2.1.3. Neuroinflamação

A microglia, principais células imunitárias no sistema nervoso central, parece participar de modo significativo na degeneração dopaminérgica, através de neuroinflamação crónica. A ativação microglial acontece como mecanismo de autodefesa perante lesão ou agressão tóxica, removendo detritos celulares e agentes patogénicos, por libertação de mediadores pró-inflamatórios e libertação de fatores tróficos, responsáveis pela manutenção da viabilidade neuronal (1,15,36). A sua capacidade neuroprotetora também é visível pela presença de níveis elevados de glutathione e glutathione peroxidase, que protegem dos níveis elevados de H_2O_2 (36). No entanto a excessiva ativação destas células conduz a processos neuroinflamatórios crónicos em que há libertação excessiva de espécies reativas, nomeadamente óxido nítrico (NO) e O_2^- que contribuem para o stresse oxidativo e acabam por conduzir a neurodegeneração. Uma vez que o mesencéfalo contém 4,5 vezes mais microglia que qualquer outra região e sabendo da sensibilidade dos ND ao estresse oxidativo compreende-se a sua maior vulnerabilidade na SNpc (15,37). No entanto também pode ocorrer aumento da suscetibilidade destes neurónios por diminuição da capacidade antioxidante endógena (38). Um ciclo vicioso é desencadeado, iniciando-se com ativação da microglia, conseqüente neurodegeneração e posterior ativação microglial, agravando a lesão neuronal, uma vez que os neurónios danificados libertam moléculas inflamatórias, nomeadamente neuromelanina, α -sinucleína e uma forma ativa de metaloproteinase-3 (MMP-3), que conduzem a microgliose reativa (15,36). A continuação deste ciclo irá levar mais tarde a degeneração massiva da via nigroestriatal (15). Pode então sugerir-se que a neuroinflamação e suas conseqüências, nomeadamente o stresse oxidativo são críticos na patogénese da DP (36).

Apesar dos dados que apoiam a contribuição de diversos fatores para a vulnerabilidade dos ND da SNpc, nenhum dos fatores isolados explica de modo satisfatório a grande suscetibilidade destas células, a qual poderá resultar da combinação dos vários fatores mencionados em conjunto com outros fatores ainda desconhecidos (30).

2.2. Sistema Antioxidante

Os antioxidantes, endógenos e exógenos, são responsáveis pela inibição de formação de ERO, eliminação das mesmas, ligação a iões metálicos necessários à catálise de formação de espécies reativas e aumento da regulação de defesas antioxidantes endógenas (26), estando envolvidos quer na prevenção, quer na reparação de danos causados pelos agentes oxidantes (1). Os antioxidantes possuem importante função tanto em processos fisiológicos normais, nomeadamente no envelhecimento, como na prevenção de doenças crónicas degenerativas

por controlo de espécies oxidantes (3). No entanto, a sua capacidade protetora depende do tipo, do local de produção e da severidade das ERO (26). O sistema antioxidante pode ser classificado em enzimático e não enzimático. Catalase e glutathione peroxidase, principais responsáveis pela remoção do H_2O_2 , além do superóxido dismutase (SOD) e aldeído desidrogenase assim como algumas enzimas de suporte, constituem os antioxidantes enzimáticos (4,39). Já o sistema não enzimático é composto por antioxidantes de ação indireta, como é o caso de agentes quelantes, e antioxidantes de ação direta nos quais se incluem ácido ascórbico (vitamina C), lipóico, retinóico (vitamina A) e úrico, tocoferóis (vitamina E), carotenóides e polifenóis derivados da dieta, com grande importância na defesa contra o stresse oxidativo (26,39). A vitamina E, pelo facto de ser lipossolúvel tem a capacidade de prevenir eficazmente a peroxidação lipídica provocada pelo excesso de ERO (39). Este sistema ao contrário do enzimático é constituído por grande quantidade de compostos com fontes quer endógenas quer exógenas, apesar de apenas pequeno número ser sintetizado pela própria célula, nomeadamente a glutathione e o nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reduzida (NADPH) (26). A marcada diminuição de glutathione detetada em doentes de Parkinson, é uma das primeiras alterações registada, tendo já sido demonstrado que essa diminuição em neurónios dopaminérgicos é consequência de redução da atividade do complexo I mitocondrial (2).

2. Proteína DJ-1

O gene da DJ-1 foi inicialmente identificado como um novo produto oncogénico e mais tarde reconhecido como gene mutante localizado no cromossoma 1p36.23, no locus PARK7. Este gene codifica a forma monomérica da proteína constituída por 189 aminoácidos e com ~20kDa. A DJ-1 tem uma estrutura *flavodoxin fold*, formado por 6 folhas- β paralelas centrais rodeadas por duas camadas de α -hélices (Fig. 3). *In vitro*, forma homodímeros. Esta proteína pertence à superfamília de proteínas ThiJ/Pfpl/DJ-1 e é ubiquamente expressa e altamente conservada em diversas espécies (40-47). A função da ThiJ está relacionada com a biosíntese de tiamina e a Pfpl é uma protease intracelular, presente na maioria das bactérias e archaea (48). Apesar das suas semelhanças estruturais, a DJ-1 diferencia-se por possuir uma tríade catalítica (glutamato 18, cisteína 106 e histidina 126) distorcida, quando comparada com as proteases bacterianas que seria essencial na atividade proteolítica e pelo facto do seu local ativo estar ocluído por uma hélice C-terminal, tendo já sido demonstrada existência de atividade proteolítica quando esta hélice é removida (46,49).

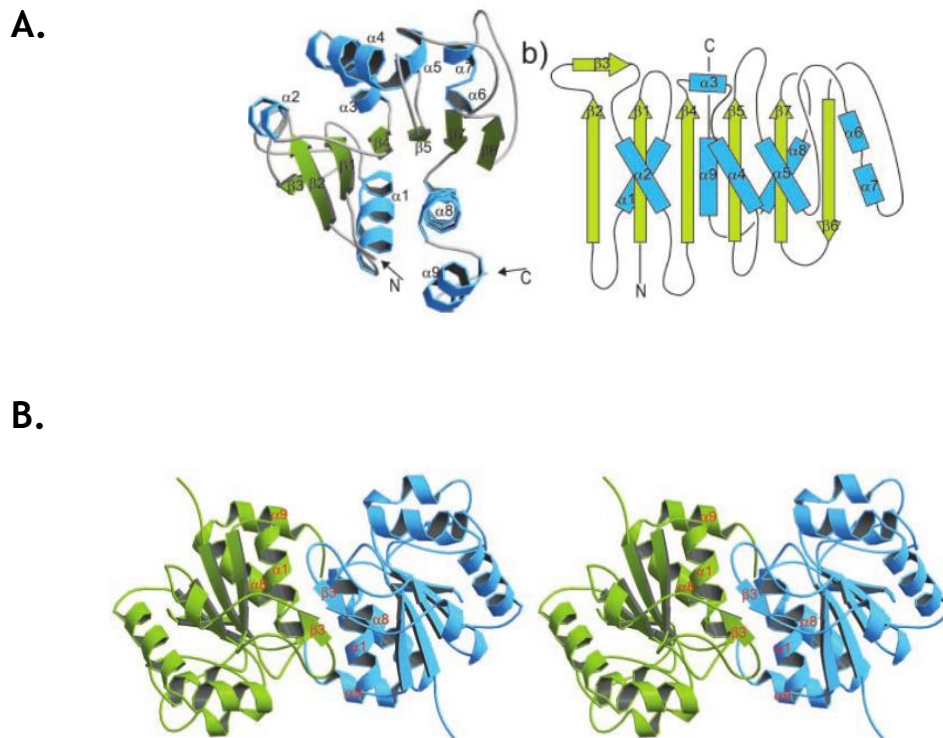


Figura 3. Estrutura monomérica e dimérica da DJ-1. (A) Ilustração representativa do monómero de DJ-1, em que elementos da estrutura secundária a azul dizem respeito a hélices- α e a verde a folhas- β . As setas indicam as posições do C-terminal (C) e N-terminal (N). (B) Ilustração representativa do dímero de DJ-1, em que é possível observar a verde um dos monómeros e a azul o outro. Adaptado de Honbou et al 2003 (50).

2.1. Função Neuroprotetora

Esta é uma proteína que possui múltiplas funções (50,51), como modulador antioxidante sensível ao stresse oxidativo (52), como regulador de vias de mecanismos anti-apoptóticos, como regulador transcricional (53) ou na homeostase mitocondrial (46).

A resposta antioxidante está associada à oxidação de DJ-1, mais especificamente no resíduo de cisteína 106. No entanto, a oxidação excessiva pode conduzir a perda da função da DJ-1 (54).

No processo de oxidação há mudança do ponto isoelétrico (pI) da DJ-1 de 6,2 para 5,8, tornando-se assim mais acídica (visto que a DJ-1 possui várias isoformas com diferentes pontos isoelétricos) o que sugere adsorção das ERO (28,44,50,52). A DJ-1 contém três resíduos de cisteína, C46, C56 e C106, sendo que o resíduo C106 se destaca por ser particularmente sensível à oxidação, havendo dados que sugerem ser este o resíduo chave na ativação oxidativa da proteína (46,49,55). De facto a mutação da DJ-1 na C106 resulta em perda de função da proteína (55). A oxidação do grupo sulfidrílo desta cisteína dá origem a ácido

sulfénico (C-SOH), posteriormente ao ácido sulfínico (C-SO₂H), a partir do qual a oxidação se torna irreversível, e por fim ao ácido sulfônico (C-SO₃H), que se pensa corresponder à forma inativa da proteína (55,56). O ácido sulfínico (C-SO₂H) é considerado o responsável pelas mudanças de pI das proteínas responsivas a H₂O₂. Por outro lado a mutação de cisteína 53 para alanina anula a variação de pI, confirmando que esta é responsável pelo dano oxidativo. Outra modificação a que a DJ-1 é sujeita em condições oxidantes é a sumoilação da lisina 130 (K130) necessária para a sua atividade, que parece ocorrer em excesso em algumas formas mutadas da DJ-1. O aumento das ERO altera ainda a cisteína 46 e cisteína 53 (Fig. 4), alterando a dimerização da DJ-1 e logo a função da proteína. A oxidação da cisteína 53 a em C-SO₂H destabiliza tanto o dímero, como a hélice presente na região C-terminal da DJ-1. Como referido anteriormente esta oxidação ativa a atividade proteolítica (50,55).

Os dados disponíveis mostram que a DJ-1 funciona como um sensor do stresse oxidativo e ganhar atividade proteolítica que auxilia a digestão das proteínas danificadas por este (50).

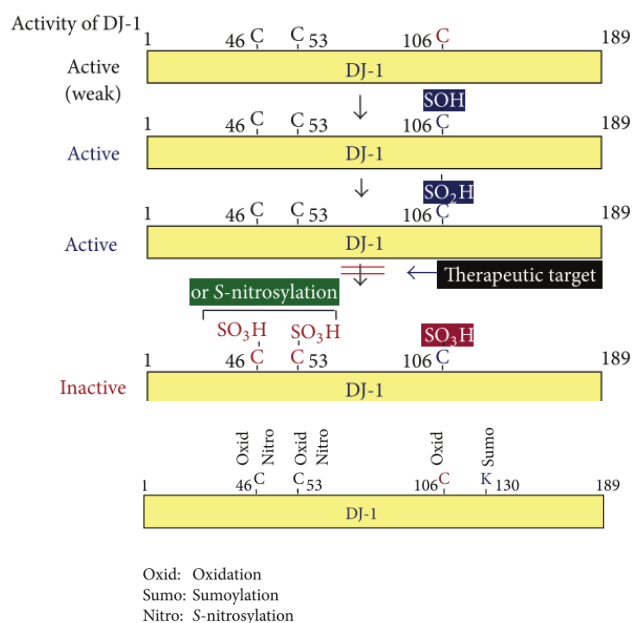


Figura 4. Oxidação das cisteínas e consequente ativação proteolítica de DJ-1. Na imagem esquemática é possível observar os três resíduos de cisteína localizados nos aminoácidos número 46, 53 e 106, representadas por C46, C53 e C106. É verificada oxidação sequencial do resíduo C106, até C-SO₃H, correspondendo à forma inativa da proteína e S-nitrosilação em conjunto com oxidação nos resíduos C46 e C53, assim como sumoilação em K130. Adaptado de Ariga et al 2013 (55).

Parece existir correlação entre a localização celular de DJ-1 e a sua função protetora. A translocação da DJ-1 para a mitocôndria parece ser facilitada oxidação da cisteína 106 (57). Também a translocação para o núcleo está relacionada com o stresse oxidativo, comprovado pelo seu aumento no núcleo na presença de diversos fatores de stresse oxidativo (58). A nível

temporal a translocação da DJ-1 para a mitocôndria parece acontecer em primeiro lugar, sendo a principal responsável pela proteção contra o stresse oxidativo numa fase inicial e posteriormente ocorrer translocação para o núcleo (57).

