



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2017 00421**

(22) Data de depozit: **26/06/2017**

(41) Data publicării cererii:
28/12/2018 BOPI nr. **12/2018**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE ÎN DOMENIUL
PATOLOGIEI ȘI ȘTIINȚELOR
BIOMEDICALE "VICTOR BABEȘ",
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.99-101,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **ENCIU ANA-MARIA, STR. PLUGARILOR
NR. 1, BL. 94, SC. A, AP. 15, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **CODRICI ELENA,
STR. CÂMPIA LIBERTĂȚII NR. 4,
BL. PM 51, SC. 3, ET. 7, AP. 117,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **MIHAI SIMONA, BD. CAMIL RESSU
NR. 76, BL. S1B-S1C, SC. B, AP. 34,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **POPESCU IONELA DANIELA,
BD. THEODOR PALLADY, NR.4, BL.M2,
SC.A, AP.28, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **DUDĂU MARIA, STR.NOVACI, NR.4,
BL.S9, SC.2, AP.60, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ANGHELACHE LAURENȚIU,
STR. DRAGOȘ VODĂ NR.17, SLĂNIC, PH,
RO;**
• **TANASE CRISTIANA,
CALEA 13 SEPTEMBRIE NR.126, BL.P34,
SC.1, ET.8, AP.30, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **PROCEDEU DE IDENTIFICARE A PROTEINEI
PRECURSOARE A AMILOIDULUI ÎN COMPLEXE PROTEICE
CU GREUTATE MOLECULARĂ MARE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de identificare al proteinei precursoră a amiloidului în stare nativă, în complexe proteice cu greutate moleculară mare, izolate din membrane celulare, cu aplicare în patologia bolii Alzheimer. Procedeu, conform invenției, constă în separarea membranelor celulare de restul componentelor celulare, extragerea complexelor proteice cu 0,5...1% detergent Triton-X 100 în 50...75 mM tampon imidazol, urmată de separarea complexelor proteice prin electro-

foreză în gel de poliacrilamidă timp de 2...4 h, la amperaj constant de 10 mA/gel pe gheață, în tampon de electroforeză cu pH 8...10, transferul complexelor pe membrană de transfer timp de 20...22 h, la amperaj constant de 100 mA, pe gheață, urmată de identificarea proteinei cu anticorpi specifici.

Revendicări: 1
Figuri: 5

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



DESCRIEREA INVENȚIEI

PROCEDEU DE IDENTIFICARE A PROTEINEI PRECURSOARE A AMILOIDULUI ÎN COMPLEXE PROTEICE CU GREUTATE MOLECULARĂ MARE

Domeniul tehnic: A61G01N33/48

Stadiul cunoașterii și tehnicii în domeniu

Invenția se referă la un procedeu de identificare al proteinei precursoră a amiloidului în stare nativă, în complexe proteice cu greutate moleculară mare, izolate din membranele celulare. Procedul, important în domeniul sănătății umane, se bazează pe un protocol de electroforeză nativă și imunoblotare, particularizat pentru proteina mai sus menționată, implicată în patologia bolii Alzheimer.

Boala Alzheimer (BA) este o problemă acută de sănătate, cu încărcătură socială semnificativă. La momentul actual există o nevoie imperioasă de obținere a unui tratament împotriva BA, deoarece, în condițiile unei populații în curs de îmbătrânire, incidența și prevalența formei sporadice a bolii (fără încărcătură genetică) sunt în continuă creștere. În 2013, erau aproximativ 44,4 milioane pacienți cu demență în toată lumea, iar acest număr este în creștere. O mare parte din această creștere va fi în țările în curs de dezvoltare. Deja 62% din persoanele cu demență trăiesc în țările în curs de dezvoltare, dar până în 2050 acest procent va crește până la 71% (<http://www.alz.co.uk/research/statistics>). BA este în marea majoritate a cazurilor o boală a vârstei a 3a, cu două verigi patologice majore: acumularea de plăci neurotoxice de amiloid perineuronal și acumularea intraneuronală de neurofilamente hiperfosforilate.

Plăcile de amiloid sunt formate în principal din peptide rezultate din proteina precursoră a amiloidului (APP), prin acțiunea enzimatică a două secretaze, denumite β și γ . Există și α secretaze care împiedică formarea acestor peptide toxice (fig 1). Pe de altă parte, APP este implicat în dezvoltarea embrionară în neuritogeneză (Perez RG et al., J Neurosci. 1997;17(24):9407-14.), sinaptogeneză (Ribaut-Barassin C et al., Neuroscience. 2003;120(2):405-23.) și migrare neuronală (Kimmel CB., Annu Rev Neurosci. 1993;16:707-32.). Aceste date au fost ulterior confirmate și în creierul adult (Dawson GR et al. Neuroscience. 1999;90(1):1-13.), majoritatea datelor fiind raportate pe biopsii provenite de la pacienți cu BA (DeKosky ST, Scheff SW. Ann Neurol. 1990;27(5):457-64.; Li HL, et al. J Neurobiol. 1997;32(5):469-80.).

