

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FUNCIONAL DA
PROTEÍNA PRION CELULAR COM O POLIMORFISMO
N171S E A MUTAÇÃO D178N PRESENTES NO
DOMÍNIO DE LIGAÇÃO À LAMININA**

CLEITON FAGUNDES MACHADO

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre
em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Vilma Regina Martins

São Paulo

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A.C. Camargo

Machado, Cleiton Fagundes.

Determinação da atividade funcional da proteína prion celular com o polimorfismo N171S e a mutação D178N presentes no domínio de ligação à laminina / Cleiton Fagundes Machado -- São Paulo, 2007.

88p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração:

Oncologia.

Orientadora: Vilma Regina Martins

Descritores: 1. PRIONS/patogenicidade. 2. LAMININA. 3. MUTAÇÃO PONTUAL. 4. POLIMORFISMO GENÉTICO. 5. GLICOSILAÇÃO DE PROTEÍNA.

**“Quantas idas e voltas terei eu que fazer, ao longo de quantas
paredes tatearei na escuridão de minha ignorância,
até encontrar a porta que se abre
para a luz da verdade ?”**

Adaptado de Johannes Kepler, astrônomo.

DEDICATÓRIA

Nada no mundo parece ser muito justo.

Nada no mundo é tão fácil ou tão difícil quanto parece.

Nada pode ser mais assustador do que o começo.

Nada deve ser mais triste do que o final.

*Mas, absolutamente, nada é mais importante do que ter
alguém sempre ao seu lado.*

A você, Paula L. Cruz, minha cúmplice, sempre.

AGRADECIMENTOS

A Dra. Vilma Regina Martins pela oportunidade e orientação dada.

Ao Dr. Luiz Fernando Lima Reis pela excelência de nossa pós-graduação e por sua porta estar sempre aberta aos alunos.

A Dra. Ana Lúcia Cabral a quem tenho enorme admiração.

A Regina Nomizo pela amizade, pelos conselhos e puxões de orelha. Ela é um dos meus maiores exemplos de profissionalismo.

Aos amigos do BCM – Cinthia, Michele, Flavio, Tiago, Camila, Marilene, Glaucia, Pamela, Zanith, Evania e Eliane. Todos ajudaram a moldar um pouco do que sou hoje.

Aos amigos antigos do BCM – Adriana Freitas, Flávia, Angelita, Rosa, Luiz, Mônica, Carol, Tatiana, Gabriel e Fernanda. Pessoas que espero que tenham todo o sucesso do mundo em suas novas jornadas.

A Dra. Ana Paula Lepique por todo carinho no auxílio a citometria.

A pós-graduação, Ana Maria e Luciana, pelo carinho e prestatividade.

A Maria Cristina pela atenção e cuidados prestados durante todo o meu projeto.

A todos os funcionários da Biblioteca, que sempre me auxiliaram com muito carinho.

Aos demais colegas do Instituto Ludwig pelas experiências de vida.

A CAPES pela bolsa concedida.

Ao *Howard Hughes Medical Institute* pelo suporte financeiro.

A Paula L. Cruz, por tudo.

A minha família pelo carinho e compreensão.

A todos que de alguma forma contribuíram para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

A DEUS pelo Seu misericordioso amor.

RESUMO

Machado, CF. **Determinação da atividade funcional da proteína prion celular com o polimorfismo N171S e a mutação D178N presentes no domínio de ligação à laminina.** São Paulo; 2007. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

A proteína prion celular, PrP^C, tem sido relacionada com doenças que atingem animais e o homem conhecidas como encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs), ou doenças por prions. PrP^C é uma glicoproteína de superfície que está ligada à membrana plasmática por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Ela é abundantemente expressa em neurônios e células da glia e é extremamente conservada entre as espécies. Mutações no gene de PrP^C humano, *PRNP*, causam doenças por prions hereditárias como insônia familiar fatal (FFI ^{129M/178N}), e a doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD ^{129V/178N}) que estão associadas a mutação no codon 178 e ao polimorfismo no codon 129 de *PRNP*. Da mesma forma, o polimorfismo no codon 171 de *PRNP* foi associado a uma forma atípica de esquizofrenia familiar. No intuito de esclarecer o papel biológico de PrP^C, um crescente número de trabalhos vem sendo publicado associando-o a fenômenos celulares relevantes, como proteção contra estresse oxidativo, adesão neuronal e diferenciação e sobrevivência celulares. Nesse sentido, nosso grupo tem estudado e caracterizado a interação de PrP^C com importantes proteínas de matriz extracelular, laminina (Ln) e vitronectina (Vn). Essa interação está associada ao crescimento, formação e manutenção de neuritos. Interessantemente, a mutação D178N e o polimorfismo N171S estão dentro ou próximos ao domínio de ligação de PrP^C à Ln (173 a 182, em PrP^C murino). Assim, para investigar se essas modificações poderiam levar a perda de função relacionadas à interação de PrP^C-Ln, estudamos o polimorfismo N171S e a mutação D178N, associadas ou não ao polimorfismo Val. ou Met. no codon 129. Construções do gene humano de

PrP^C 129M (tipo selvagem), PrP^C 129V, PrP^C 129M/171S, PrP^C 129V/171S e PrP^C 129M/178N fusionadas a proteína fluorescente verde (GFP) foram transfectadas nas linhagens celulares de SN56, HEK e N2a, para análise de localização subcelular, padrão de glicosilação e migração celular mediada por laminina, respectivamente. Observamos um padrão de localização e glicosilação semelhantes ao da proteína tipo selvagem em todas as quimeras, mas houve uma importante inibição no estímulo de migração celular estimulado por Ln nas células transfectadas com as construções GFP- PrP^C 129M/171S, GFP- PrP^C 129V/171S, GFP- PrP^C 129M/178N. Esses resultados sugerem que modificações em PrP^C em seu sítio de interação com a Ln podem afetar a migração celular, um fenômeno importante em várias atividade biológicas.