2.1.1. A DJ-1 na homeostasia mitocondrial

Sabendo que a disfunção mitocondrial é uma fonte de stresse oxidativo nos ND da SN e visto que estes se tornam extremamente sensíveis a esta disfunção (59), qualquer função exercida pela DJ-1 que impeça a ocorrência deste acontecimento é relevante para a sobrevivência dopaminérgica.

Como referido anteriormente, o complexo I da cadeia respiratória é especialmente sensível aos danos provocados no ADNmt. Por sua vez, danos neste complexo fazem com que eletrões sejam libertados da cadeia respiratória conduzindo a formação de ERO. Existindo dados de mostram que os DP possuem mitocôndrias com atividade do complexo I reduzida (30). A DJ-1 mitocondrial parece no entanto ajudar a regular a atividade deste complexo (60).

A DJ-1 encontra-se distribuída entre o núcleo e citoplasma, mas predominando neste último. No entanto, perante estímulo oxidativo ocorre translocação para a mitocôndria, sendo para isso necessário ocorrer oxidação da C106 e presença de uma sequência de direcionamento mitocondrial. Logo mutações no gene da DJ-1, também vão interferir com a redistribuição específica da proteína. Uma vez que a mitocôndria está na origem da produção de grandes quantidades de ERO, a translocação preferencial da proteína pode ter como função reduzir a produção de espécies reativas ou atuar na prevenção da lesão mitocondrial (44,57,61).

2.1.2. A DJ-1 na regulação da transcrição

Existem evidências de que a DJ-1 exerce efeitos contra o stresse oxidativo por ligação a vários fatores transcricionais, incluindo o recetor androgénico, a p53, o fator de polipirimidina de ligação ao trato associado à proteína de *splicing* (PSF) e a keap1, modulando a expressão génica (58,62).

A DJ-1 é considerada indispensável na estabilização de um regulador chave da resposta ao estresse oxidativo, denominado Nrf2 (fator relacionado com o fator nuclear eritroide 2). Em condições basais, no citoplasma ocorre ligação entre este fator e a proteína inibidora keap1, promovendo a degradação de Nrf2, por outro lado perante condições oxidantes a DJ-1 atua impedindo a associação entre estes dois elementos o que permite a libertação de Nrf2 que é translocado para o núcleo (53). Já no núcleo Nrf2 em conjunto com pequenas proteínas Maf,

ligam-se ao elemento de resposta antioxidante que é uma sequência chave para ativação da transcrição de genes que codificam enzimas antioxidantes e de destoxificação (29,43).

A DJ-1 também atua como co-ativador transcrricional interagindo com proteínas nucleares de modo a proteger contra a apoptose (29). A DJ-1 parece ter função específica na proteção dos neurónios dopaminérgicos, contra a toxicidade induzida pela dopamina, visto que a transcrição do gene TH humano, parece ser regulado positivamente pela DJ-1, por sequestro de PSF, repressor transcrricional. No entanto, a elevada oxidação de DJ-1 induz a perda desta atividade (Fig. 5) (55).

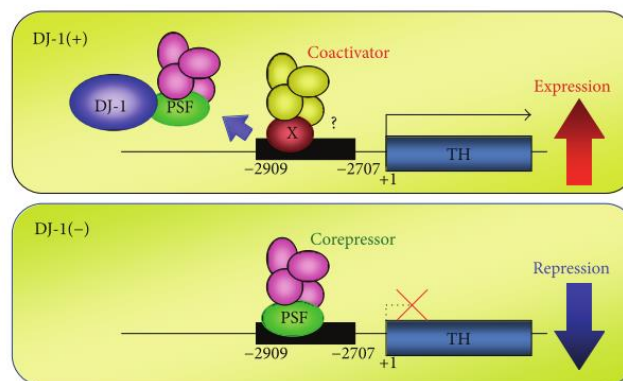


Figura 5. Esquema ilustrativo de ativação do gene que codifica a enzima tirosina hidroxilase (TH), com recurso a DJ-1. O gene TH, que codifica a enzima chave da síntese de dopamina, pode ser regulado positivamente pela DJ-1, deste modo quando a DJ-1 não está presente, o PSF repressor transcrricional, liga-se à região promotora do gene TH, reprimindo a expressão deste. Já pelo contrário quando na presença de DJ-1 esta vai ligar-se a PSF, impedindo a ligação do mesmo à região promotora do gene TH, ocorrendo aumento da expressão deste, por substituição por um complexo co-ativador. Adaptado de Ariga et al 2013 (55).

2.1.3. A DJ-1 em vias de mecanismos contra o estresse oxidativo

A DJ-1 possui também a capacidade de prevenir a morte e promover o crescimento celular por ativação de vias de sinalização contra o stress oxidativo (55).

A enzima fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) provoca ativação da cascata de sinalização intracelular de Akt e de sinais extra e intracelulares neuroprotetores após estímulo oxidativo. Akt é uma proteína cinase específica de serina/treonina, que na forma ativa para além de controlar o crescimento e proliferação celular, sinaliza a sobrevivência protegendo as células de fenómenos apoptóticos. A DJ-1 estimula a sobrevivência celular por inibição da atividade de PTEN (proteína fosfatase homóloga da tensina), potente inibidor desta via de sinalização. Estudos vieram demonstrar que a exposição a condições oxidantes ativa a Akt (55,63).

Deste modo verifica-se que a DJ-1 exerce função neuroprotetora através de diversos mecanismos, sendo eficaz no combate ao stresse oxidativo, existindo já várias evidências deste seu papel a nível intracelular. Contudo também se encontra descrita a sua presença em soro de pacientes com cancro da mama, melanoma, polineuropatia amiloidótica familiar e acidente vascular cerebral, assim como em tecidos e meio de várias culturas celulares, indicando secreção da mesma (51,55,64). No entanto ainda existem poucos dados relativamente ao papel desta proteína a nível extracelular.

Capítulo 2

Objetivos

O presente estudo teve como objetivo geral analisar o papel neuroprotetor da DJ-1 em culturas primárias do mesencéfalo ventral expostas a condições oxidantes. Os objetivos específicos foram:

1. Determinar a influência da presença dos astrócitos na proteção neuronal exercida pela DJ-1;
2. Analisar a secreção de DJ-1 por neurónios e astrócitos em condições oxidantes;
3. Avaliar a capacidade de astrócitos e neurónios incorporarem a DJ-1 extracelular.

Capítulo 3

Métodos

1. Animais

Todos os animais utilizados na preparação das culturas celulares foram tratados de acordo com os requisitos éticos de pesquisa animal e com a Convenção Europeia para a Proteção dos Animais Vertebrados Utilizados para Fins Experimentais ou Outros Fins Científicos (Diretiva 2010/63/EU).

2. Culturas Primárias de Mesencéfalo

2.1. Recolha dos Embriões

Para este procedimento foram usadas fêmeas Wistar com 15 ou 16 dias de gestação. Após anestesia com isoflurano foi efetuado um corte na região abdominal, os embriões foram removidos e a fêmea sacrificada por deslocamento cervical. Os sacos uterinos recolhidos foram colocados em tampão fosfato salino (PBS: 1400mM de NaCl, 81mM de Na₂HPO₄, 27mM de KCl e 15mM de KH₂PO₄, pH 7.4). Já em câmara de fluxo laminar foram removidas as membranas amnióticas envolventes, permitindo a exposição dos embriões.

2.2. Preparação da Suspensão Celular

A região correspondente ao mesencéfalo ventral foi dissecada com a ajuda de uma lupa e colocada em PBS frio até finalizar desta etapa.

Em ambiente estéril o tecido resultante da dissecação foi colocado em PBS frio e dissociado mecanicamente. Este passo foi efetuado por pipetagem sequencial e repetitiva, utilizando duas pipetas (10 e 5ml), e uma micropeta (1000µl), até obter uma suspensão celular homogénea. De seguida foi realizada uma centrifugação de 3 min a 1500rpm (3K18C Bioblock Scientific; Sigma Laboratory Centrifuges). Após centrifugação o sedimento resultante foi

ressuspenso em 10ml de Meio Neurobasal (MNB; Gibco, Paisley, Scotland, UK) suplementado com 2% de B27 (cat. 17504-044; Invitrogen), 05mM de L-Glutamina (cat. G3126; Sigma-Aldrich), 25µM ácido L-Glutâmico (cat. G8415; Sigma-Aldrich) e 120µg/ml de gentamicina (cat. G1272; Sigma-Aldrich). A contagem das células viáveis foi efetuada numa câmara de Neubauer utilizando o teste de exclusão pelo azul de tripano (65).

2.3. Cultura de Neurónios e Co-cultura de Neurónios e Astrócitos

Após contagem as células foram plaqueadas de acordo com o ensaio a que se destinavam. As células a usar em ensaios de imunocitoquímica foram cultivadas a uma densidade de $0,4 \times 10^6$ células/poço em placas de cultura de 24 poços (BD Biosciences, San Jose, California, USA) com lamelas de 13mm de diâmetro devidamente revestidas com 10 mg/ml de poli-D-lisina (PDL; cat. P1024; Sigma-Aldrich). Para este revestimento a solução de poli-D-lisina foi mantida em contacto com as lamelas durante a noite a 37°C e no final deste período o excesso de PDL foi removido e foram feitas três lavagens com H₂O MQ. As células a usar em ensaios de western blot foram cultivadas a uma densidade de $1,2 \times 10^6$ células/poço em placas de 6 poços também previamente revestidas com poli-D-lisina. Para obtenção de co-culturas de neurónios e astrócitos foi adicionado ao meio de cultura 10% de FBS (Biochrom AG) previamente inativado pelo calor. As culturas foram mantidas a 37°C, numa atmosfera com 5% de CO₂ durante 5 dias. Ao terceiro dia em cultura o meio foi substituído por meio de aminoácidos não essenciais (MANE), constituído por Meio Mínimo Essencial de Eagle (MEM; Sigma, M0268) ao qual foi adicionado 2,2g/L de bicarbonato de sódio (cat. s/4240/60; Fisher,) e suplementado com 1g/L de Glucose (cat. G/0500/60 Fisher Chemical), 0,29g/L de L-Glutamina (cat. G3126; Sigma-Aldrich), 0,11g/L de Piruvato de Sódio (cat. P-2256; Sigma-Aldrich) e 1% de aminoácidos não essenciais (cat. M7145, Sigma-Aldrich). Passo já não efetuado no ensaio de DJ-1 aplicada exogenamente.

3. Imunodepleção de DJ-1

Para avaliar o efeito da imunodepleção de DJ-1 na sobrevivência neuronal dopaminérgica em culturas de neurónios e co-cultura de neurónios e astrócitos, na presença e ausência de estímulo oxidativo, efetuou-se o seguinte procedimento.

Ao quinto dia de cultura, e 10 horas antes da adição do estímulo com H₂O₂, o meio de cultura foi substituído por meio sem FBS (600 µl/poço em placa de 24 poços). Quatro horas depois

foram adicionados os respectivos anticorpos anti DJ-1 (cat. sc-55572; Santa Cruz Biotechnology) e anti Ig-M (cat. A0425; DakoCytomation) a uma concentração de 0,5 µg/ml. O anticorpo contra Ig-M foi adicionado como controlo, com objetivo de perceber se a adição de um qualquer anticorpo que não interage com as células em uso por isso só interfere com a viabilidade dopaminérgica da cultura celular, tanto numa situação controlo como após exposição a H₂O₂. Seis horas mais tarde foi efetuada estimulação com 25µM de H₂O₂ (cat. H-1009; Sigma-Aldrich). Após 24h foi removido o meio, foi feita uma lavagem e as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (PFA) durante 10 min. As lamelas foram mantidas a 4°C em PBS até início da técnica de imunocitoquímica. O procedimento experimental efetuado encontra-se esquematizado na figura 6.



Figura 6. Representação esquemática do procedimento usado nos ensaios de imunodepleção de DJ-1 e estimulação celular com H₂O₂. Procedimento experimental efetuado em culturas de neurónios e co-cultura de neurónios e astrócitos de modo a avaliar o efeito da imunodepleção de DJ-1 na sobrevivência dopaminérgica na presença e ausência de estímulo oxidativo.

4. Análise da DJ-1 secretada para o meio

A fim de esclarecer se a exposição a um estímulo oxidativo em culturas de neurónios e co-cultura de neurónios e astrócitos influencia a secreção de DJ-1 para o meio de cultura, realizou-se o ensaio descrito na secção seguinte.

4.1. Preparação das Amostras

Ao quinto dia de cultura e após efetuadas 5 lavagens com PBS a 37°C o meio foi substituído por meio sem FBS (2000µl/poço em placa de 6 poços) (51). Cerca de 8h depois as células foram expostas a H₂O₂ 25µM sendo então incubadas por mais 24h com este agente a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. O período temporal de cada procedimento encontra-se esquematizado na figura 7.