Deși primele studii legate de rolul fiziologic al APP sunt din anii 90, recent a reaparut interesul pentru implicarea APP în dezvoltarea sistemului nervos. Cele mai recente rapoarte care studiază proteina întregă și nu fragmente de clivaj, adresează implicarea APP în organizarea nodurilor Ranvier ale axonilor (Xu DE et al. Cell Adh Migr. 2014:e28802) sau plasticitate sinaptică (Tyan SH, et al. Mol Cell Neurosci. 2012;51(1-2):43-52.), folosind șoareci de laborator knockout pentru APP, investigând deci modificările care apar în absența proteinei.

APP are abilitatea de a dimeriza la membrana celulară, până la momentul actual fiind propuse două mecanisme care implica regiunea extracelulară a proteinei (Ben Khalifa N et al. Neurodegener Dis. 2012;10(1-4):92-5. ; Baumkötter F et al., J Neurosci. 2014;34(33):11159-72.; Abramsson A, et al. Dev Biol. 2013;381(2):377-88) fără rol în formarea plăcilor neurotoxice.

Prezentarea problemei tehnice

Cercetarea în domeniu întâmpină mai multe elemente de dificultate, care se pot împărți în elemente legate de complexitatea științifică a patologiei BA pe de o parte și elemente legate de dificultățile tehnice, pe de altă parte. Unele dintre dificultățile legate de complexitatea științifică a patologiei BA sunt:

- BA sporadică - boală multifactorială, motiv pentru care este dificil de trasat o legătură directă cauză-efect, mai ales la studiile *in vivo*;
- în două decenii de cercetare intensivă, cu investiții majore din partea industriei farmaceutice nu s-a obținut un tratament, astfel, aria de cercetare s-a extins tot mai mult – inițial pe alte populații celulare decât cele neuronale din sistemul nervos central, ulterior la interfața dintre sistemul nervos central și periferie, prin implicarea barierei hematoencefalice (Lyros E et al, Curr Alzheimer Res. 2014;11(1):18-26.) până la contextul sistemic general (Takeda S, et al. Front Aging Neurosci. 2014;6:171).
- datorită impactului medical, social și economic mare al acestei boli, marea majoritate a eforturilor de cercetare se concentrează pe studiul părții de catabolizare a proteinei, așa cum este el prezentat în figura 1. Aceste studii se fac de obicei *in vitro* sau *in vivo*, în creier îmbătrânit sau tarat, pe modele animale care reproduc boala sau pe modele knockout (KO) care nu exprimă APP. Inclusiv studiile privind potențialele funcții ale proteinei se concentrează tot pe investigarea fragmentelor proteice rezultate din diverse procese enzimatice (Hunter S, Brayne C. Biochem Pharmacol. 2014;88(4):652-60.) decât pe investigarea proteinei necatabolizate.

- Exista puține date despre ce se întâmplă cu proteina înainte de metabolizarea ei (figura 1), odată ajunsă și inserată în membrana celulară. Deși există câteva rapoarte în ultimii cinci ani care studiază întreaga proteină și nu fragmentele ei de clivaj enzimatic (Morris JK, et al., Biochim Biophys Acta. 2014;1842(9):1340-9.) funcția ei biologică la adult este încă neelucidată.

- Investigarea proteinei se face prin metode denaturante, care izolează proteina din contextul membranelor și nu permit studii în contextul unor posibile interacțiuni homomere sau heteromere în celulă. Un manuscris recent raportează prezența tetramerilor de amiloid, dar condițiile experimentale folosite împiedică studiul oligomerilor de rang înalt (Lyros E et al., Curr Alzheimer Res. 2014;11(1):18-26.).

Majoritatea metodelor de studiu al APP se axează pe metabolizarea acesteia în fragmentele hidrofobe (peptidele A β – a căror formare este descrisă mai sus), datorită implicării acestora în patologia BA, în special a speciei A β 42. Astfel, majoritatea brevetelor adresate APP se referă la noi agenți terapeutici care împiedică, de regulă, metabolizarea patologică a proteinei prin intervenția beta-secretazei (patente nr.US20120323214A1, WO2012098461A1, US20110065696A1), la anticorpi anti-APP, folosiți ca terapie biologică (patente nr.US20110287005A1, WO2012075037A1, US20130345408A1) sau în kituri de diagnostic (patent nr.WO2003015617A2).

Diverse procedee folosesc până în prezent un sigur produs comercial pentru electroforeza nativă, reprezentat de un gel în gradient (cu concentrații fie între 3-12% acrilamidă, fie 4-16%), care poate fi achiziționat ca un kit livrat cu doi detergenți de extracție. În urma folosirii acestui kit, semnalul dat de APP la imunoblotare apare ca o *dâră* în jurul greutatei moleculare de 720 kDa. Aceasta prezintă dezavantajul unei denaturări și pierderi a unor complexe care s-ar putea regăsi în mod natural la nivelul membranelor celulare.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este păstrarea intactă a complexelor moleculare care conțin APP și separarea lor optimă, în mai multe benzi, pentru identificare ulterioară. Procedul a fost testat și este compatibil cu analiza ulterioară prin spectrometrie de masă, pentru identificarea proteinelor care fac parte din complexul macromolecular analizat.