SUMMARY

Machado, CF. **[Characterization of cellular prion protein functional activity presenting polymorphism N171S and mutation D178N inside laminin binding site]**. São Paulo; 2007. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

The cellular prion protein, PrP^C, has been implicated in a variety of human and animal illness referred to as transmissible spongiform encephalopathies, TSEs, or prion diseases. PrP^C is a glycosylated glycosylphosphatidyl inositol (GPI) anchored protein mostly expressed on the surface of neurons and glial cells. Mutations in the PrP^C gene, *PRNP*, have been reported to be associated with inherited forms of human prion diseases. A mutation at codon 178 associated to Met (methionine) at codon 129 is linked to fatal familial insomnia (FFI^{129M/178N}) whereas one type of hereditary Creutzfeldt-Jakob disease present the same mutation at codon 178 but Val (valine) at codon 129 (CJD^{129V/178N}). Additionally, a *PRNP* polymorphism at codon 171 has been associated with familial form of atypical schizophrenia. Recent studies have provided evidence that PrP^C might have physiological functions such as protection against oxidative stress, neuronal adhesion, cellular differentiation and survival. In this direction, our group have studied and characterized the interaction of PrP^C with vitronectin (Vn) and laminin (Ln), two important proteins of extracellular matrix. These interactions mediate neurite formation, outgrowth, and maintenance. Thus, alterations on the PrP^C functions may result in its loss-of-function. Interestingly, the mutation D178N and polymorphism N171S are inside or closer to the Ln binding site at the PrP^C molecule (173 to 182, in murine PrP^C). In attempt to investigate if PrP^C mutations or polymorphisms associated to inherited diseases (prion or psychiatric) interfere with its binding to Ln and consequently with biological function mediated by this ligand, we constructed PrP^C mutants (PrP^C^{171S}, PrP^C^{129V/171S} and PrP^C^{178N}) fused to green fluorescence protein. To address

that question, we analyzed the glycosylation pattern and sub-cellular localization of PrP^C in HEK and SN56 cell lines, respectively, and cell migration mediated by Ln in N2a cells. Transient transfection in SN56 and HEK cells demonstrated that all PrP^C mutant molecules were located at the cell surface and at peri-nuclear region similarly to the wild-type counterpart. We also showed the same glycosylation patterns of the PrP^C mutated molecules when compared to the wild-type protein. Clones of permanent transfected N2a cells expressing the human wild-type or the mutant/polymorphic (PrP^C 171S, PrP^C 129V/171S and PrP^C 178N) molecules were generated to evaluate cell migration mediated by laminin. Cells expressing PrP^C mutants showed an impaired migration to laminin when compared to those expressing wild-type molecules. Taken together, these data suggest that PrP^C mutation/polymorphism at the Ln binding domain cause an impairment of important cellular functions.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 1 | Esquema das diferenças entre as estruturas terciárias de PrP ^C e de PrP ^{Sc} . | 3 |
| Figura 2 | Modelo de conversão conformacional de PrP ^C à PrP ^{Sc} . | 4 |
| Figura 3 | Estrutura dos resíduos 125-231 de PrP ^C baseados em NMR (ressonância magnética nuclear) modelados com oligossacarídeos (representação compacta). | 6 |
| Figura 4 | Tráfego intracelular de PrP ^C e PrP ^{Sc} . | 8 |
| Figura 5 | Sítios de interação de PrP ^C a alguns de seus ligantes. | 15 |
| Figura 6 | Principais regiões cerebrais afetadas por TSEs. | 19 |
| Figura 7 | Principais mutações patogênicas e polimorfismos em PrP ^C humano. | 20 |
| Figura 8 | Sítios de interação de PrP ^C a seus ligantes e alterações polimórficas associadas. | 23 |
| Figura 9 | Seqüência do gene <i>PRNP</i> mostrando a região de mapeamento dos iniciadores usados para sua amplificação. | 30 |
| Figura 10 | Ilustração da técnica de PCR recombinante utilizada para a construção dos mutantes de PrP ^C . | 31 |
| Figura 11 | Plasmídeo pEGFP-C1 (BD Biosciences Clontech). | 33 |
| Figura 12 | Ensaio de citometria de fluxo usado para a seleção de células N2a expressando GFP-PrPc 129M. | 41 |
| Figura 13 | Digestão diagnóstica dos mutantes com <i>EcoRI</i> e <i>BamHI</i> para a liberação do inserto de PrP ^C . | 44 |
| Figura 14 | Eletroferogramas representativos dos seqüenciamentos dos pontos de restrição para as enzimas <i>EcoRI</i> e <i>BamHI</i> entre o vetor e o inserto de <i>PRNP</i> . | 45 |
| Figura 15 | Eletroferogramas representativos dos seqüenciamentos dos codons 129, 171 e 178. | 46 |
| Figura 16 | Células SN56 transfectadas com as diferentes construções de PrP ^C . | 49 |