Figura 7. Representação esquemática do procedimento experimental usado na estimulação celular para análise da secreção de DJ-1. Procedimento efetuado em culturas neurónios e co-culturas de neurónios e astrócitos expostas a H_2O_2 , com objetivo de avaliar a secreção de DJ-1 para o meio de cultura perante condições basais e após estimulação.

No fim do respetivo período de estimulação foi feita recolha dos meios e posterior centrifugação durante 3 min, 3000g, a 4°C (Beckman Coulter TM Allegra TM X-22R Centrifuge), com objetivo de remover as células e os restos celulares (51). Os meios foram concentrados usando tubos de fracionamento molecular (Sartorius vivaspin20), durante cerca de 50min a 1800g, a 4°C e armazenados de seguida a -80°C. Após efetuada liofilização (Scanvac CoolSafeTM, Frilabo) procedeu-se à diluição das amostras com 56µl do respetivo tampão (25mM Tris, 2,5mM EDTA, 2,5mM EGTA, 1% Triton X-100, 1mM DTT, 1mM fluoreto de fenilmetilsulfonilo e 25µg/ml leupeptina) ao qual foi adicionado 14µl de solução desnaturante (6,5mM de Tris-HCl (pH6.8), 2% de SDS, 10% de glicerol e 140mM de β-mercaptoetanol). Todas as soluções foram mantidas em gelo durante o procedimento.

4.2. Dot Blot

Com objetivo de identificar a presença da DJ-1 no meio foi realizado dot blot das amostras anteriormente preparadas, para isso 20µl de amostra foram aplicados diretamente em membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF, GE Healthcare, Amersham Hybond, UK), à qual também foi adicionada um controlo positivo e um negativo. O controlo positivo foi preparado por diluição de 6-His-DJ-1 (concentração inicial de 2,012 mg/ml) (cedido pelo Doutor Bruno Manadas, Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra, Portugal) em tampão de amostra e solução desnaturante, a uma concentração de 0,02012 mg/ml. Como controlo negativo foi adicionado somente o tampão com solução desnaturante. No dia seguinte a membrana foi ativada em metanol 100%, sendo de seguida

imersa em TBS-T (0,1 % Tween, 20mM de Tris, 137mM de NaCl e 0,38% HCl 1M) por duas vezes. Após ativação e a fim de evitar ligações inespecíficas do anticorpo foi feito bloqueio durante 1h à temperatura ambiente com 5% de leite em pó (Paturages, França) diluído em TBS-T. De seguida a membrana foi passada por TBS-T e com esta solução foram efetuadas 3 lavagens de 15 minutos. O passo seguinte consistiu na incubação com o anticorpo primário de anti-DJ-1 (diluição 1:1000; cat. sc-55572; Santa Cruz Biotechnology) diluído em TBS-T, a 4°C durante a noite, seguida de 1h a temperatura ambiente. Finalizada a incubação com o anticorpo primário foram efetuadas 3 lavagens de 15 minutos, sob agitação constante. Procedeu-se à incubação com anticorpo secundário dirigido contra as imunoglobulinas de rato e conjugado com peroxidase de rábano (HRP) (diluição 1:20000; Santa Cruz Biotechnology; sc-2004). Com objetivo de remover o anticorpo que não ligou foram realizadas de novo lavagens com TBS-T e finalmente a membrana foi exposta ao substrato Luminata™ Classico Western HRP durante 5 minutos. O sinal gerado foi detetado utilizando o sistema de imagem BioRad Chemidoc™ MP.

4.3. Western Blot

A fim de consolidar os resultados obtidos com o dot blot foi efetuado western blot das mesmas amostras, guardadas a -80°C. Foi adicionado 0,01% de azul de bromofenol às amostras (marcador de corrida) e de seguida foram aplicados 20µl de cada amostra no gel de electroforese que consistiu num gel de concentração com 4% de acrilamida em Tris-HCl 0,5M, dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%, H₂O, 0,05% de persulfato de amónia (PSA) 10% e 0,1% de tetrametiletilenodiamina (TEMED) e um gel de resolução com 14% de acrilamida em Tris-HCl 1,5M, SDS 10%, 0,05% de PSA 10%, H₂O e 0,05% de TEMED. Para a electroforese foi usada uma voltagem de 100V, durante aproximadamente 2h à temperatura ambiente (sistema BIO-RAD PowerPac HC) e o um tampão com 25mM Tris, 192mM glicina, 0,1% SDS. Entretanto procedeu-se à ativação da membrana de PVDF, por imersão em metanol 100%, sendo esta de seguida colocada em agitação por 5min em água e depois em tampão de electrotransferência, constituído por CAPS 10mM em metanol 10%. Após o fim da electroforese, o gel de concentração foi retirado e o de resolução foi colocado em tampão de electrotransferência. Para montagem da sanduíche todos os elementos constituintes da mesma foram passados por tampão, no meio desta e entre papéis de filtro previamente humedecidos foi colocado o gel e a membrana. A electrotransferência foi realizada a 750mA, em gelo, e durante cerca de 1h (sistema BIO-RAD PowerPac HC). Os passos seguintes de bloqueio, incubação com o anticorpo

primário, secundário e revelação foram efetuados do mesmo modo que o descrito no procedimento de dot blot.

5. Análise da incorporação de DJ-1 exógena

Tendo como objetivo perceber se a DJ-1 extracelular pode ser captada por neurónios e/ou astrócitos foi efetuada marcação de DJ-1 exógena com uma molécula fluorescente e posteriormente foi exposta a co-culturas de neurónios e astrócitos.

5.1. Marcação de DJ-1

De modo a marcar a proteína DJ-1 foi utilizado um kit comercial de marcação de proteína em microescala Alexa Fluor 488 (cat. A30006; Alexa Fluor 488 Microscale Protein Labeling Kit; Molecular Probes™ invitrogen detection technologies) e a marcação foi realizada de acordo com o protocolo do fornecedor. Deste modo a 41µl de 6-His-DJ-1 a uma concentração de 1mg/ml (diluído em PBS, a partir de uma concentração inicial de 2,012 mg/ml), foi adicionado 4,1µl de bicarbonato de sódio (a uma concentração de 1M) e imediatamente após preparação da solução Alexa Fluor 488 (a uma concentração de 11,3 nmol/µl) 2,99µl desta foram diluídos na preparação anterior.

Após finalizado o tempo de incubação (15 min) e visando separar a proteína marcada do corante que não reagiu, a mistura anteriormente preparada foi aplicada sobre uma resina de purificação e centrifugada a 16000g durante 15s. O conjugado foi guardado a 4°C, protegido da luz.

5.2. Aplicação do conjugado Alexa 488-DJ-1

Após cinco dias em cultura o meio foi substituído por meio sem FBS, ao qual foram adicionados 3,37µl/poço de conjugado Alexa488-DJ-1, a uma concentração de 3µM e de seguida colocados no minispin (MiniSpin plus; Eppendorf) a 14000rpm, por cerca de 1min, com

objetivo de remover possíveis agregados de sonda. Apesar de durante a marcação de DJ-1 ser efetuado um passo de purificação, como descrito anteriormente, foi efetuada aplicação de Alexa 488 a uma concentração semelhante à presente no conjugado, de modo a verificar se de facto a fluorescência observada através de Alexa 488 corresponde a ligação específica a DJ-1, para tal foi realizado o mesmo procedimento que efetuado na aplicação de Alexa 488-DJ-1. Após 1h de incubação efetuou-se fixação da cultura com paraformaldeído 4% (PFA) durante 10 min. As lamelas foram mantidas a 4°C em PBS até ao início da imunocitoquímica.

6. Imunocitoquímica

Após a remoção do PBS em que as lamelas são armazenadas procedeu-se à permeabilização da membrana plasmática com 1% de Triton X-100 em PBS, durante 10min. De seguida, com objetivo de minimizar a ligação inespecífica dos anticorpos procedeu-se a uma incubação com uma solução de bloqueio constituída por PBS contendo 0,1% de Tween (PBS-T) e 20% de FBS durante 1h, a temperatura ambiente. Entre este último passo e a incubação com o respetivo anticorpo primário foi realizada uma lavagem com PBS-T. Os anticorpos primários (Tabela 1) foram diluídos em PBS-T com 1% de FBS (solução de diluição de anticorpos) e incubados durante a noite (duas noites no caso da marcação de DJ-1), a 4°C. No dia seguinte, foram efetuadas 6 lavagens com PBS-T e foram adicionados os respetivos anticorpos secundários (Tabela 2) também diluídos na solução de PBS-T com 1% de FBS, os quais foram incubados durante 1h a temperatura ambiente. Após esta incubação foram realizadas novamente 6 lavagens com PBS-T e no final foi feita uma incubação com Hoescht 2 μ M (Invitrogen) diluído em PBS-T durante 10min. Por fim, e após as células serem lavadas novamente com PBS-T efetuou-se montagem das lamelas em lâminas, utilizando o meio de montagem DAKO (Glostrup, Denmark) e foi feita a selagem das mesmas com verniz. As lâminas foram guardadas ao abrigo da luz, a 4°C, até aquisição das imagens no microscópico de fluorescência (Axiobserver Z1, Zeiss).

Tabela 1. Descrição dos anticorpos utilizados na técnica de imunocitoquímica. Tirosina hidroxilase (TH); Proteína associada a microtúbulos do tipo 2 (MAP2); Proteína glial fibrilar ácida (GFAP)

Proteína	Anticorpo Primário	Diluição	Fornecedor	Anticorpo Secundário	Diluição	Fornecedor
TH	Monoclonal murganho Anti-TH	1:1000	BD Biosciences 612300	Ig de cabra contra Ig de murganho e conjugadas a Alexa 546	1:1000	Invitrogen Molecular Probes
DJ-1	Monoclonal murganho Anti-DJ-1	1:200	Santa Cruz Sc-55572			
MAP2	Policlonal Coelho Anti-MAP2	1:500	Santa Cruz sc-20172	Ig de cabra contra Ig de coelho e conjugadas a Alexa 546	1:1000	Invitrogen Molecular Probes
GFAP	Policlonal Coelho Anti-GFAP	1:2000	DAKO Z0334			

7. Análise Estatística

Os dados relativos à secção da imunodepleção de DJ-1 encontram-se expressos em percentagem do controlo e representam a média \pm SEM de pelo menos três experiências independentes, efetuadas em triplicado. Já os níveis de proteína observados na experiência de secreção de DJ-1 foram analisados por densitometria utilizando o programa ImageJ e os resultados da densidade ótica encontram-se expressos em percentagem controlo, representando a média \pm SEM de duas, três ou quatro experiências independentes, consoante referido na respetiva legenda. A análise estatística, na primeira situação foi realizada utilizando o teste ANOVA de 1 via seguido pelo teste de Bonferroni e no segundo caso o teste estatístico usado foi o teste t de student. Valores $<0,05$ foram considerados significativos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5 demo (GraphPad Software, Inc).

Capítulo 4

Resultados

1. Participação da DJ-1 extracelular na sobrevivência dopaminérgica em condições controlo e de stresse oxidativo

Sabe-se que tanto neurónios como astrócitos expressam DJ-1 (66). Apesar de ser conhecida a localização da proteína, no citoplasma e núcleo celular, foi descrito que esta também pode ser secretada, tendo já sido reportada a sua presença em soro de pacientes com cancro da mama, melanoma, polineuropatia amiloidótica familiar e acidente vascular cerebral (64). Foi também detetada a presença de DJ-1 em LCR e soro de indivíduos com forma esporádica da doença de Parkinson (64,67). Dados *in vitro*, também comprovam a secreção da proteína tendo sido encontrada em meios de várias culturas celulares (51). Secreção essa que no caso dos astrócitos em concreto parece poder contribuir para a neuroprotecção, uma vez que foi verificada libertação de DJ-1 após estímulo oxidativo com H_2O_2 (52). Deste modo a proteína parece ter a capacidade de não realizar somente protecção intracelular, mas também extracelular através de sinais parácrinos e autócrinos, resultantes em neuroprotecção (68).

O objetivo desta parte do trabalho foi o de tentar esclarecer se a DJ-1 extracelular secretada por neurónios e astrócitos contribuiu para a neuroprotecção dopaminérgica, não só em condições de stress oxidativo como também numa situação basal. Com este objetivo foram utilizadas culturas de neurónios e co-culturas de neurónios e astrócitos em condições basais e submetidas a estímulo oxidativo com $25\mu M$ de H_2O_2 durante 24h, e nas quais se procedeu à imunodepleção de DJ-1. Como controlo foi adicionado um anticorpo que reage contra IgM de murganho, que não deverá interagir com as células em uso. Para avaliar a lesão dopaminérgica foi realizada uma imunocitoquímica contra o marcador dos neurónios dopaminérgicos tirosina hidroxilase (TH) (Fig. 8).