Descrierea procedurii

În continuare este descris procedul în detaliu, iar prin:

- “Electroforeză” se înțelege migrarea unui amestec de proteine într-un mediu vâscos, sub acțiunea unui curent electric, caracterizat de un anumit amperaj fix

- “Electroforeză nativă” se înțelege separarea proteinelor în condiții speciale, nedeurante, care păstrează intacte caracteristicile proteinelor și legăturile stabilite între diversele proteine în mod fiziologic
- “Ultracentrifugare” se înțelege centrifugare la viteze foarte mari, în mod specific de 100 000 g, folosită pentru separarea membranelor celulare de restul componentelor
- “Probă ” se înțelege soluția de proteine extrase din membranele celulare, separate în prelabil prin ultracentrifugare, cu formularea de detergent specifică metodei

Conform unei variante preferate de realizare a metodei conform invenției, proba se poate obține preferențial, dar nu exclusiv din țesut cerebelos provenit de la animale de laborator (șoareci de laborator, tulpina C57Bl6). Pot fi de asemenea folosite și probe de biopsie/necropsie de la animalele mai sus menționate din alte organe interne (ficat, rinichi splină, plămân). Într-o altă variantă de realizare a metodei conform invenției, proba se poate obține din culturi celulare, cum ar fi, de exemplu, dar nu limitat la, culturi de macrofage umane non-aderente (linia 9855, ATCC). Piesa de biopsie, respectiv peletul celular se resuspendă în tamponul de separare a fracțiunilor celulare, care poate fi o formulare pe bază de 250mM sucroză sau altă variantă de tampon de separare prin ultracentrifugare. Soluția resuspendată este supusă unor centrifugări repetate la viteze din ce în ce mai mari: 700G pentru separarea fracțiunii nucleare, 10.000G pentru îndepărtarea componentelor citosolice, iar supernatantul rezultat se centrifughează 100.000G la 4°C pentru peletarea membranelor celulare. Complexele proteice se extrag din membrane folosind un tampon cu formularea specifică invenției – imidazol 50...75mM, NaCl 50 mM, acid 6-aminohexanoic 2mM, triton X-1000,5...1%, la care se adaugă 1% cocktail de inhibitori de proteaze. Proba astfel obținută se va separa în complexe proteice mari prin migrare pe gel de poliacrilamidă, cu formularea prezentată în tabelul de mai jos:

Reactiv	Volum
Tampon de gel (imidazol 25 mM, acid 6-aminohexanoic 0,5 M)	7,5 ml
Acrilamidă 37,5:1	2,5 ml
N,N,N',N'-Tetrametiletildiamină (TEMED)	7,5 μL
Amonium persulfat 10%	100μL
Volum total	10 ml

Tabelul 1. Formula de turnare a gelului de poliacrilamidă

Separarea electroforetică se realizează pe gheață, la 10 mA/gel, constant, timp de 2...4 ore, într-un tampon de migrare care se caracterizează prin aceea că are o formulare specifică, conform revedincării - 50mM tricină, 7,5 mM imidazol, ajustat la pH 8...10 cu granule de NaOH (0,8 g pentru 0,1 unități de pH). După 2...4 ore gelul se pune la transfer în același tampon ca mai sus, pe membrană de PVDF sau nitroceluloză, la 100 mA constant, timp de 20...22 ore, pe gheață.

Membrana de transfer se blochează timp de 30 de minute - 1 oră în soluție de blocare (5% soluție de albumină serică bovină sau altă formulă de soluție de blocare), apoi se incubează cu anticorpul primar dorit. Conform unei variante preferate de realizare a metodei conform invenției, anticorpul primar este un anticorp monoclonal dezvoltat în iepure anti APP, domeniul C terminal. Conform unei alte variante preferate de realizare a metodei conform invenției, acest anticorp primar este un anticorp monoclonal dezvoltat în șoarece anti domeniului N terminal al APP. Incubarea cu anticorpul primar durează minim 12 ore și este urmată de 4 spălări consecutive a câte 10 minute în TBS-Tween 20, concentrație 0,1%, iar ultima în TBS simplu. Urmează o oră de incubare în anticorp secundar cuplat cu HRP și relevare cu soluție ECL prin scanare cu scannerul cDigit.

Se poate identifica astfel preferențial, dar nu limitat la, APP în complexe proteice cu greutate moleculară mare. Alternativ, procedeul poate fi aplicată și altor proteine membranare cu punct izoelectric în domeniul acid, apropiat punctului izoelectric al APP (4,74).

Avantajul prezentei invenției este obținerea unor semnale distincte (mai mult de unul), la trei greutăți moleculare diferite, inclusiv cea obținută cu kitul comercial. Procedeul realizat conform invenției înlatură dezavantajul menționat mai sus prin aceea că permite identificarea unor noi complexe moleculare care conțin APP.

Îmbunătățirile pe care prezenta invenție le aduce față de kitul comercial deja existent sunt: menținerea APP în complexe native, așa cum se asociază la nivelul diverselor membrane celulare, asigurarea unor condiții speciale de migrare, care permit pătrunderea acestor complexe în gel și separarea lor electroforetică, urmată de evidențierea lor prin western blot.

Descrierea figurilor

Fig 1. Principalele căi de metabolizare a proteinei precursora a amiloidului (APP).