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 17 | Células SN56 transfectadas com GFP-PrP ^c -129V/178N, fixadas e marcadas com DAPI. | 50 |
| Figura 18 | "Western Blot" para avaliação de PrP ^c a partir de extrato celular total de células HEK. | 51 |
| Figura 19 | Histogramas de intensidade de fluorescência para a avaliação da expressão de GFP em células N2a. | 53 |
| Figura 20 | Histogramas de intensidade de fluorescência para a avaliação da expressão de GFP em clones celulares de N2a (primeiro grupo de clones). | 54 |
| Figura 21 | Histograma de intensidade de fluorescência para a avaliação da população selecionada de GFP-PrP ^c 129M. | 55 |
| Figura 22 | Expressão total de PrP ^c do primeiro grupo de clones. | 57 |
| Figura 23 | Imagem de clones celulares de N2a vivas antes e após tratamento com cobre. | 60 |
| Figura 24 | Ensaio de migração à Ln do primeiro grupo de clones. | 62 |
| Figura 25 | Imagem representativa do ensaio de migração dos clones de células N2a. | 63 |
| Figura 26 | Histogramas de intensidade de fluorescência para a avaliação a expressão de GFP em clones celulares de N2a (segundo grupo de clones). | 64 |
| Figura 27 | Ensaio de migração à Ln do segundo grupo de clones. | 65 |
| Figura 28 | Comparação entre a migração de clones de células N2a expressando as mesmas construções de PrP ^c . | 66 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------------|---|----|
| Tabela 1 | Principais funções descritas para PrP ^C . | 10 |
| Tabela 2 | Média de intensidade de fluorescência de GFP do primeiro grupo de clones. | 56 |
| Tabela 3 | Teste K-S para determinação da diferença máxima de fluorescência entre as populações (D). | 58 |
| Tabela 4 | Média de intensidade de fluorescência de GFP do segundo grupo de clones. | 64 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------|--|
| Ala | Alanina |
| AMPC | Adenosina Monofosfato cíclico |
| Asn | Asparagina |
| Asp | Aspartato |
| BSA | Albumina Sérica Bovina |
| BSE | Encefalopatia Espongiforme Bovina |
| CJD | Doença de Creutzfeldt-Jakob |
| DAPI | 4'-6-Diamidino-2-phenylindole |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico |
| ECM | Matriz Extracelular |
| FFI | Insônia Familiar Fatal |
| GFP | <i>Green Fluorescent Protein</i> (proteína fluorescente verde) |
| GPI | Glicosil-Fosfatidil-Inositol |
| GSS | Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker |
| Hsp70 | Proteína de Choque Térmico de 70kDa |
| Hsp90 | Proteína de Choque Térmico de 90kDa |
| iCJD | Doença de Creutzfeldt-Jakob Iatrogênica |
| IDT | Integrated DNA Technologies |
| IPTG | Isopropil-beta-D-tiogalactopranosida |
| Kd | Constante de dissociação no equilíbrio |
| kDa | kiloDalton |
| LB | Meio Luria-Bertani |
| Leu | Leucina |
| Ln | Laminina |
| MAPK | Proteína Cinase Ativada por Mitógenos |
| Met | Metionina |
| NMR | Ressonância Magnética Nuclear |
| PBS | Tampão Salino Fosfatado |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |

| | |
|--------------------------|--|
| PI3K | Fosfatidil-inositol-3 cinase |
| PKA | Proteína cinase dependente de AMP cíclico |
| PKC | Proteína cinase dependente de Cálcio |
| PLC | Fosfolipase C |
| <i>Prnp</i> | Gene que codifica para a proteína prion celular em camundongos |
| <i>PRNP</i> | Gene que codifica para a proteína prion celular em humanos |
| Pro | Prolina |
| PrP^C | Proteína prion celular |
| PrP^{res} | Proteína prion resistente à proteólise limitada |
| PrP^{Sc} | Proteína prion <i>scrapie</i> |
| RE | retículo endoplasmático |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| sCJD | Doença de Creutzfeldt-Jakob Esporádica |
| SDS | Dodecil Sulfato de Sódio |
| SDS-PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS |
| SFB | Soro Fetal Bovino |
| SOD | Superóxido dismutase |
| STI1 | <i>Stress inducible protein 1</i> |
| TBS/TBST | <i>Tris Buffered Saline/ Tris Buffered Saline-Tween</i> |
| TE | Tampão Tris-EDTA |
| TSEs | Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis |
| UV | Ultravioleta |
| Val | Valina |
| vCJD | Nova variante da doença de Creutzfeldt-Jakob |
| Vn | Vitronectina |
| WB | <i>Western-Blotting</i> |
| Xgal | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosida |

ÍNDICE

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 | Proteína Prion | 1 |
| 1.2 | Funções de PrP ^C | 9 |
| 1.3 | Glicosilação de PrP ^C | 15 |
| 1.4 | Doenças humanas de Prion | 16 |
| 1.5 | Polimorfismos e mutações no gene <i>PRNP</i> | 19 |
| | | |
| 2 | OBJETIVOS | 24 |
| 2.1 | Geral | 24 |
| 2.2 | Específicos | 24 |
| | | |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 25 |
| 3.1 | Clonagem dos polimorfismos e mutações PrP ^C 129M/171S, PrP ^C 129V/171S, PrP ^C 129M/178N, PrP ^C 129V/178N, PrP ^C 129V e PrP ^C 129M (tipo selvagem) no vetor pEGFP | 25 |
| 3.2 | Transfecção das quimeras GFP- PrP ^C 129M/171S, GFP- PrP ^C 129V/171S, GFP- PrP ^C 129M/178N, GFP- PrP ^C 129V/178N, GFP- PrP ^C 129V e GFP- PrP ^C 129M em linhagens celulares | 35 |
| 3.3 | Ensaio de internalização de PrP ^C | 37 |
| 3.4 | Ensaio de Western Blot | 37 |
| 3.5 | Citometria de fluxo | 38 |
| 3.5.1 | “Cell sorting” | 40 |
| 3.6 | Ensaio de migração | 41 |
| | | |
| 4 | RESULTADOS | 43 |
| 4.1 | Clonagem dos mutantes PrP ^C C 129M/171S, PrP ^C 129V/171S, PrP ^C 129M/178N, PrP ^C 129V/178N, PrP ^C 129V e PrP ^C tipo selvagem no vetor pEGFP | 43 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.2 | Análise da distribuição subcelular das construções | 47 |
| 4.3 | Avaliação do padrão de glicosilação de GFP- PrP ^C | 50 |
| 4.4 | Clonagem celular de GFP- PrP ^C em células N2a e análise de expressão do primeiro grupo de clones | 51 |
| 4.5 | Internalização de GFP- PrP ^C mediada por cobre | 59 |
| 4.6 | Migração celular estimulada por Ln (Primeiro Grupo de Clones) | 61 |
| 4.7 | Análise de expressão de GFP- PrP ^C do segundo grupo de clones | 63 |
| 4.8 | Migração celular estimulada por Ln (Segundo grupo de clones) | 65 |
| 4.9 | Comparação estatística entre a migração do primeiro e segundo grupo de clones | 66 |
| 5 | DISCUSSÃO | 67 |
| 6 | CONCLUSÕES | 74 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 75 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 PROTEÍNA PRION

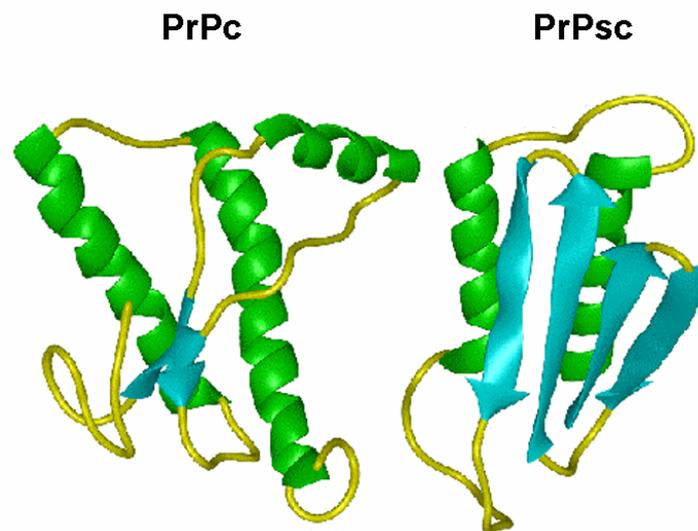
As encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs), também conhecidas como doenças por prions, são desordens neurodegenerativas fatais do sistema nervoso central (SNC) que têm atraído enorme atenção não só por suas características biológicas únicas, mas também pelo seu crescente impacto na saúde pública. Esse grupo de doenças inclui o scrapie em ovelhas, a encefalopatia espongiforme bovina (BSE) em gado; o kuru, a doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), a síndrome de Gerstmann-Sträussler-Sheinker (GSS) e a Insônia Familiar Fatal (FFI), no homem (PRUSINER 1998; AGUZZI e POLYMENIDOU 2004; KACHEL et al. 2006).

A natureza físico-química do agente causador das TSEs foi intensamente estudada e este apresentou uma resistência incomum a agentes desnaturantes de ácidos nucleicos como altas temperaturas, tratamento com formaldeído, radiações de UV e raios X, ao passo que era sensível a agentes modificadores de proteína como proteinase K, uréia, fenol e SDS. Estas observações conduziram à hipótese de que o agente poderia ser constituído unicamente de proteína, desprovido de ácidos nucleicos. Posteriormente, PRUSINER (1998) isolou o agente causador da doença de cérebros de hamsters doentes e denominou-o de "*proteinaceus*

infectious particles” ou prion, distinguindo-o de patógenos convencionais como vírus e bactérias.

A purificação da partícula infecciosa permitiu a produção de anticorpos que foram capazes de reconhecer uma proteína de 27-30 kiloDaltons (kDa) em extrato de cérebro de animais doentes e submetidos ao tratamento com proteinase K. Esta estava ausente nos extratos de animais não doentes. Curiosamente, nos extratos protéicos não submetidos à proteólise, os anticorpos reconheciam uma banda com cerca de 30-35kDa, tanto de animais infectados quanto de animais não infectados. Isto indicava que em animais sadios havia uma proteína homóloga a do agente infeccioso (OESCH et al. 1985). O seqüenciamento da região amino-terminal da molécula reconhecida por este anticorpo tornou possível a síntese de oligonucleotídeos degenerados e a clonagem de um gene que codifica esta molécula. Assim, foi encontrado o gene que codifica a proteína celular, então denominada prion celular ou PrP^C e sua isoforma infecciosa denominada prion scrapie, PrP^{Sc} (BASLER et al. 1986).