Os resultados obtidos mostram que a exposição a H_2O_2 ($25\mu M$) reduziu o número de neurónios dopaminérgicos em 39,2% em relação à situação controlo. O bloqueio da DJ-1 extracelular acentuou a lesão dopaminérgica induzida pelo H_2O_2 observando-se nesta situação uma redução de 57% dos neurónios TH⁺ presente quando comparada com a situação controlo. Para além de acentuar a lesão promovida pelo stresse oxidativo a remoção da DJ-1 parece reduzir

também a viabilidade dopaminérgica observada numa situação basal, tendo-se registado nesta situação uma redução de 27,3% no número de neurónios dopaminérgicos relativamente a uma situação controlo. No entanto esta diminuição não foi estatisticamente significativa. A diminuição da viabilidade dopaminérgica na presença do anticorpo contra a DJ-1 parece resultar da depleção da DJ-1 e não de um efeito inespecífico causado pela presença do anticorpo uma vez que a adição de um anticorpo anti-IgM não afetou a viabilidade dopaminérgica da cultura neuronal, quer numa situação controlo como aquando da estimulação com H_2O_2 (Fig. 8).

A aplicação do mesmo procedimento na presença de astrócitos (co-cultura neurónios e astrócitos) resultou em resultados semelhantes aos anteriormente descritos para a cultura de neurónios. No entanto observou-se um efeito mais acentuado da depleção da DJ-1 no caso da co-cultura neurónios-astrócitos. O bloqueio da DJ-1 extracelular só por si reduziu a viabilidade dopaminérgica para cerca de 49% do controlo. Por sua vez o bloqueio feito em presença de H_2O_2 levou a uma redução de 64% no número de neurónios dopaminérgicos, comparativamente com o controlo (Fig. 8).

A comparação dos resultados obtidos com as culturas de neurónios e das co-culturas neurónios/astrócitos mostrou que a extensão da lesão dopaminérgica induzida pelo estímulo oxidativo foi semelhante nos dois tipos de culturas, que a DJ-1 secretada por neurónios e/ou astrócitos protege os neurónios dopaminérgicos tanto em condições basais como em condições de stresse oxidativo e ainda que este efeito protetor da DJ-1 foi mais acentuado quando em presença de astrócitos.

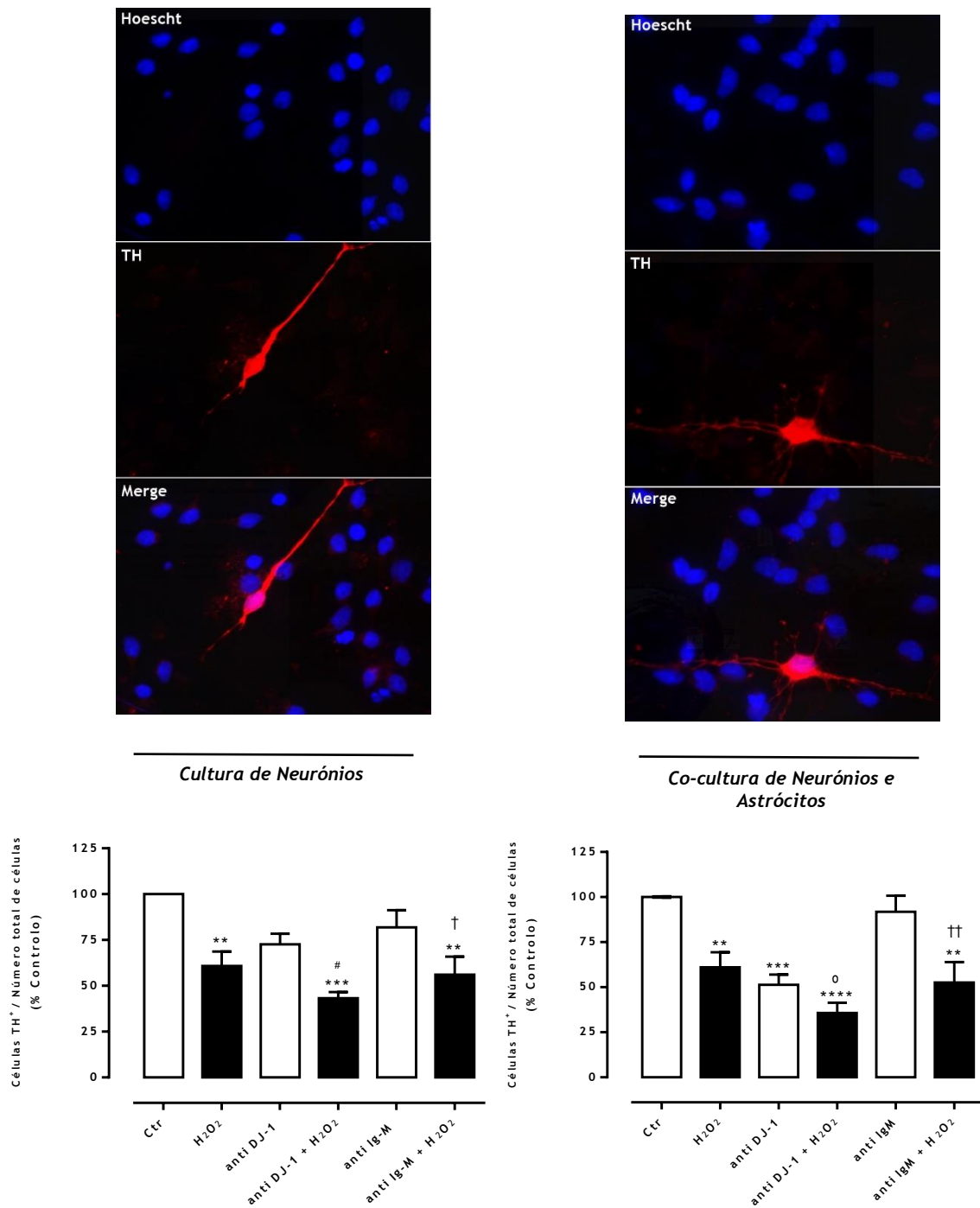


Figura 8. Efeito da imunodepleção de DJ-1 na sobrevivência dopaminérgica em culturas de neurónios e co-culturas de neurónios e astrócitos em condições basais e após exposição a H₂O₂. As culturas foram avaliadas em condições basais assim como quando estimuladas com H₂O₂ (25µM) durante 24h e na presença de anti DJ-1. Anti-IgM foi utilizado como controlo. Imagens representativas de imunocitoquímica em que neurónios dopaminérgicos foram marcados com anti-TH (vermelho) e os núcleos com Hoescht (azul) permitindo avaliar o n° total células presentes na preparação. As imagens foram adquiridas no microscópio de fluorescência (Axiobserver Z1, Zeiss) utilizando a objetiva de 63x. Os dados apresentados graficamente representam a média ± SEM de três experiências independentes em cultura de neurónios e quatro em co-cultura de neurónios e astrócitos (três no caso de anti IgM e anti IgM + H₂O₂) realizadas em triplicado e expressas em percentagem controlo. A análise estatística foi realizada usando o teste ANOVA de 1 via com o pós-teste de Bonferroni (****p<0,0001, ***p<0,001 e **p<0,01 comparado com o CTR; #p<0,05 comparado com anti DJ-1; °p<0,05 comparado com H₂O₂; ††p<0,01 e †p<0,05 comparado com anti-IgM).

Os resultados apresentados anteriormente mostraram o efeito da depleção de DJ-1 na viabilidade dopaminérgica. De forma a avaliar o impacto desta depleção na população global de neurónios foi determinado o efeito das mesmas condições experimentais no número total de células presentes na cultura. Para este fim foi avaliado o número de núcleos celulares marcados com o marcador nuclear Hoescht, um corante fluorescente que se intercala nas hélices do ácido desoxirribonucleico, e que permitiu avaliar o número total de neurónios presentes (Fig. 9).

No conjunto os resultados mostram que quer o estímulo oxidativo usado quer a depleção da DJ-1 afetaram de forma diferencial os neurónios dopaminérgicos. Uma vez que os neurónios dopaminérgicos representam apenas ~1% das células presentes nesta cultura não é de estranhar que a morte deste tipo neuronal não tenha um impacto muito significativo no número total de células presentes na cultura.

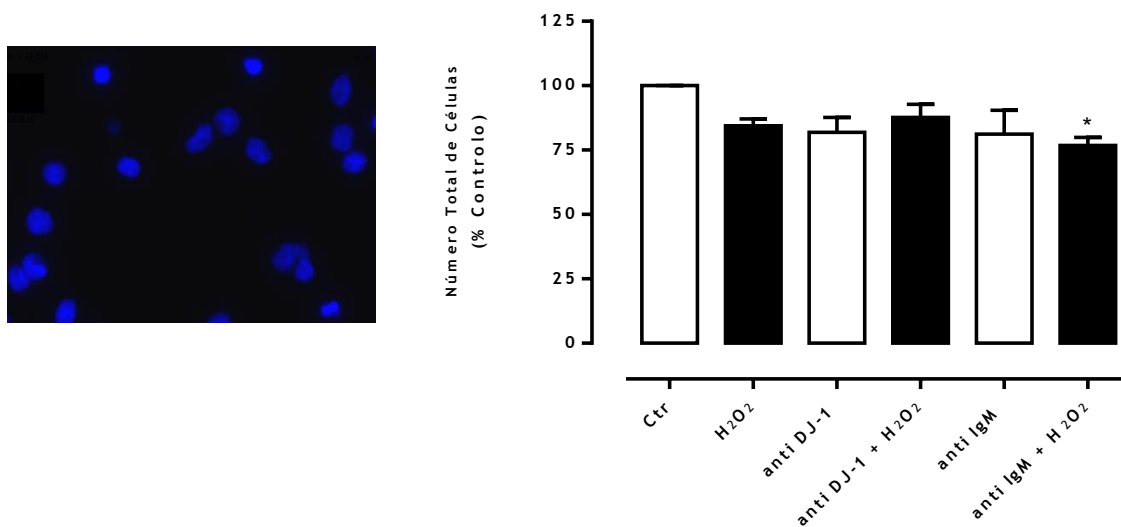


Figura 9. Efeito da imunodepleção de DJ-1 na sobrevivência neuronal geral quando culturas de Neurónios são estimuladas com H₂O₂. A cultura foi avaliada em condições basais assim como quando estimulada com H₂O₂ (25µM) durante 24h e na presença de anti DJ-1. O anticorpo contra IgM foi utilizado como controlo. Imagem representativa de imunocitoquímica em que os núcleos celulares foram marcados com Hoescht (azul) permitindo avaliar o nº total células presentes na preparação. A imagem foi adquirida no microscópio de fluorescência (Axiobserver Z1, Zeiss) utilizando a objetiva de 63x. Os dados apresentados graficamente representam a média ± SEM de três experiências independentes, realizadas em triplicado e expressas em percentagem de controlo. A análise estatística foi realizada usando o teste ANOVA de 1 via com o pós-teste de Bonferroni (*p<0,05; comparado com o CTR).

2. Avaliação da secreção de DJ-1 em condições controlo e de stress oxidativo

Uma vez que os resultados mostraram que a DJ-1 extracelular exerceu papel protetor sobre os neurónios dopaminérgicos quer em culturas de neurónios quer em co-culturas fomos determinar os níveis de DJ-1 libertados para o meio em condições controlo e oxidantes nos dois tipos de culturas.

Culturas de neurónios e co-culturas de neurónios e de astrócitos foram avaliadas tanto em condições basais como em presença de estímulo oxidativo, com intuito de perceber se a exposição a H_2O_2 afeta a secreção de DJ-1. Para esse fim efetuou-se análise da DJ-1 secretada para o meio de cultura por dot blot (Fig. 10 e 12) e western blot (Fig. 11 e 13).

Os resultados obtidos nos ensaios de dot blot sugerem que exposição a H_2O_2 , em culturas de neurónios, aumenta a secreção de DJ-1 para o meio de cultura, contudo dada a variabilidade registada entre replicados este aumento não foi estatisticamente significativo (Fig. 10).