Izoformele peptidului A β (roșu) sunt principalele componente ale plăcilor de amiloid neurotoxice din creierul bolnavilor cu BA și sunt generate în urma clivajului β secretazei (dreapta). α secretaza (stânga) previne formarea lor și este considerată a avea rol protector (stânga). APPs – fragmentul extracelular, solubil, N-, C-term, domeniile amino, respectiv carboxi terminale, AICD – amiloid intracelular domain Sursa: Fita IG, Enciu AM et al., Rom J Morphol Embryol. 2011;52(3 Suppl):975-9

Fig2. Testarea diversilor detergenți și baze de tampon pentru migrarea electroforetică nativă, pe gel de agaroză de 2,5% (a), respectiv pe gel de poliacrilamidă 10% (b). Se observă facilitarea pătrunderii în gelul de agaroză a probelor tratate cu TritonX -100, indiferent de baza de tampon și precipitarea proteinelor în godeu în probele tratate cu deoxicolat de sodiu.

Fig3. Testarea diverselor concentrații de gel și pH pentru alegerea condițiilor de separare electroforetică.(a).S-au testat concentrații diferite de acrilamidă, pe care separarea proteinelor a fost documentată prin colorare cu Coomassie. Restul experimentelor sunt desfășurate pe geluri de 7.5%. (b).Pentru o cât mai bună separare țintă s-a testat influența pHului asupra separării proteinelor cu greutate moleculară mare. (c). S-a testat distribuția pe geluri cu raport diferit acrilamidă la bis-acrilamidă (37,5:1, 29:1 și 19:1), modificând și timpul de migrare (d)Creșterea timpului e migrare nu îmbunătățește separarea proteinelor cu greutate moleculară mare.

Fig4. Testarea metodei conform invenției versus metoda comercială. În partea stângă este rezultatul migrării folosind kitul comercial, în condițiile și cu detergenții și tamponurile recomandate în kit. În dreapta este testată procedeul conform invenției, folosind doi anticorpi monoclonali anti APP, unul direcționat către capul Cterminal (b), care, în condițiile noastre, detectează doar proteina întreagă și unul Nterminal (c), care poate surprinde și fragmente mari posibil agregate, din domeniul extracelular.

Fig5. Testarea stabilității complexelor proteice care conțin APP la condiții denaturante (tratament cu betamercaptoetanol și fierbere (b). Testarea distribuției complexelor macromoleculare în creierul (cortex și substanță albă), ficat, rinichi și spină (c) arată utilitatea metodei prezentate mai sus în studiul proteinei prin particularizarea distribuției ei la nivelul cortexului cerebelos.

Se dau în continuare câteva exemple de aplicare a invenției.

Exemplul 1

Testarea condițiilor de separare a proteinelor folosind parametri specifici prezentei invenții comparativ cu datele din literatură.

Material și metodă. *Animale de laborator.* S-a folosit cortex cerebelos de șoarece C57Bl6 cu vârste între 3 și 6 luni. *Lizatul de proteine.* 10 mg de țesut cerebelos a fost lizat în tampon Tris/HCl 50mM, Imidazol 75mM sau HEPES 20 mM, la care s-au adăugat pentru extracția proteinelor diverse tipuri de detergenți – Triton X-100 0,5% sau 1%, CHAPS 0,5%, 1%, 2% ± 8M uree și 4% ± 8M uree, sau sodiudeoxicolat 0,5% sau 1%. Țesutul a fost omogenizat în omogenizator Potter-Elvehjem, lăsat pe gheață 30 minute cu vortex scurt la fiecare 10 minute, apoi centrifugat 10 minute la 11.000 rpm. Supernatantul a fost recuperat și folosit la separarea electroforetică. *Electroforeza orizontală de proteine.* Fiecare probă a fost rulată inițial pe un gel orizontal de agaroză, în concentrație mică (2,5%) adusă la fierbere 1-2 minute în tampon Tris (50mM) – Glicină (192 mM). Electroforeza a fost efectuată în tampon catodic B1x (*Witting et al, Nat Prot, voll no.1 2006*), la 100 V constant, timp de 1 h. Pentru vizualizarea benzilor s-a folosit tampon de migrare colorat cu albastru Coomassie 0,5% (fig.2a). Drept control pentru evaluarea migrării s-au folosit 10 μL de soluție de anticorp policlonal (notat în fig. 2a cu Ig). Probele au fost amestecate cu soluție de încărcare preparată în laborator (5% glicerol și 1% Coomassie). *Electroforeza verticală de proteine.* S-au turnat geluri de poli(acrilamidă de 10% (5 ml acrilamida, 5 ml tampon de gel cu formula prezentată în tabelul de mai sus, 100 μL amoniu persulfat 10% și 7,5 μL TEMED) și 5% (2,5 ml acrilamida, 7,5 ml tampon de gel cu formula prezentată în tabelul de mai sus, 100 μL amoniu persulfat 10% și 7,5 μL TEMED).

