

Δ# 447.5A3 EST 08

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**ESTUDO DAS CONSEQUÊNCIAS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS
DAS ALTERAÇÕES E277K E V295A NA PROTEÍNA HFE –
Esclarecimento da sua contribuição para o desenvolvimento de
Hemocromatose Hereditária**

Dissertação orientada por:
Doutora Maria Paula Duarte Faustino Gonçalves (Departamento de Genética, Instituto
Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge)
Prof.^a Doutora Maria do Céu Alves R. Figueiredo Correia (Departamento de Biologia
Vegetal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa)

Bruno Adriano de Sousa Silva

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR E GENÉTICA
(Biologia Molecular)

2008

Índice

I. Introdução	
I.1 – Aspectos gerais sobre o ferro	1
I.2 – Absorção e transporte do ferro	2
I.3 – Regulação do metabolismo do ferro	3
I.4 – Alterações no metabolismo do ferro	5
I.5 – A Hemocromatose Hereditária	6
I.6 – O gene <i>HFE</i>	7
II. Metodologia Experimental	
II.1 – Análise Bioinformática	13
II.2 – Construção dos Vectores de Expressão	13
II.3 – Cultura Celular	15
II.4 – Transfecção	16
II.5 – Marcação por Imunofluorescência e Microscopia Confocal	17
II.6 – Imuno-deteção por <i>Western Blot</i>	18
III. Resultados	
III.1 – Análise dos efeitos das alterações E277K e V295A a nível dos sinais exónicos promotores e inibidores de <i>splicing</i> no gene <i>HFE</i>	19
III.2 – Estudo bioinformático do impacto das alterações E277K e V295A na proteína HFE	20
III.3 – Processamento das variantes de HFE em estudo	21
III.4 – Níveis de co-localização das diferentes variantes da proteína HFE e da proteína normal com a β_2 -Microglobulina	22
III.5 – Análise de co-localização entre as diferentes formas da proteína HFE e o retículo endoplasmático	23
III.6 – Análise de co-localização entre as diferentes variantes da proteína HFE com o marcador dos endossomas precoces e de reciclagem, Tfr1	24
III.7 – Efeitos moleculares da alteração H63D na distribuição da proteína HFE	25
IV. Discussão dos Resultados	26
V. Bibliografia	29