Embora tenham a mesma seqüência de aminoácidos, as proteínas PrP^C e PrP^{Sc} diferem na estrutura terciária (Figura 1), onde a isoforma normal apresenta predominantemente domínios em α -hélice e a infecciosa em folhas β -pregueada (BASLER et al. 1986). Graças as alterações nas propriedades físico-químicas de PrP^C, a partícula infecciosa apresenta-se parcialmente resistente a digestão proteolítica, insolubilidade a detergentes não iônicos e a propensão para formação de agregados e fibrilas amilóides (PRUSINER 1998).

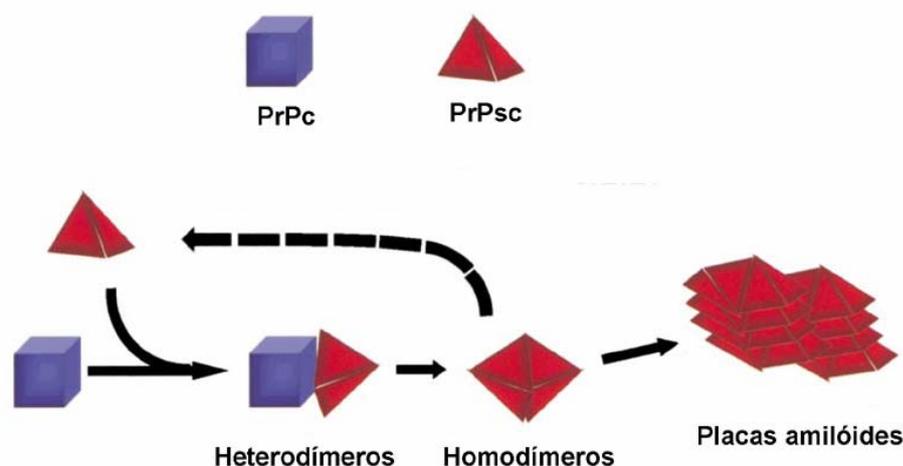


Legenda: PrP^C possui três regiões em α -hélices (verde) e duas regiões em folha β -pregueada (azul) em sua estrutura. PrP^{Sc} mostra uma maior quantidade de folhas β -pregueadas (azul) quando comparada a PrP^C.

Fonte: RSC Advancing the Chemical Sciences

Figura 1 - Esquema das diferenças entre as estruturas terciárias de PrP^C e de PrP^{Sc}.

A natureza do agente infeccioso, PrP^{Sc}, e o seu mecanismo de propagação representa um dos mais intrigantes e debatidos assuntos da biologia moderna. Várias evidências suportam a tese de que a proteína prion *scrapie* é o único componente do agente infeccioso e que este pode replicar-se na ausência de ácidos nucléicos através de conversão da isoforma normal, PrP^C, na forma infecciosa (SOTO e CASTILLA 2004). De acordo com esse modelo, novas moléculas de PrP^{Sc} seriam exponencialmente geradas a partir de PrP^C (Figura 2) levando à formação de agregados insolúveis dentro e fora das células (PRUSINER 1989).



Legenda: O redobramento ocorre da interação de PrP^{Sc} com PrP^C, sendo PrP^{Sc} um molde para a formação de novas partículas infecciosas. Isso induz a formação de agregados insolúveis levando ao acúmulo de placas amilóides e possivelmente à morte neuronal.

Fonte: Adaptado de AGUZZI e POLYMENIDOU (2004).

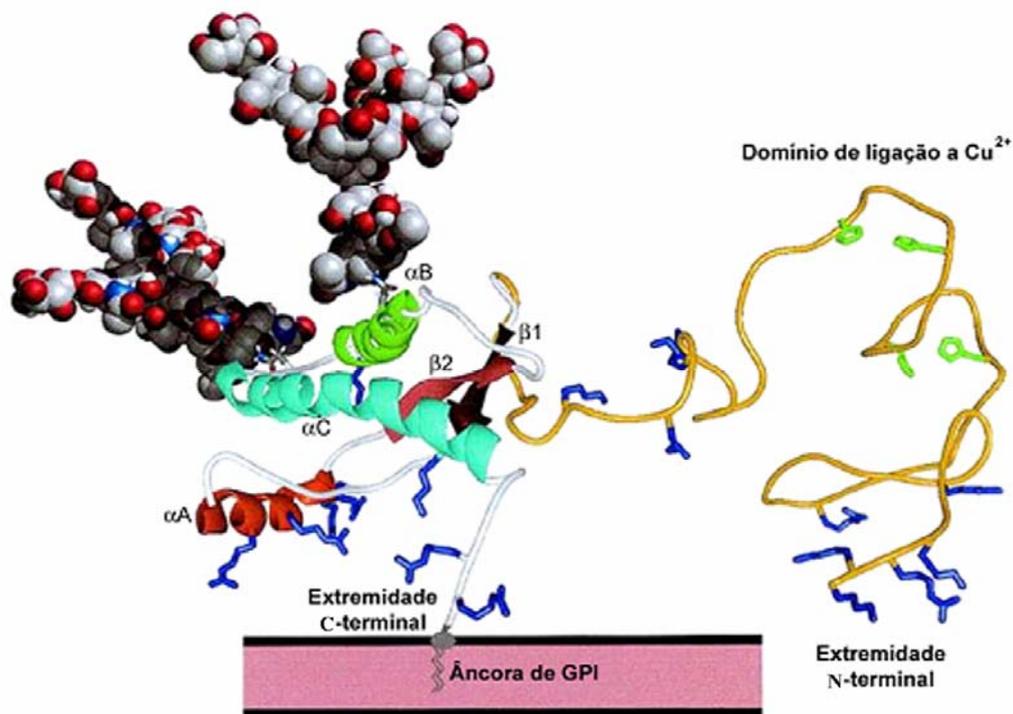
Figura 2 - Modelo de conversão conformacional de PrP^C à PrP^{Sc}.