Rezultate. Am testat diverse condiții de extracție a proteinelor din lizatul de cortex cerebelos de șoarece de laborator, pentru a identifica cele mai bune variante care să nu denatureze complexe mari, dar să permită separarea electroforetică. Drept standard de migrare am folosit o soluție de anticorp monoclonal, notată Ig. Am verificat migrarea la 30 de minute și 1 oră. Am eliminat astfel detergenții deoxicolatul de sodiu, deoarece se observă că nu toate proteinele sau complexe au intrat în gel nici după o oră de migrare. Deoarece gelul orizontal de agaroză nu permite transferul ulterior, iar o electroforeză verticală pe agaroză a fost practic imposibilă deoarece gelurile alunecau dintre geamuri, am trecut la geluri de poli(acrilamidă și inițial am decis testarea unui gel cu două concentrații, clasic, de 10% și 5% (asemănător celui de încărcare,

folosit la electroforeza convențională) (fig 2b). Creșterea concentrației de detergent nu îmbunătățește separarea complexelor proteice, iar adăugarea unui agent denaturant - uree, chiar la jumătate din concentrația uzuală, desface complet complexe mari (fig 2b, pozițiile 7 și 8). Pentru o mai bună separare, s-au folosit în continuare geluri de poli(acrilamidă) de 7%, rație 37,5:1 (fig 3, dreapta jos), care asigură același grad de separare ca și gelul de 5%, dar sunt mai puțin friabile și mai ușor de manipulat pentru transfer. Migrând timp de 6 ore se pierde majoritatea proteinelor din gel, față de migrarea de 3 ore, iar un pH mai crescut asigură o mai bună separare.

Concluzii. Pentru a identifica cel mai bun detergent, cea mai bună concentrație de gel și cei mai buni timpi de separare pentru identificarea optimă a APP am testat pe membrane separate din cortexul cerebelos de șoarece C57Bl6 diverse combinații de tampon de extracție, folosind trei baze diferite de tampon și trei tipuri de detergenți, fiecare în două concentrații. Acest experiment a permis alegerea detergentului de elecție – Triton X 100, care a permis cea mai bună migrare a probelor din godeuri, a timpului de migrare și a concentrației și pH-ului gelului.

Exemplul 2

Compararea rezultatelor metodei prezentei invenții cu cele obținute prin migrarea paralelă a unui gel în gradient comercial, conform specificațiilor producătorului (fig. 4).

Material și metodă. *Animale de laborator.* Într-un exemplu preferențial s-a folosit cortex cerebelos provenit de la șoareci C57Bl6 cu vârste cuprinse între 3 și 6 luni, din care s-au separat membrane celulare prin ultracentrifugare la 100.000g într-un tampon pe bază de sucroză, lizate conform prezentei invenții în tampon pe bază de imidazol cu Triton X-100 1%. În alt exemplu materialul biologic a fost obținut prin folosirea detergenților indicați în kitul comercial, cei mai folosiți și în literatură pentru electroforeză nativă: dodecil maltozid (DDM) sau digitonină în concentrație 1% în tamponul oferit de producător. În plus, s-a folosit tamponul oferit de producător pentru a încărca probe extrase cu Triton X-100 1%, ca în prezenta invenție. *Electroforeza proteinelor.* Probele au fost încărcate fie în gelul preparat conform prezentei invenții, fie în gelurile preturnate oferite de producător și migrate, în fiecare situație, conform specificațiilor – 3 ore în gel de poli(acrilamidă) 7%, pH 10 la 10 mA sau 150V, timp de 60 de minute, apoi 250V încă 30 de minute. Gelurile au fost transferate pe membrane de PVDF conform prezentei invenții și incubate cu anticorpi anti APP C-terminal (1:20.000) sau N-terminal (1:10.000), apoi anticorpi secundari corespunzători, cuplați cu HRP.

Rezultate. Protocolul indicat de producător duce la obținerea unui semnal difuz, migrat în gel, pe când folosirea TritonX-100 nu desface APP din complexe, dar nici nu facilitează intrarea în gel și migrarea în condițiile indicate (fig.4, stânga). Pregătirea probelor, migrarea și transferul lor conform indicațiilor prezentei invenții permit identificarea a cel puțin două complexe proteice de greutate moleculară mare care conțin APP, la greutăți moleculare diferite, în funcție de tipul de anticorp folosit (fig4, mijloc și dreapta).

Concluzii. Îmbunătățirile pe care prezenta invenție le aduce față de kitul comercial deja existent sunt: menținerea APP în complexe native, așa cum se asociază la nivelul diverselor membrane celulare, asigurarea unor condiții speciale de migrare, care permit pătrunderea acestor complexe în gel și separarea lor electroforetică, urmată de evidențierea lor prin western blot. **Invenția poate fi deci folosită pentru obținerea unui nou kit comercial customizat pentru studiul proteinei precursoră a amiloidului în cercetare fundamentală și clinică.**

Exemplul 3

Utilizarea metodei prezentei invenții pe diverse tipuri de preparate biologice obținute de la animale de laborator, respectiv șoareci C57Bl6.