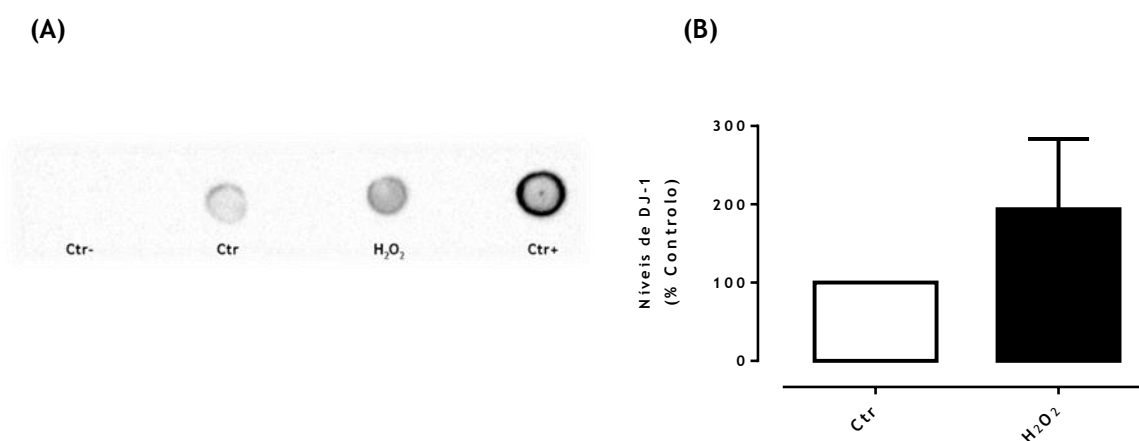


Figura 10. Efeito da exposição a H_2O_2 na secreção de DJ-1 em culturas de Neurónios - Dot Blot. Culturas de neurónios foram avaliadas em condições basais e de stress oxidativo ($25\mu M$ - 24h). **(A)** Imagem representativa de Dot Blot para DJ-1. Como controlo negativo foi aplicado tampão de diluição com solução desnaturante e como positivo no mesmo tampão foi diluída DJ-1 (Conc. final= $0,02012\mu g/\mu l$). **(B)** Os resultados foram analisados por densitometria ótica e apresentados graficamente onde cada barra representa a média \pm SEM de três experiências independentes, expressas em percentagem de controlo. A análise estatística foi realizada usando o Teste t (GraphPad Prism).

Os resultados obtidos após quantificação por western blot foram concordantes com o observado nos ensaios de dot blot, ou seja que em culturas de neurónios expostas a H₂O₂ (25µM) houve um aumento da secreção de DJ-1 para o meio de cultura, de cerca de 35,1%, em relação ao controlo, apesar da diferença aqui apresentada ser visivelmente menor que a referida anteriormente e não se apresentar estatisticamente significativa, facto que possivelmente pode ser ultrapassado com aumento do número de amostras analisadas (Fig. 11).

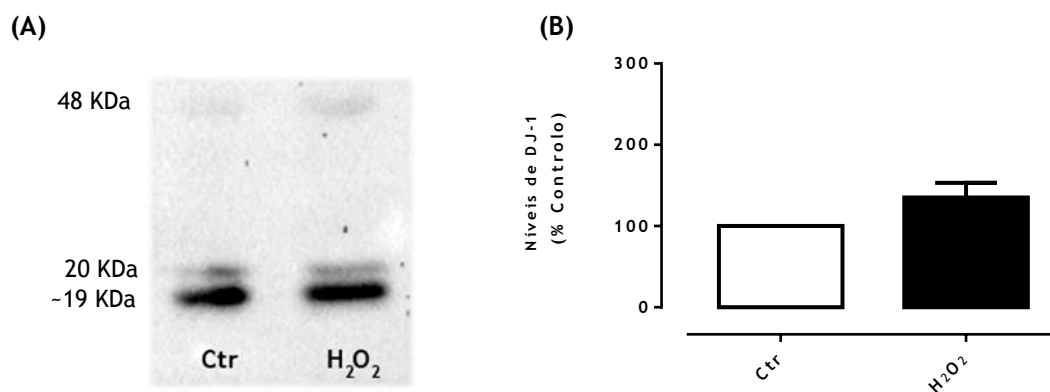


Figura 11. Efeito da exposição a H₂O₂ na secreção de DJ-1 em culturas de Neurónios - Western Blot. Culturas de neurónios foram avaliadas em condições basais e de stresse oxidativo (25µM - 24h). **(A)** Imagem representativa de Western Blot para DJ-1. **(B)** Os resultados foram analisados por densitometria e apresentados graficamente onde cada barra representa a média ± SEM de duas experiências independentes, expressas em percentagem de controlo. A análise estatística foi realizada usando o Teste t (GraphPad Prism).

Relativamente à secreção de DJ-1 por co-culturas de neurónios e astrócitos, a análise por dot blot mostrou que a exposição a H_2O_2 estimulou a secreção de DJ-1 para o meio de cultura, promovendo um aumento desta proteína no meio de 40,3% em comparação a uma situação controlo (Fig. 12).

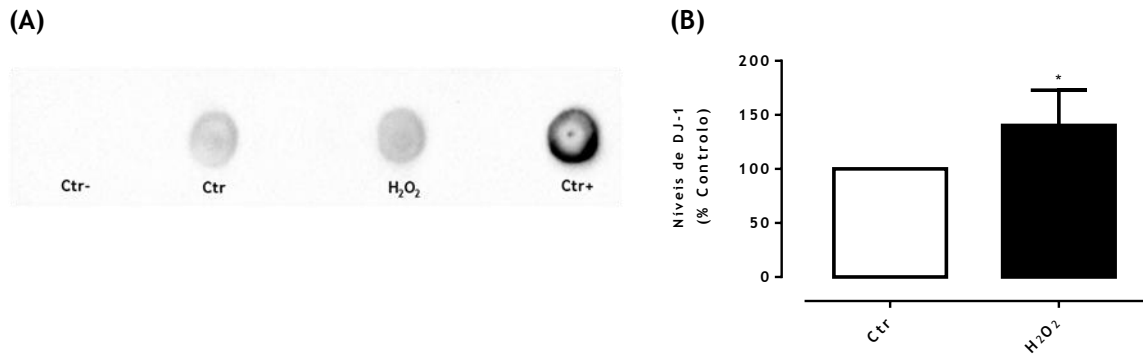


Figura 12. Efeito da exposição a H_2O_2 na secreção de DJ-1 em culturas Co-culturas de neurónio-astrócitos - Dot Blot. Co-culturas de neurónio-astrócitos foram avaliadas em condições basais e de stresse oxidativo ($25\mu M$ - 24h). (A) Imagem representativa de Dot Blot para DJ-1. Como controlo negativo foi aplicado tampão de diluição com solução desnaturante e como positivo no mesmo tampão foi diluída DJ-1 (Conc. final= $0,02012 \mu g/\mu l$). (B) Os resultados foram analisados por densitometria ótica e apresentados graficamente onde cada barra representa a média \pm SEM de quatro experiências independentes, expressas em percentagem de controlo. A análise estatística foi realizada usando o Teste t (* $p < 0.05$; comparado com o CTR) (GraphPad Prism).

Os resultados obtidos por western blot após quantificação foram concordantes com os obtidos por dot blot, confirmando que em culturas de co-culturas de neurónios e astrócitos expostas a H_2O_2 ($25\mu M$) existe um aumento da secreção de DJ-1 para o meio de cultura, de 55,6 %, em comparação com a situação controlo (Fig. 13)

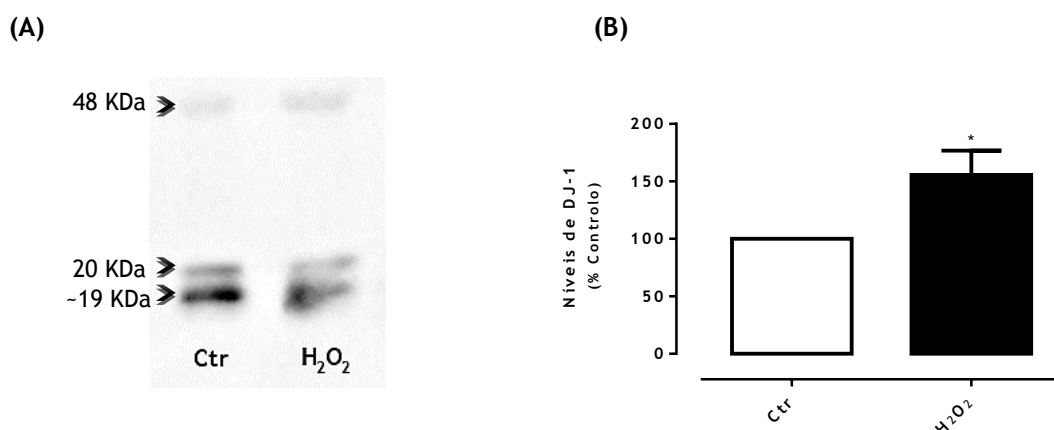


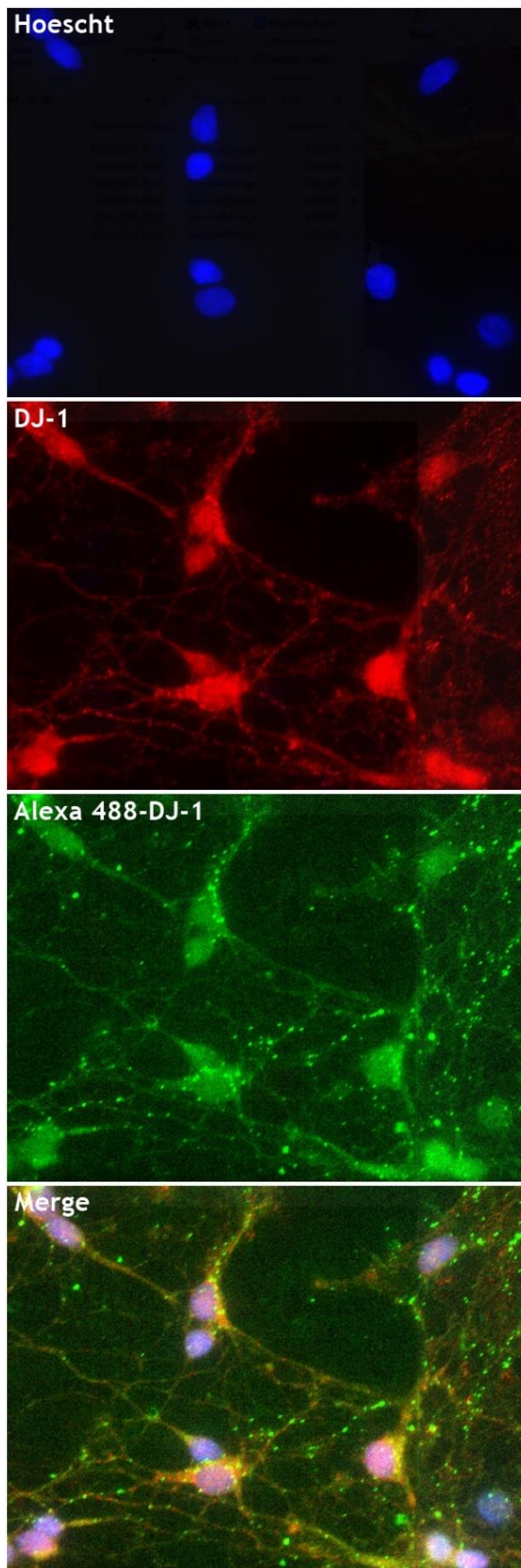
Figura 13. Efeito da exposição a H_2O_2 na secreção de DJ-1 em Co-culturas de Neurónio-astrócitos - Western Blot. Co-culturas de neurónio-astrócitos foram avaliadas em condições basais e de stresse oxidativo ($25\mu M$ - 24h). (A) Imagem representativa de Western Blot para DJ-1. (B) Os resultados foram analisados por densitometria ótica e apresentados graficamente onde cada barra representa a média \pm SEM de três experiências independentes, expressas em percentagem de controlo. A análise estatística foi realizada usando o Teste t (* $p < 0.05$; comparado com o CTR) (GraphPad Prism).

No seu conjunto os resultados obtidos mostram que ocorre libertação da DJ-1, quer em condições controlo quer perante estímulo oxidativo, sendo a sua secreção estimulada pela adição de H₂O₂. Em co-culturas de neurónios e de astrócitos esse aumento revelou-se estatisticamente significativo, no entanto em cultura neuronal será necessário aumentar o número de experiências para confirmar se a tendência observada é de facto significativa.

3. Avaliação da capacidade de incorporação de DJ-1 exógena

Sabendo que a DJ-1 secretada por neurónios e/ou astrócitos parece estar envolvida na neuroprotecção dopaminérgica e que a mesma é encontrada em níveis mais elevados em condições de stresse oxidativo, quando comparada com a situação controlo, tentámos avaliar se a DJ-1 presente no meio tem a capacidade de ser novamente incorporada pelas células para promover protecção. Visto que, como já referido anteriormente, a DJ-1 parece promover protecção quer por uma acção intracelular quer por uma via extracelular através de sinais parácrinos e autócrinos (68).

Com objetivo de esclarecer se ocorre internalização de DJ-1 foi adicionada DJ-1 conjugada com o fluoróforo Alexa 488 a co-culturas de neurónios e astrócitos. A fim de encontrar a concentração e o período temporal adequado para incubação da sonda foram realizados testes prévios, em que foram testadas diferentes concentrações e tempos de exposição: 5 µM e 8 µM e 3h, 4h e 6h. Para as concentrações de proteína mais elevadas e para tempos de incubação mais longos observou-se um aumento muito acentuado do número de células apópticas, pelo que os ensaios seguintes realizados com incubações de Alexa488-DJ-1 a 1 µM e 3 µM durante 1h, 2h e 3h. Nestas condições não se observaram alterações significativas de viabilidade celular e a marcação mais acentuada foi registada a 3 µM pelo que se optou por realizar os ensaios seguintes com Alexa 488-DJ-1 3 µM incubada durante 1h. Posteriormente foi efetuada imunocitoquímica contra DJ-1, MAP₂, TH ou GFAP consoante a preparação celular, assim como marcação dos núcleos celulares com Hoescht.