A principal evidência da participação de PrP^C no processo infeccioso surgiu com a construção de um camundongo onde o gene *Prnp*, codificador de PrP^C em camundongos, foi deletado (BUELER et al. 1992). Esse animal mostrou-se completamente resistente à infecção por prions, o que pôde ser revertido quando o gene foi reintroduzido.

Mais recentemente, fragmentos de proteína prion murino recombinante (resíduos 89–230) produzidas em *E. coli* e polimerizadas dentro de fibrilas amilóides que representavam estruturas ricas em folhas β , induziram doença quando injetadas em camundongos transgênicos superexpressando PrP^C. O extrato do cérebro desses camundongos mostraram PrP resistente a proteinase K (PrP^{res}) por *Western Blotting*, e a inoculação desses extratos foi capaz de transmitir a doença para camundongos tipo selvagem em uma segunda passagem (LEGNAME et al.

2004). Resultados similares foram obtidos por Cláudio Soto e colaboradores (CASTILLA et al. 2005), o que fortaleceu drasticamente a hipótese de que o agente infeccioso é composto por uma única proteína.

PrP^C é sintetizado e encaminhado para o retículo endoplasmático rugoso (RE), transita pelo Golgi e é transportado até a superfície celular (HARRIS 1999). No retículo endoplasmático rugoso o peptídeo sinal N-terminal (resíduos 1-22) e o segmento hidrofóbico C-terminal (resíduos 231-253) são clivados, seguindo-se a adição de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (STAHL et al. 1987). Além disso, duas cadeias de oligossacarídeos são adicionadas nos resíduos Asn 182 e Asn 197 e uma ponte de dissulfeto é formada entre os resíduos Cys 179 e Cys 214 (CAUGHEY et al. 1989; RUDD et al. 2002). Madura, a molécula de PrP^C contém 207 resíduos e encontra-se exposta do lado de fora da célula ancorada à membrana plasmática (Figura 3) (CAUGHEY et al. 1989). Alguns trabalhos mostram que as moléculas que não estão na superfície celular concentram-se no Golgi e em endossomos (LEE et al. 2001; MAGALHAES et al. 2002).



Legenda: A porção N-terminal (resíduos 23-124) aparece como *random coil* (em amarelo) e a âncora de GPI em cinza. Estrutura secundária: hélice A (αA ; resíduos 144-156; vermelho), hélice B (αB ; resíduos 177-193; verde), hélice C (αC ; resíduos 200-223; azul claro), folhas- β $\beta 1$ (resíduos 128-131; vermelho) e $\beta 2$ (resíduos 160-164; vermelho escuro). Cadeias laterais de histidina envolvidas com a ligação de cobre são mostradas em verde. Resíduos de lisina e arginina representados como palitos em azul.

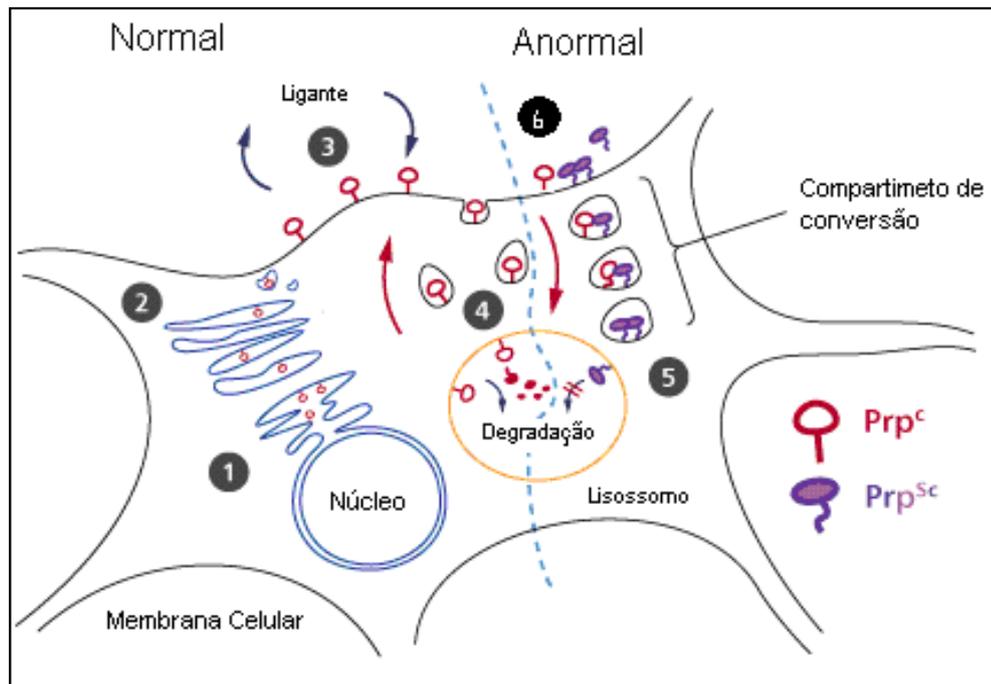
Fonte: Adaptado de BENNION e DAGGETT (2002).