Material și metodă. Animale de laborator. S-au folosit diverse organe recoltate de la șoareci de laborator C57Bl6, cu vârste cuprinse între 3 și 6 luni: cerebel, separat prin disecție sub lupă în cortex cerebelos și substanță albă, ficat, rinichi și splină, recoltate în azot lichid și păstrate la -80°C până la lizare. **Lizatul de proteine.** 10 mg de țesut au fost lizate în tampon de ultracentrifugare pe bază de sucroză și membranele celulare separate prin centrifugare la 100.000g. Peletul de membrane a fost resuspendat în tampon de liză 75mM imidazol, cu 1% Triton-X100, conform prezentei invenții și 1% cocktail de inhibitori de proteaze, pe gheață, 30 de minute, cu vortexare la fiecare 10 minute. **Western blot** 2 μL de probă au fost amestecați cu 2 μL de tampon de încărcare (5% glicerol și 1% PonceauRed din soluția ready-to-use comercială) și încărcăți pe geluri de 1mm, pregătite conform prezentei invenții. Electroforeza a fost rulată pe gheață, la 10 mA, timp de 3 ore, în tampon catodic B1x, fără albastru Coomassie. Transferul s-a efectuat pe membrană de PVDF (echilibrată în prealabil în metanol) peste noapte, pe gheață, la 100mA constant, în tampon catodic B 1x proaspăt. Membrana a fost blocată 1h în BSA 5% și incubată peste noapte în anticorpul primar. Ziua următoare, după îndepărtarea anticorpului primar, membrana a fost spălată în TBST 0,1% de 3 ori a câte 10 minute și o spălare în TBS 10 minute, urmate de incubare 1h în anticorp secundar corespunzător. După repetarea spălarilor de

mai sus, s-a incubat membrana în soluție de chemiluminiscență și s-a scanat cu scannerul de membrane cDigit.

Rezultate. În primul rând, am testat efectul pe care denaturarea l-ar avea asupra complexelor proteice identificate anterior. Adăugarea de DTT 2mM în probă și incubare 30 min la temperatura camerei scade semnalul, ceea ce demonstrează că doar o parte, dar nu toate legăturile proteice sunt disulfurice (fig.4a). Fierberea, chiar și un timp foarte scurt, denaturează complet complexe (fig.4b). Pentru a stabili relevanța pentru studiul APP în creier, și extinderea metodei pentru studiul patologiei BA, am comparat profilul de distribuție a APP în complexe moleculare mari între lizate de cerebel (disecat în prealabil în substanță cenușie și substanță albă), ficat, splină și rinichi.(fig.4c).

Concluzii. Am observat că profilul de separare obținut cu acest procedeu este unic pentru membranele separate din cortexul cerebelos, față de membranele obținute din ficat, splină sau rinichi, sau chiar substanța albă cerebeloasă. Procedul își dovedește utilitatea pentru studierea proteinei în contextul ei nativ, cu aplicabilitate la zone corticale vulnerabile în patologia BA, cum ar fi cortexul frontal sau hipocampusul.

REVENDICĂRI

1. Procedeu de identificare a proteinei precursoră a amiloidului în stare nativă din membrana celulară, în asociere cu alte proteine, prin separare electroforetică pe geluri de poliacrilamidă, urmată de transfer și blotare cu anticorpi specifici, **caracterizată prin aceea că** presupune extragerea complexelor proteice cu detergent Triton-X 100 în concentrație de 0,5...1% în tampon imidazol 50...75mM, ce permite separarea complexelor proteice prin electroforeză în gel de poliacrilamidă (timp de 2...4 ore, amperajul constant de 10mA/ gel, pe gheață, în tampon de electroforeză cu pH 8...10), transferate pe membrană de transfer timp de 20...22 de ore, la amperaj constant de 100 mA, pe gheață, urmată de identificarea proteinei cu anticorpi specifici.

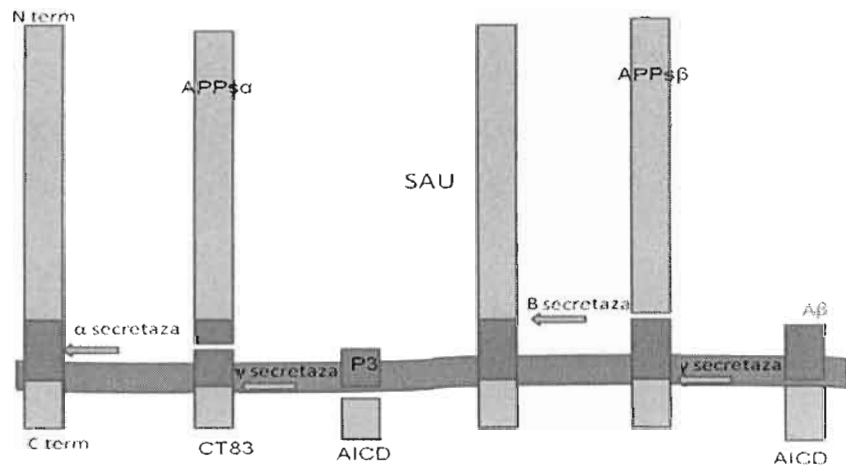
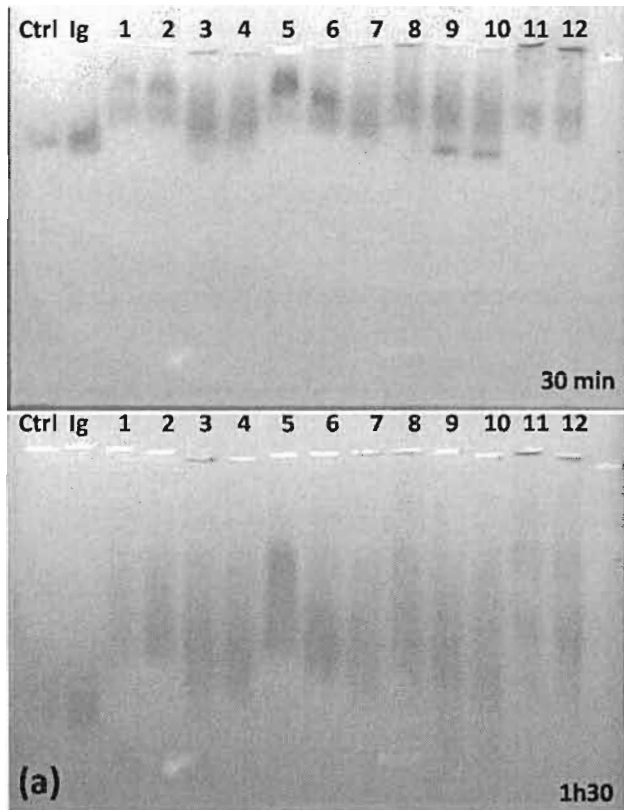
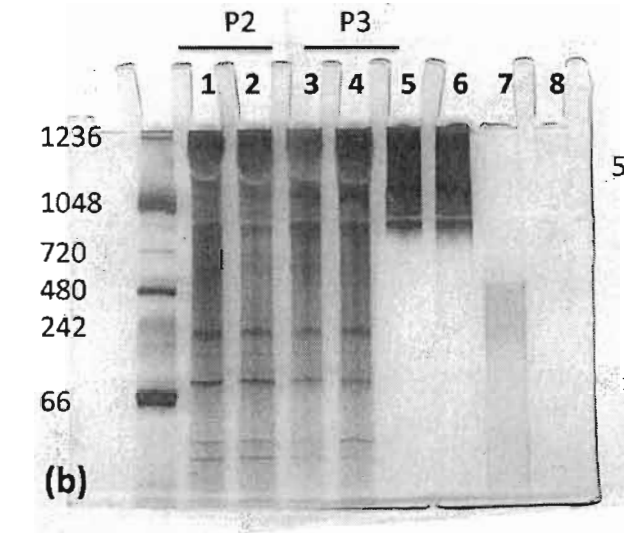