De modo a avaliarmos se a fluorescência observada para Alexa 488-DJ1 era coincidente a marcação para DJ-1 procedemos a uma imunocitoquímica contra esta proteína. Os resultados obtidos mostram uma sobreposição da marcação da DJ-1 (vermelho) e Alexa 488-DJ-1 (verde) (Fig. 14). Como seria de esperar a sobreposição não é total uma vez que a DJ-1 produzida endogenamente não marca para Alexa 488

(B)

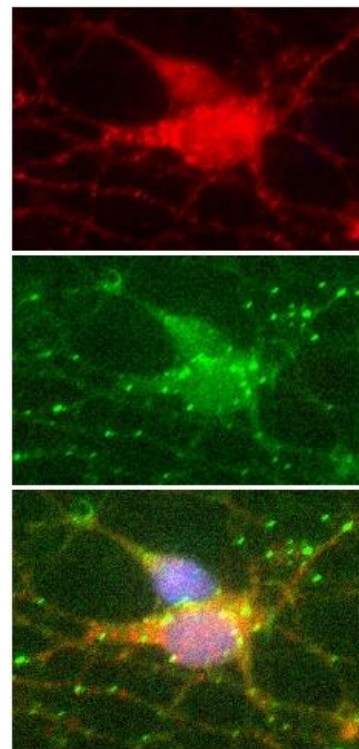
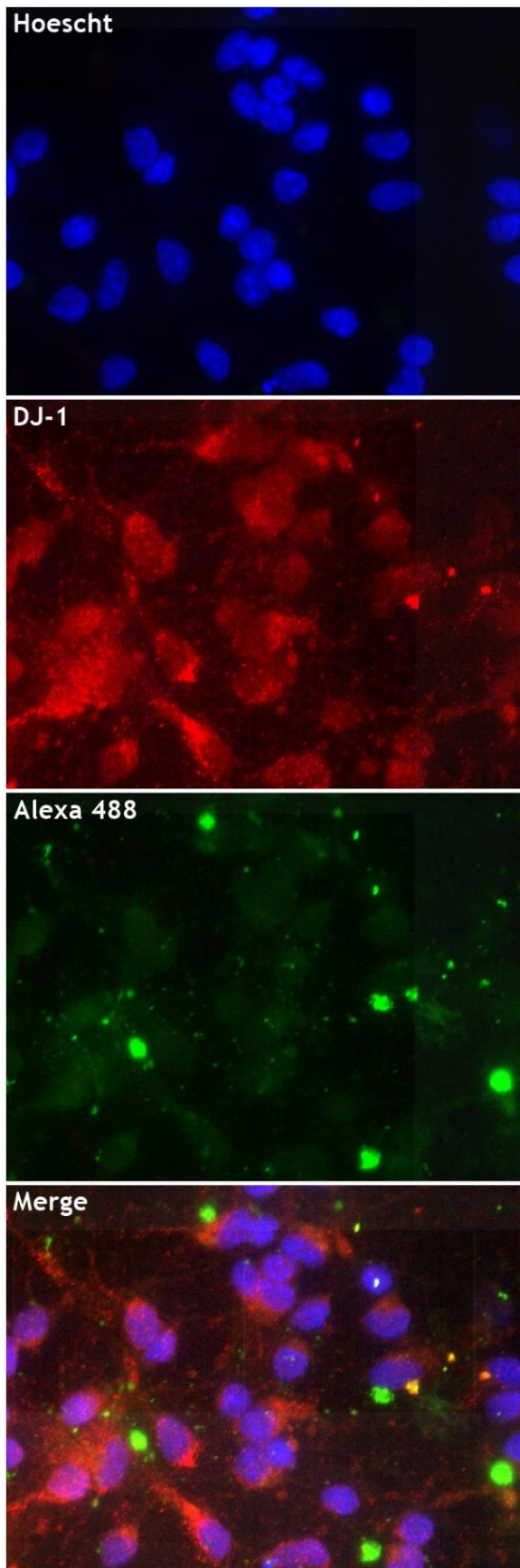


Figura 14. Verificação de co localização de Alexa 488-DJ-1 e marcação para DJ-1. DJ-1 conjugada a Alexa 488 ($3\mu\text{M}$ - 1h) em culturas mistas (neurónios e astrócitos). Imagens representativas de imunocitoquímica mostram marcação para DJ-1 (vermelho). Os núcleos foram marcados com Hoescht (azul). As imagens foram adquiridas no microscópio de fluorescência (Axiobserver Z1, Zeiss) utilizando a objetiva de 63x. (B) Ampliação de uma das regiões.

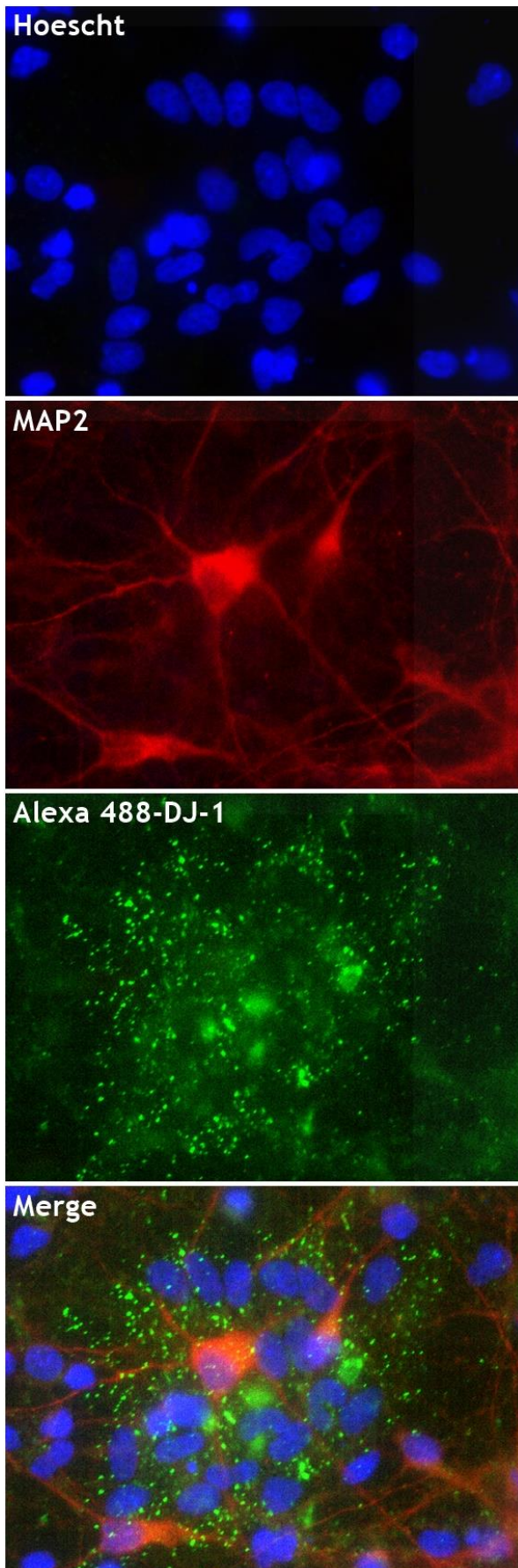


Apesar de no procedimento de conjugação da proteína DJ-1 à sonda fluorescente Alexa 488 haver um passo de purificação cujo objetivo é o de eliminar a sonda não conjugada procedeu-se a um controlo que visou eliminar a hipótese da marcação fluorescente observada nas células ser resultado da incorporação de alguma sonda livre (não conjugada) que ainda estivesse presente. Para este efeito procedeu-se à incubação das culturas celulares com a sonda Alexa 488 livre, na mesma concentração usada para o conjugado Alexa 488-DJ-1, também durante 1 hora. A análise por imunocitoquímica contra DJ-1 mostrou que neste caso não houve sobreposição da marcação da Alexa 488 e da DJ-1 (endógena). Foram observados agregados de sonda, não co-localizados com marcação para DJ-1 e em nada semelhantes à distribuição anteriormente analisada (**Fig. 15**).

Figura 15. Análise da localização de Alexa 488 e marcação para DJ-1. A sonda Alexa 488 não conjugada foi adicionada a culturas mistas (neurónios e astrócitos), durante 1 hora. Imagens representativas de imunocitoquímica mostram marcação para DJ-1 (vermelho). Os núcleos foram marcados com Hoescht (azul). As imagens foram adquiridas no microscópio de fluorescência (Axiobserver Z1, Zeiss) utilizando a objetiva de 63x.

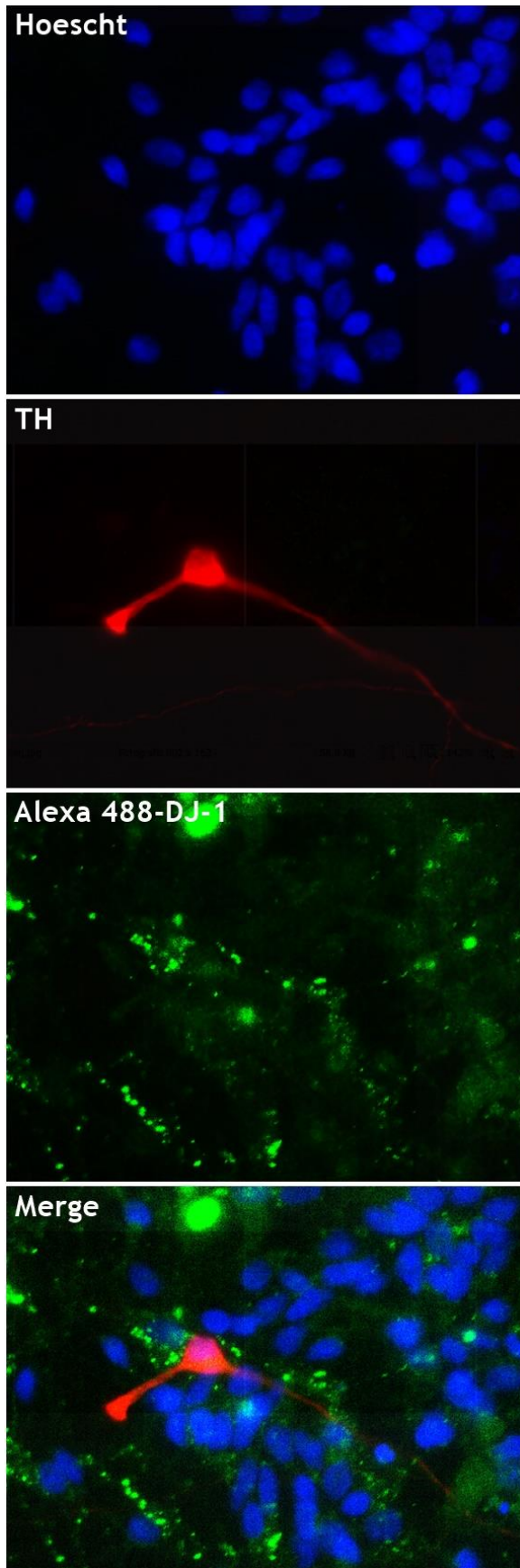
Como outro controle para a especificidade da incorporação da DJ-1, as células foram expostas a proteína fluorescente verde (green fluorescent protein - GFP), uma proteína com um peso molecular próximo do da DJ-1 (26,9kDa), na mesma concentração que a usada no caso da incubação com DJ-1-Alexa 488 (3 μ M). No entanto, os resultados obtidos não foram consistentes, visto ter ocorrido em grande extensão a passagem de sinal da fluorescência fluorescência vermelha (DJ-1) quando se procedeu à aquisição da fluorescência verde (GFP).