Figura 3 - Estrutura dos resíduos 125-231 de PrP^C baseada em NMR (ressonância magnética nuclear) modelados com oligossacarídeos (representação compacta).

PrP^C, como as demais proteínas ancoradas a GPI, é preferencialmente encontrado em *rafts*, estruturas da membrana plasmática que são ricas em esfingolipídeos e colesterol (MADORE et al. 1999). Entretanto, a região amino terminal de PrP^C (resíduos 23-90) parece também atuar como um sítio determinante para a sua localização em *rafts* (WALMSLEY et al. 2003).

Sua internalização parece ocorrer constitutivamente, sendo que grande parte pode ser reciclada voltando novamente para a membrana plasmática (SHYNG et al. 1993). PrP^C trafega através do complexo de Golgi, membrana plasmática e endossomos de reciclagem precoces. Além disso, a dinamina, uma GTPase envolvida na excisão de vesículas endocíticas, participa nos passos iniciais da internalização de PrP^C (LEE et al. 2001).

Em relação a modelos de conversão à PrP^{Sc}, um trabalho demonstrou que a endocitose de PrP^C estimulava a formação de PrP^{Sc} nas células infectadas por prion (BERANGER et al. 2002). Em uma infecção por doenças de prion, a interação de PrP^{Sc} e PrP^C na superfície celular, possivelmente em *rafts*, cataliza a conversão. Entretanto, a conversão pode também ocorrer depois ou concomitante a endocitose desse complexo, onde a partícula infecciosa se acumularia em lisossomos (Figura 4) (HARRIS 1999).



Legenda: Em condições normais, PrP^C é sintetizado e no retículo endoplasmático sofre modificações pós-traducionais no lúmen deste (1). Após a síntese, a proteína é endereçada para a membrana plasmática atravessando o complexo de Golgi (2). Quando em contato ou não com um ligante (3) PrP^C é internalizado, e em endossomos iniciais e de reciclagem, pode trafegar através do Golgi ou ainda ser encaminhado para degradação em lisossomos (4). Em condições anormais, é sugerido que PrP^C quando em contato com PrP^{Sc} em compartimentos intracelulares (5) ou na superfície celular (6) seja convertido em PrP^{Sc} e, devido sua insolubilidade, torna-se resistente a degradação e acumula-se em agregados protéicos. O pontilhado azul separa as condições normais e anormais no diagrama acima.

Fonte: LOPES (2005a)

Figura 4 - Tráfego intracelular de PrP^C e PrP^{Sc}.

1.2 FUNÇÕES DE PrP^C

Acredita-se que o ganho de atividade neurotóxica de PrP^{Sc} contribua para a neurodegeneração nas TSEs. Entretanto, como PrP^C é extremamente conservada evolutivamente (GABRIEL et al. 1992) sugere-se que a mesma tenha função celular importante (Tabela 1). Atualmente, muitos grupos de pesquisa vem trabalhando no intuito de entender a função biológica de PrP^C, admitindo a possibilidade de que as doenças por prion possam estar também relacionadas a sua perda de função (MARTINS et al. 2002; HETZ et al. 2003).

PrP^C liga-se a íons cobre (BROWN et al. 1997; STOCKEL et al. 1998), através do domínio N-termimal (entre os resíduos 60-91 de PrP^C humano) mais especificamente na região de *octarepeat*, que consiste em 4 repetições da seqüência PHGGGWGQ (HORNSHAW et al. 1995). Na ausência de íons cobre, metade da porção amino terminal (resíduos 23-124) se encontra destruturada, com um alto grau de flexibilidade (DONNE et al. 1997; VILES et al. 2001).

Existe hoje, um grande número de trabalhos que estudam um possível papel de PrP^C no metabolismo de cobre na célula. O tratamento com íons cobre em algumas linhagens celulares provocou um rápido e reversível estímulo de endocitose de PrP^C, sendo um efeito fisiologicamente relevante que sugeriu a hipótese de PrP^C poder servir como transportador de cobre para dentro da célula (PAULY e HARRIS 1998).

Tabela 1 – Principais funções descritas para PrP^C.