Figura 1



Legend

1. Tris/HCl/TritonX100 1%
2. Tris/HCl/TritonX100 0.5%
3. Tris/HCl/CHAPS 1%
4. Tris/HCl/CHAPS 0.5%
5. Imidazol/TritonX100 1%
6. Imidazol/TritonX100 0.5%
7. Imidazol/CHAPS 1%
8. Imidazol/CHAPS 0.5%
9. HEPES/CHAPS 1%
10. HEPES/CHAPS 0.5%
11. HEPES/NaDeoxicholate 2%
12. HEPES/NaDeoxicholate 1%



Legendă

- 1, 3-Tampon Imidazol+3% Tx100
 - 2, 4-Tampon Imidazol+1% Tx100
 - 5-Tampon Imidazol+4% CHAPS
 - 6-Tampon Imidazol+2% CHAPS
 - 7-Tampon Imidazol+4% CHAPS+urea 8M
 - 8-Tampon Imidazol+2% CHAPS+urea 8M
- P2- 4h protocol de izolare a membranelor
 P3- 1h protocol de izolare a membranelor

Figura 2

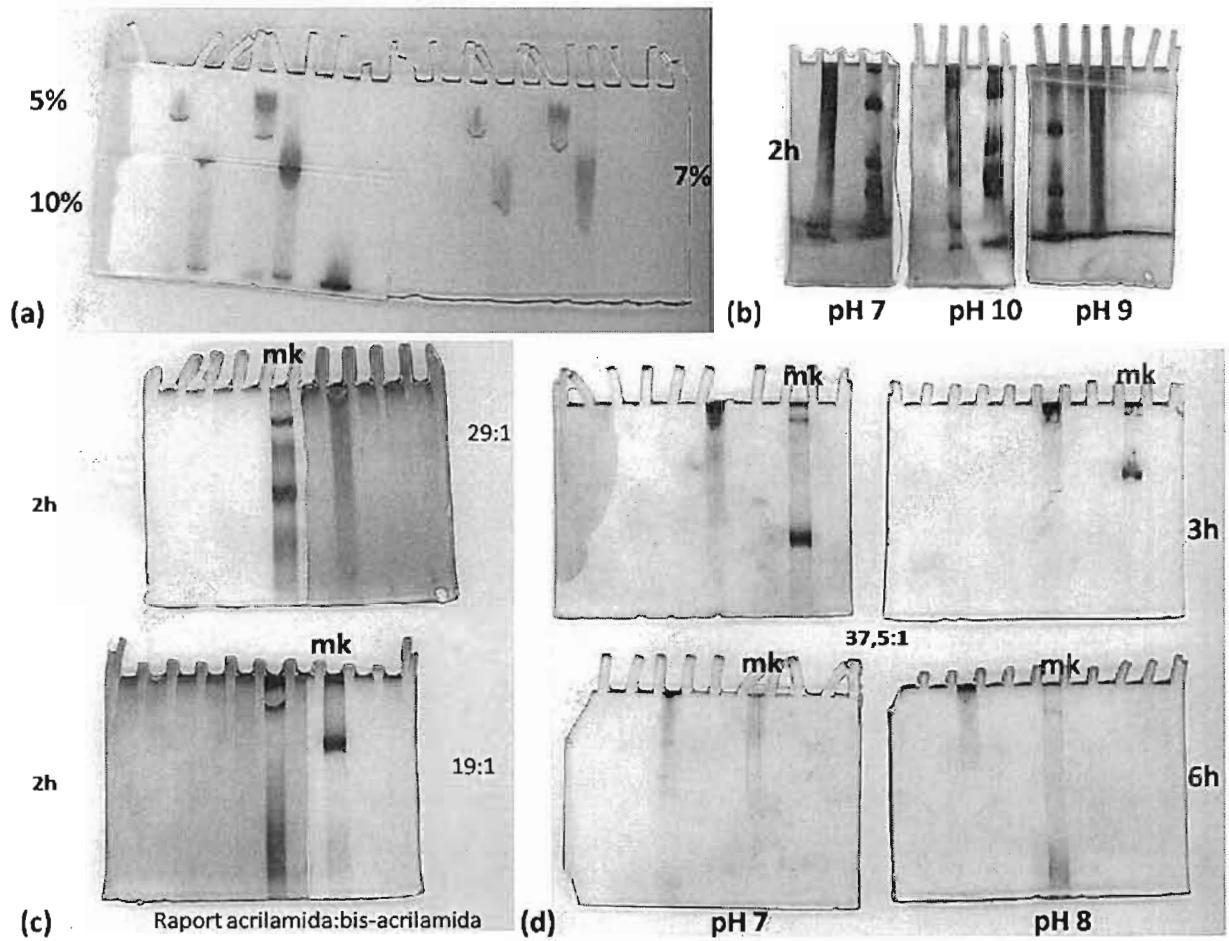


Figura 3

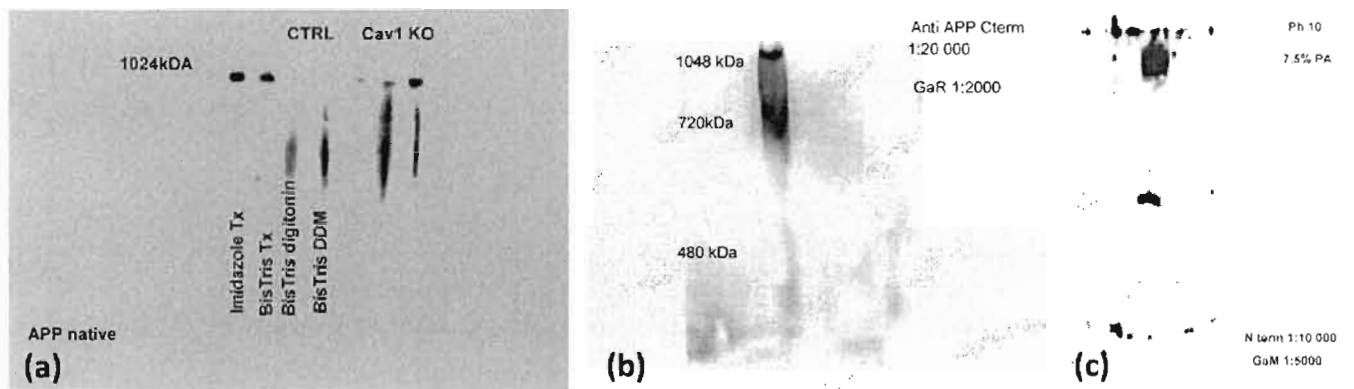


Figura4

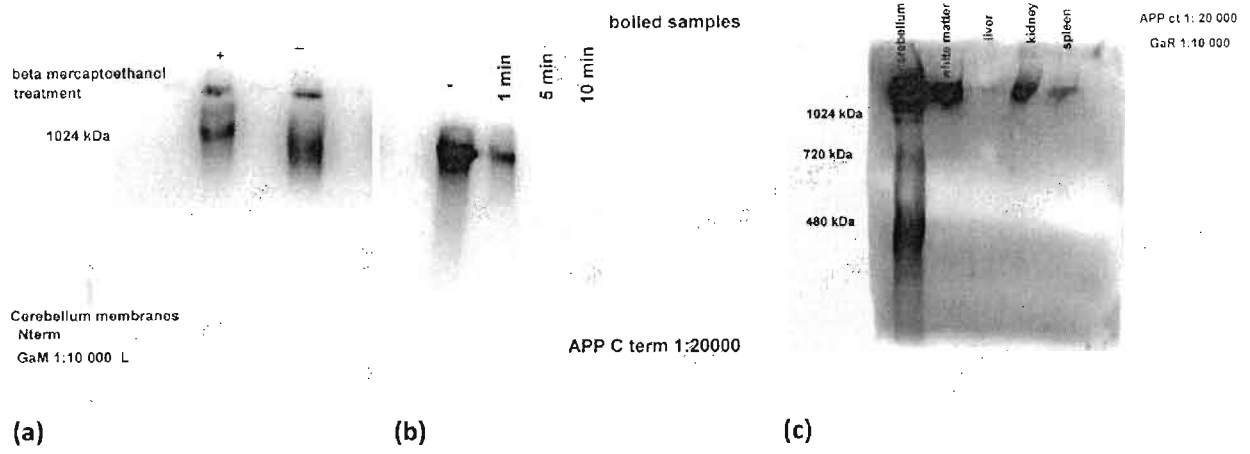


Figura5