3.1 Identificação do tipo(s) celular(es) que incorporou(ram) Alexa 488-DJ-1



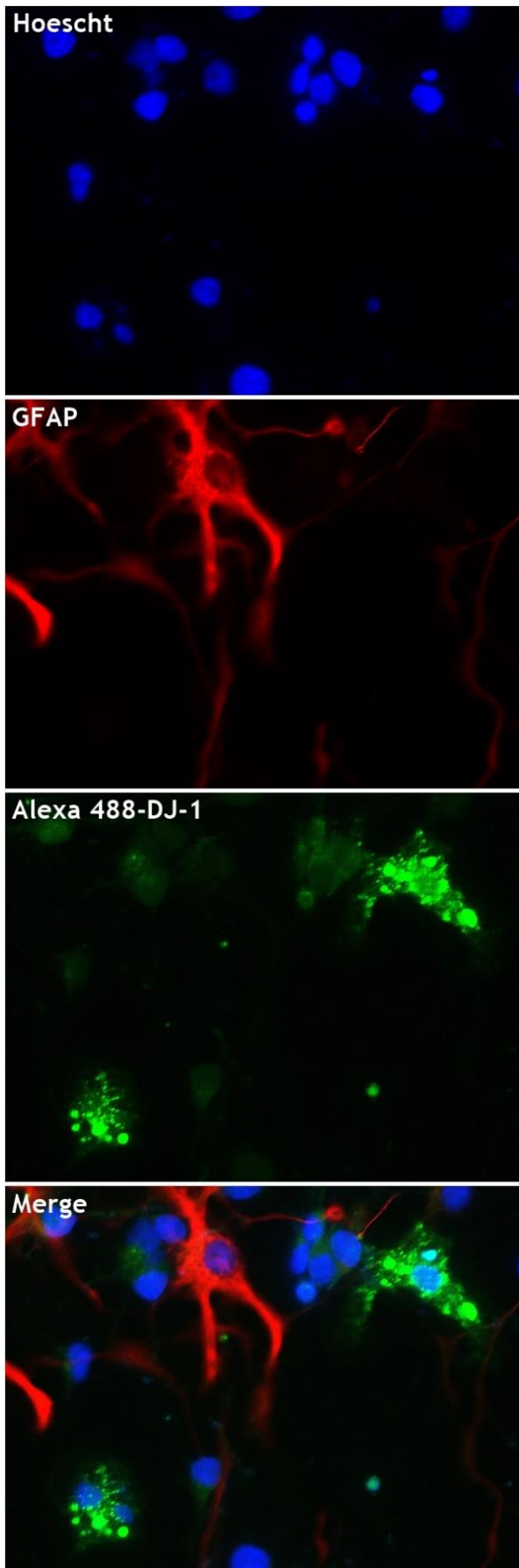
Após confirmação de que a fluorescência observada através de Alexa 488 corresponde a incorporação de DJ-1 fomos analisar quais as células, neurónios ou astrócitos, que estavam a incorporar DJ-1 extracelular. Com essa finalidade, e após adição de Alexa 488-DJ-1 nas condições anteriormente descritas, foi realizada uma imunocitoquímica contra a proteína associada aos microtúbulos do tipo 2 (MAP2) um marcador neuronal. Os resultados mostraram que uma grande percentagem das células que internalizaram Alexa 488-DJ-1 não marcavam para MAP2 (Fig. 16).

Figura 16. Incorporação de DJ-1 - Análise da localização de Alexa 488-DJ-1 e marcação para MAP-2. DJ-1 conjugada a Alexa 488 ($3\mu\text{M}$ - 1h) foi adicionada a culturas mistas (neurónios e astrócitos). Imagens representativas de imunocitoquímica mostram marcação para MAP-2 (vermelho). Os núcleos foram marcados com Hoescht (azul). As imagens foram adquiridas no microscópio de fluorescência (Axiobserver Z1, Zeiss) utilizando a objetiva de 63x.



Uma vez que se verificou que existia internalização de Alexa 488-DJ-1 em alguns neurónios, para clarificar se os neurónios em questão seriam dopaminérgicos, efetuou-se imunocitoquímica contra o marcador dopaminérgico tirosina hidroxilase (TH). A análise dos diferentes campos em que se observaram neurónios dopaminérgicos não permitiu observar internalização da sonda em células TH⁺ (Fig. 17).

Figura 17. Incorporação de DJ-1 - Análise da localização de Alexa 488-DJ-1 e marcação para TH. DJ-1 conjugada a Alexa 488 (3µM - 1h) foi adicionada a culturas mistas (neurónios e astrócitos). Imagens representativas de imunocitoquímica mostram marcação para TH (vermelho). Os núcleos foram marcados com Hoescht (azul). As imagens foram adquiridas no microscópio de fluorescência (Axiobserver Z1, Zeiss) utilizando a objetiva de 63x.



Após constatar que existe internalização de Alexa 488-DJ-1 em células MAP2⁺, foi efetuada imunocitoquímica contra a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) um marcador astrocitário, a fim de perceber se essa internalização está a ocorrer em astrócitos. Após análise das preparações foi possível perceber que não parece ser em astrócitos que está a acontecer internalização de Alexa 488-DJ-1 (Fig. 18).

Figura 18. Incorporação de DJ-1 - Análise da localização de Alexa 488-DJ-1 e marcação para GFAP. DJ-1 conjugada a Alexa 488 (3 μ M - 1h) foi adicionada a culturas mistas (neurónios e astrócitos). Imagens representativas de imunocitoquímica mostram marcação para GFAP (vermelho). Os núcleos foram marcados com Hoescht (azul). As imagens foram adquiridas no microscópio de fluorescência (Axiobserver Z1, Zeiss) utilizando a objetiva de 63x.

Em conjunto estes resultados mostram que o conjugado DJ-1-Alexa 488 foi incorporado, contudo o único tipo celular em que se observou internalização do mesmo, ainda que em baixa percentagem, foi em neurónios, com exceção dos ND onde não se verificou incorporação da sonda.

Capítulo 5

Discussão

A DJ-1 é uma proteína com múltiplas funções (19), que ultimamente tem suscitado grande interesse devido à sua associação a mecanismos de defesa contra o stresse oxidativo nomeadamente na DP, uma vez que esta possui propriedades antioxidantes e antiapoptóticas neuroprotetoras que dependem do seu próprio estado de oxidação (54,57,69,70).

A DJ-1 localiza-se preferencialmente no citoplasma, e encontra-se também em mitocôndrias e no núcleo celular (40,66). Existem ainda evidências da sua presença em meio de várias culturas celulares, o que sugere a capacidade desta ser secretada pelas células (51).

Com o presente estudo, confirmamos a libertação da DJ-1 por neurónios e astrócitos, e avaliámos o papel protetor da proteína extracelular em ND expostos a lesões oxidativas.

Utilizando como estratégia a imunodepleção da DJ-1 presente no meio observámos uma maior perda de neurónios dopaminérgicos, quer em situações controlo quer em células expostas a H₂O₂, confirmando a secreção extracelular da proteína por parte de neurónios e/ou astrócitos, e ainda a capacidade protetora desta sobre ND. Constatou-se ainda que o efeito protetor é mais acentuado na presença de astrócitos. Esta libertação de DJ-1 e consequente neuroprotecção vai de encontro aos dados apresentados por outros estudos que indicam que a secreção da proteína está envolvida na neuroprotecção *in vitro* e após exposição a H₂O₂ (68)(52). O facto de se ter observado lesão dopaminérgica mais marcada na presença de astrócitos, após bloqueio da proteína, poderá ser explicada por uma maior diferença de condições neuroprotetoras, conferidas pela DJ-1, entre a condição controlo e a condição em que foi aplicado anticorpo, uma vez que o bloqueio da proteína na co-cultura corresponde a depleção da DJ-1 neuronal e astrocitária, e está descrito que este último tipo celular é relativamente rico nesta proteína (52).

Sabendo que a moderada oxidação da DJ-1, parece facilitar a libertação da mesma (51) e após termos verificado que a DJ-1 presente no meio extracelular protege os neurónios dopaminérgicos, fomos quantificar os níveis de DJ-1 presentes no meio. Os meios condicionados por culturas de neurónios expostas a H₂O₂ apresentaram níveis mais elevados de DJ-1 quando comparados com meios de culturas controlo. De forma semelhante em co-culturas de neurónios e astrócitos observou-se também que o stresse oxidativo aumentou os níveis de DJ-1 presentes no meio. Em conjunto estes resultados mostram que para além de ocorrer libertação da DJ-1 em ambas as culturas, esta parece desempenhar neuroprotecção dopaminérgica, sendo a sua secreção estimulada pela presença de stresse oxidativo.

Estes resultados vão de encontro ao observado por outros investigadores. Yanagida e colaboradores (52), utilizando culturas de astrócitos do córtex e estriado mostraram que a DJ-

1 é secretada em resposta à presença de stresse oxidativo, sendo essa libertação aumentada por concentrações crescentes de H₂O₂.

A DJ-1 está presente no líquido cefalorraquidiano (LCR) em condições fisiológicas normais. No entanto, em situações patológicas (os níveis da proteína são significativamente aumentados, sendo esses níveis mais altos no estágio precoce da doença, o que suporta a hipótese de que a DJ-1 possui papel crítico em resposta ao stresse oxidativo e ainda a hipótese de poder vir a ser usada para o diagnóstico de fase inicial da DP esporádica (67). Apesar do nosso estudo ter observado presença de DJ-1 mesmo em condições basais, é concordante com este na medida em que se verificou que o stresse oxidativo levou a um aumento da libertação de DJ-1. Também em soro de doentes com DP esporádica foi detetada DJ-1. Apesar de ter sido observada presença da proteína em todas as amostras analisadas, os níveis da mesma não apresentaram diferenças significativas entre controlos e doentes, nem entre estágios da doença, possivelmente porque a DJ-1 presente em amostras de soro não reflete a DJ-1 presente no tecido cerebral, ao contrário da detetada no LCR (64). Em conjunto estes trabalhos sugerem um papel relevante da proteína extracelular, quer em indivíduos doentes quer saudáveis.

Usando como ferramenta experimental a proteína DJ-1 conjugada ao fluorocromo Alexa 488 confirmámos a capacidade dos neurónios do mesencéfalo ventral em incorporar esta proteína. Curiosamente não foi possível identificar neurónios dopaminérgicos que incorporassem esta proteína marcada. Da análise da marcação obtida foi ainda possível observar células negativas para MAP2 com incorporação significativa de Alexa-488, o que indica que para além dos neurónios outras células têm também capacidade de incorporar a proteína extracelular. No entanto, não foi possível clarificar o fenótipo destas células.

Estes resultados estão de acordo com observações anteriores que mostraram a incorporação de DJ-1 ligada à tag-GST no N-terminal, quando injetada na SN de ratos, ou quando adicionada ao meio de cultura de células SH-SY5Y (71).

Em conjunto os resultados obtidos mostram que neurónios e astrócitos mesencefálicos têm a capacidade de libertar DJ-1, quer em condições basais quer em condições oxidantes, e que a proteína secretada para o meio é relevante para a sobrevivência dopaminérgica. Verificámos ainda que a DJ-1 extracelular pode ser recaptada por neurónios, o que sugere uma acção parácrina desta proteína.

Capítulo 6

Conclusões e Perspetivas Futuras

Tendo por base o nosso objetivo inicial de analisar o papel neuroprotetor da DJ-1 em culturas primárias do mesencéfalo ventral expostas a condições oxidantes, fomos avaliar se a DJ-1 libertada para meio contribui para a neuroprotecção dopaminérgica, quer em condições basais quer em condições de stresse oxidativo. Os resultados obtidos mostraram que a exposição a H_2O_2 induz lesão dopaminérgica e que a extensão da lesão foi semelhante na cultura de neurónios na co-cultura de neurónios e astrócitos, comprovámos também que a DJ-1 extracelular libertada por estas mesmas culturas protege os ND quer em condições basais, quer perante estímulo oxidativo sendo essa protecção mais acentuada quando estão presentes astrócitos.

Relativamente ao bloqueio da DJ-1 extracelular, este deveria ser confirmado por quantificação por western blot, no entanto também se poderia recorrer a uma técnica diferente para eliminar a proteína presente no meio nomeadamente com recurso a uma coluna de afinidade.

Nas próximas tarefas, seria interessante utilizar a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para analisar marcadores de stresse oxidativo, tanto na presença como na ausência de DJ-1, em condições controlo e oxidantes.

Visto que a DJ-1 extracelular protege os ND, tanto em condições basais como perante stresse oxidativo fomos perceber se essa protecção envolve o aumento da libertação da proteína para o meio. A exposição a H_2O_2 desencadeou o aumento da secreção de DJ-1 em co-culturas de neurónios e astrócitos e também em culturas de neurónios, apoiando a hipótese da DJ-1 extracelular exercer uma ação protetora.

Seria interessante analisar o estado oxidativo da cisteína 106 da DJ-1, de modo a confirmarmos estes nossos resultados com recurso a uma abordagem diferente, percebendo simultaneamente em que forma oxidativa esta é libertada.

Não está esclarecido se a DJ-1 secretada para o meio exerce o seu efeito por ação nas membranas celulares ou se tem a capacidade de ser internalizada e assim induzir a protecção celular intracelularmente. Usando como ferramenta a DJ-1 conjugada à molécula fluorescente Alexa 488 verificámos que a DJ-1 exógena pode ser em neurónios. Contudo nunca observámos internalização por ND. Também não se registou internalização por astrócitos. De modo a concluir o nosso objetivo principal deve confirmar-se o efeito protetor

da aplicação de DJ-1 exógena na sobrevivência neuronal, por exposição destas culturas a H_2O_2 , como já efetuado por Inden e colaboradores em linha celular SH-SY5Y.

Visto que a capacidade neuroprotetora da DJ-1 foi comprovada, seria importante dar continuidade a este estudo tentando perceber de que forma a proteína efetua essa proteção, nomeadamente verificar se esta promove a expressão de proteínas antiapoptóticas ou antioxidantes.

Capítulo 7

Referências Bibliográficas

1. Hussain A, Bashir K, Anees S, Afzal M, Masood A, Ahmad M, et al. Oxidative stress , mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases ; a mechanistic insight. *Biomed Pharmacother.* 2015;74:101-10.
2. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
3. Lachance P a., Nakat Z, Jeong WS. Antioxidants: An integrative approach. *Nutrition.* 2001;17(10):835-8.
4. Hwang O. Role of Oxidative Stress in Parkinson ' s Disease. *Exp Neurobiol.* 2013;22(1):11-7.
5. De Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2006;5(6):525-35.
6. Parkinson J. *Essay on the Shaking Palsy.* 2007. 1-25 p.
7. Corti O, Lesage S, Brice a. What Genetics Tells us About the Causes and Mechanisms of Parkinson's Disease. *Physiol Rev.* 2011;91(4):1161-218.
8. Gasser T. Genetics of Parkinson's disease. *Dialogues Clin Neurosci.* 2004. p. 295-301.
9. Blesa J, Trigo-Damas I, Quiroga-Varela A, Jackson-Lewis VR. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Front Neuroanat.* 2015;9:1-9.
10. Kummer AME. *Alterações neuropsiquiátricas na doença de Parkinson.* 2009.
11. Roberto C, Rieder DM, Maria R, Almeida M De. Funções Executivas na Doença de Parkinson: Revisão da Literatura. *Psico.* 2012;43:552-61.
12. Schapira AH, Jenner P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2011;26(6):1049-55.
13. Sawada H, Shimohama S. Estrogens and Parkinson disease: novel approach for neuroprotection. *Endocrine.* 2003;21(1):77-9.
14. Yokoyama H of glial cells in neurotoxin-induced animal models of P disease, Uchida H, Kuroiwa H, Kasahara J, Araki T. Role of glial cells in neurotoxin-induced animal models of Parkinson's disease. *Neurol Sci.* 2011;32(1):1-7.
15. Liu B, Gao HM, Hong JS. Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: Role of neuroinflammation. *Environ Health Perspect.* 2003;111(8):1065-73.

16. Björkblom B, Adilbayeva A, Maple-Grødem J, Piston D, Ökvist M, Xu XM, et al. Parkinson disease protein DJ-1 binds metals and protects against metal-induced cytotoxicity. *J Biol Chem*. 2013;288(31):22809-20.
17. Fischer R, Maier O. Interrelation of Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease : Role of TNF. *Hindawi Publ Corp*. 2015;2015:1-18.
18. Morató L, Bertini E, Verrigni D, Ardisson A, Ruiz M, Ferrer I, et al. Mitochondrial dysfunction in central nervous system white matter disorders. *Glia*. 2014;62:1878-94.
19. Jeong HJ, Kim DW, Kim MJ, Woo SJ, Kim HR, Kim SM, et al. Protective effects of transduced Tat-DJ-1 protein against oxidative stress and ischemic brain injury. *Exp Mol Med*. 2012;44(10):586.
20. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem [Internet]*. 2004;266:37-56. Obtido de: <http://centaur.reading.ac.uk/12909/>
21. Kamata H, Hirata H. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal*. 1999;11(1):1-14.
22. Duarte A. Sensores Luminescentes para Espécies Reativas de Oxigênio e Azoto. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto; 2013.
23. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009;417(1):1-13.
24. Stone JR, Yang S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(3-4):243-70.
25. Segura-Aguilar J, Paris I, Muñoz P, Ferrari E, Zecca L, Zucca F a. Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2014;129(6):898-915.
26. Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: The need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*. 2001;40(8):959-75.
27. Jenner Peter. Oxidative stress in Parkinson's disease. *An Neurol*. 2003;53:S26-38.
28. Lev N, Barhum Y, Pilosof NS, Ickowicz D, Cohen HY, Melamed E, et al. DJ-1 protects against dopamine toxicity: Implications for parkinson's disease and aging. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci*. 2013;68(3):215-25.
29. Mandemakers W, Morais V a, De Strooper B. A cell biological perspective on mitochondrial dysfunction in Parkinson disease and other neurodegenerative diseases. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 10):1707-16.
30. Exner N, Lutz AK, Haass C, Winklhofer KF. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *EMBO J. Nature Publishing Group*; 2012;31(14):3038-62.
31. Muñoz P, Huenchuguala S, Paris I, Segura-Aguilar J. Dopamine oxidation and autophagy. *Parkinsons Dis*. 2012;2012:1-13.
32. Stowe DF, Camara AKS. Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(6):1373-414.

33. Scott B, Hollensworth, Cheun-chen Shen, Julia E. Sim, Douglas R. Spitz, Glenn L. Wilson SPL. Glial cell type-specific responses to menadione-induced oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(8):1161-74.
34. Ferreira IC, Abreu RM. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanálise.* 2007;2:32-9.
35. Sherer TB, Betarbet R, Stout AK, Lund S, Baptista M, Panov A V, et al. An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage. *J Neurosci.* 2002;22(16):7006-15.
36. Dias V, Junn E, Mouradian MM. The role of oxidative stress in parkinson's disease. *J Parkinsons Dis.* 2013;3(4):461-91.
37. Qian L, Flood PM, Hong JS. Neuroinflammation is a key player in Parkinson's disease and a prime target for therapy. *J Neural Transm.* 2010;117(8):971-9.
38. Nguyen T a, Frank-Cannon T, Martinez TN, Ruhn K a, Marvin M, Casey B, et al. Analysis of inflammation-related nigral degeneration and locomotor function in DJ-1(-/-) mice. *J Neuroinflammation.* 2013;10:50.
39. Uttara B, Singh A V, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol.* 2009;7(1):65-74.
40. Aron L, Klein P, Pham TT, Kramer ER, Wurst W, Klein R. Pro-Survival Role for Parkinson's Associated Gene DJ-1 Revealed in Trophically Impaired Dopaminergic Neurons. *PLoS Biol.* 2010;8(4).
41. Görner K, Holtorf E, Waak J, Pham TT, Vogt-Weisenhorn DM, Wurst W, et al. Structural determinants of the C-terminal helix-kink-helix motif essential for protein stability and survival promoting activity of DJ-1. *J Biol Chem.* 2007;282(18):13680-91.
42. Nagakubo D, Taira T, Kitaura H, Ikeda M, Tamai K, Iguchi-Ariga SM, et al. DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;231(2):509-13.
43. Gan L, Johnson D a., Johnson J a. Keap1-Nrf2 activation in the presence and absence of DJ-1. *Eur J Neurosci.* 2010;31(6):967-77.
44. Lev N, Ickowicz D, Melamed E, Offen D. Oxidative insults induce DJ-1 upregulation and redistribution: Implications for neuroprotection. *Neurotoxicology.* 2008;29(3):397-405.
45. Repici M, Straatman KR, Balduccio N, Enguita FJ, Outeiro TF, Giorgini F. Parkinson's disease-associated mutations in DJ-1 modulate its dimerization in living cells. *J Mol Med.* 2012;91(5):599-611.
46. Kahle PJ, Waak J, Gasser T. DJ-1 and prevention of oxidative stress in Parkinson's disease and other age-related disorders. *Free Radic Biol Med.* Elsevier Inc.; 2009;47(10):1354-61.
47. Macedo MG, Anar B, Bronner IF, Cannella M, Squitieri F, Bonifati V, et al. The DJ-1L166P mutant protein associated with early onset Parkinson's disease is unstable and forms higher-order protein complexes. *Hum Mol Genet.* 2003;12(21):2807-16.
48. Tao X, Tong L. Crystal structure of human DJ-1, a protein associated with early onset Parkinson's disease. *J Biol Chem.* 2003;278(33):31372-9.

49. Trempe JF, Fon E a. Structure and function of Parkin, PINK1, and DJ-1, the three musketeers of neuroprotection. *Front Neurol.* 2013;4 APR(April):1-11.
50. Honbou K, Suzuki NN, Horiuchi M, Niki T, Taira T, Ariga H, et al. The crystal structure of DJ-1, a protein related to male fertility and Parkinson's disease. *J Biol Chem.* 2003;278(33):31380-4.
51. Tsuboi Y, Munemoto H, Ishikawa S, Matsumoto KI, Iguchi-Arigo SMM, Ariga H. DJ-1, a causative gene product of a familial form of Parkinson's disease, is secreted through microdomains. *FEBS Lett.* 2008;582(17):2643-9.
52. Yanagida T, Tsushima J, Kitamura Y, Yanagisawa D, Takata K, Shibaike T, et al. Oxidative stress induction of DJ-1 protein in reactive astrocytes scavenges free radicals and reduces cell injury. *Oxid Med Cell Longev.* 2009;2(1):36-42.
53. Clements CM, McNally RS, Conti BJ, Mak TW, Ting JP. DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2. *PNAS.* 2006;103(41):15091-6.
54. Yanagida T, Kitamura Y, Yamane K, Takahashi K, Takata K, Yanagisawa D, et al. Protection against oxidative stress-induced neurodegeneration by a modulator for DJ-1, the wild-type of familial Parkinson's disease-linked PARK7. *J Pharmacol Sci.* 2009;109(3):463-8.
55. Ariga H, Takahashi-niki K, Kato I, Maita H, Niki T, Iguchi-ariga SMM. Neuroprotective Function of DJ-1 in Parkinson ' s Disease. *Hindawi Publ Corp.* 2013;2013:1-9.
56. Landar A, Oh J-Y, Giles NM, Isom A, Kirk M, Barnes S, et al. A sensitive method for the quantitative measurement of protein thiol modification in response to oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2006;40(3):459-68.
57. Junn E, Jang WH, Zhao X, Jeong BS, Mouradian MM. Mitochondrial localization of DJ-1 leads to enhanced neuroprotection. *J Neurosci Res.* 2009;87(1):123-9.
58. Kim S-J, Park Y-J, Hwang I-Y, Youdim MBH, Park K-S, Oh YJ. Nuclear translocation of DJ-1 during oxidative stress-induced neuronal cell death. *Free Radic Biol Med.* Elsevier; 2012;53(4):936-50.
59. Liang CL, Wang TT, Luby-Phelps K, German DC. Mitochondria mass is low in mouse substantia nigra dopamine neurons: Implications for Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2007;203(2):370-80.
60. Hayashi T, Ishimori C, Takahashi-Niki K, Taira T, Kim YC, Maita H, et al. DJ-1 binds to mitochondrial complex I and maintains its activity. *Biochem Biophys Res Commun.* Elsevier Inc.; 2009;390(3):667-72.
61. Canet-Avilés RM, Wilson M a, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, Bandyopadhyay S, et al. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfenic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(24):9103-8.
62. Kato I, Maita H, Takahashi-Niki K, Saito Y, Noguchi N, Iguchi-Arigo SMM, et al. Oxidized DJ-1 inhibits p53 by sequestering p53 from promoters in a DNA-binding affinity-dependent manner. *Mol Cell Biol.* 2013;33(2):340-59.
63. Balista PA. Inibidores de fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) e neuroproteção mediada pela cascata de sinalização da AKT na fase aguda do modelo de pilocarpina. 2010.

64. Maita C, Tsuji S, Yabe I, Hamada S, Ogata A, Maita H, et al. Secretion of DJ-1 into the serum of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2007;431(1):86-9.
65. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Common Immunol Tech*. 1997;Appendix 3:A.3B.1-2.
66. Kotaria N, Hinz U, Zechel S, Von Bohlen Und Halbach O. Localization of DJ-1 protein in the murine brain. *Cell Tissue Res*. 2005;322(3):503-7.
67. Waragai M, Wei J, Fujita M, Nakai M, Ho GJ, Masliah E, et al. Increased level of DJ-1 in the cerebrospinal fluids of sporadic Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;345(3):967-72.
68. Yuji Kanekoa, 1, Hideki Shojoa, b, 1, Jack Burnsa, Meaghan Staplesa, Naoki Tajiria, c, 1 and CVB. DJ-1 ameliorates ischemic cell death in vitro possibly via mitochondrial pathway. *Neurobiol*. 2014;62(6):56-61.
69. Lev N, Ickowicz D, Barhum Y, Lev S, Melamed E, Offen D. DJ-1 protects against dopamine toxicity. *J Neural Transm*. 2009;116(2):151-60.
70. Yanagida T, Takata K, Inden M, Kitamura Y, Taniguchi T, Yoshimoto K, et al. Distribution of DJ-1, Parkinson's disease-related protein PARK7, and its alteration in 6-hydroxydopamine-treated hemiparkinsonian rat brain. *J Pharmacol Sci*. 2006;102:243-7.
71. Inden M, Taira T, Kitamura Y, Yanagida T, Tsuchiya D, Takata K, et al. PARK7 DJ-1 protects against degeneration of nigral dopaminergic neurons in Parkinson's disease rat model. *Neurobiol Dis*. 2006;24(1):144-58.