| Tipo celular | Processo | Função | Mecanismos, ligantes e vias |
|--------------------------------|---------------------------------|--|--|
| Neurônio | Neuritogênese | Adesão, sinalização | Recruta NCAM nos "rafts" para permitir a ativação de Fyn-quinase, que medeia vias de sinalização intracelulares Ligação de ST11 induz a ativação de MAPK Liga a LRP/LP e HSPG em sítios distintos Liga a laminina |
| | Sinaptogênese, polarização | Sinalização | Age como fator de crescimento, ativando múltiplas vias |
| | Sobrevivência, efeitos tróficos | Anti-apoptótico | Interage com BAX, ST11 e NCAM |
| | | Pro-apoptótico | Liga ao fator anti-apoptótico Bcl-2 Ligação cruzada com anticorpo anti-PrPc Aumenta níveis de p53 |
| | Ligação a Cobre | Endocitose mediada por cobre | Induz agregamento de PrPc, sua saída dos "rafts" e endocitose dependente de clatrina |
| | | Homeostase de cobre | Mantem níveis apropriados de cobre na membrana pré-sináptica e durante condições de estresse oxidativo |
| Homeostase redox | Atividade SOD | PrPc ligado a cobre tem atividade SOD | |
| | Sinalização | Induz NAPDH-oxidase dependente de ROS através da ativação de Fyn | |
| Progenitores neurais | Neurogênese | Desconhecido | Aumenta proliferação celular em regiões neurogênicas |
| | Diferenciação | Desconhecido | Níveis de PrPc influenciam positivamente a diferenciação celular |
| Células-tronco hematopoiéticas | Renovação a longo prazo | Anti-apoptótica? Endereçamento? | Possíveis mecanismos: transduz sinais de sobrevivência celular; atividade de adesão celular direciona as células para o ambiente apropriado; ou funciona como co-receptor para hormônios, afetando a atividade das CTH |
| Células T | Ativação | Sinalização? | Regulação positiva de PrPc com ativação induzida por mitógenos |
| | Desenvolvimento | Antioxidante | Ligação a cobre no timo |
| Leucócitos | Diferenciação | Desconhecido | Expressão de PrPc em linhagens de linfócitos/monócitos |
| | Fagocitose | Desconhecido | PrPc modula fagocitose |
| | Resposta inflamatória | Endereçamento | PrPc altera o recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório |
| Astrócito | Diferenciação | Sinalização | Modulação de expressão de nestina e GFAP |
| | Sobrevivência | Sinalização | Interação com ST11 induz ativação de PKA |

Fonte: Adaptado de CAUGHEY e BARON (2006)

Animais deletados para o gene *Prnp* são mais sensíveis a radicais livres e mostram uma redução da concentração de cobre no cérebro em relação aos animais PrP^C tipo-selvagem, além de uma diminuição na

atividade de Cobre-Zinco Superóxido Dismutase (Cu/Zn SOD) (BROWN et al. 1997;1999; BROWN, 2001).

Linhagens celulares derivadas desses camundongos nocautes são mais sensíveis a apoptose quando privadas de soro (KUWAHARA et al. 1999). Por outro lado, através da técnica de microinjeção de cDNA, a expressão aumentada de PrP^C tipo-selvagem protege as células contra a apoptose induzida por altas concentrações da proteína pró-apoptótica Bax (BOUNHAR et al. 2001).

Um achado importante que aponta para funções específicas de PrP^C mostra que animais deficientes para o gene *Prnp* apresentam maior susceptibilidade a ácido caínico e outros agentes convulsivantes, quando comparados a animais tipo-selvagem (WALZ et al. 1999). Os mecanismos envolvidos neste processo ainda são desconhecidos, porém outras alterações em animais deficientes para o gene de PrP^C, como o bloqueio na inibição rápida do receptor GABA_A (ácido γ -aminobutírico tipo A) e a diminuição na potenciação de longo prazo (LTP) no hipocampo (COLLINGE et al. 1994) foram observadas. Estes dados apontam para uma maior excitabilidade neuronal presente em animais deficientes para PrP^C, sugerindo seu papel no controle da atividade neuronal.

A concentração de Ca²⁺ intracelular é um evento importante nos processos celulares. Células de animais deletados para PrP^C apresentam alteração na homeostase de Ca²⁺ e uma resposta menor a despolarização da membrana plasmática (HERMS et al. 2000). Foi ainda demonstrada uma possível influência de PrP^C na homeostase de Ca²⁺ através da observação

de que em células CHO (*Chinese Hamster Ovary Cells*), estimuladas com ATP, a presença de PrP^C aumentava a concentração de Ca²⁺ intracelular, limitava a liberação de Ca²⁺ do retículo endoplasmático e a captação do íon pela mitocôndria (BRINI et al. 2005).

PrP^C também foi descrito promovendo o recrutamento de moléculas de adesão neural (NCAM) para *rafts*, ativando Fyn cinase e promovendo crescimento neurítico (SANTUCCIONE et al. 2005).

Nosso grupo caracterizou a interação entre PrP^C e laminina (Ln), uma proteína de matriz extracelular (GRANER et al. 2000a). As lamininas compreendem uma família de macromoléculas multifuncionais compostas por três cadeias polipeptídicas: cadeia α (400KDa), cadeia β (200KDa) e cadeia γ (200KDa). Possui múltiplos domínios e são os principais componentes não colagênicos de membranas basais. Elas regulam uma variedade de fenômenos biológicos incluindo adesão, crescimento, morfologia e migração celular (OLIVEIRA et al. 2002). Também estão envolvidas em processos relacionados ao sistema nervoso, como o crescimento de neuritos, o direcionamento do cone de crescimento e a formação de sinapses (VENSTROM e REICHARDT 1993; LUCKENBILL-EDDS 1997).

A interação PrP^C-Ln é de alta afinidade e especificidade, que se dá entre um decapeptídeo da região carboxi-terminal da cadeia γ 1 de Ln (RNIAEIIKDI) (GRANER et al. 2000a) e o domínio entre os aminoácidos 173 ao 182 de PrP^C murino (COITINHO et al. 2006). A cadeia γ 1 é a mais conservada em todos os tipos de Ln (LUCKENBILL-EDDS 1997), sugerindo

que a interação PrP^C-Ln possa ser importante numa variedade de tecidos onde ambas proteínas são expressas.

Nosso grupo demonstrou que a interação PrP^C-Ln induz neuritogênese em culturas primárias de neurônios hipocampais (GRANER et al. 2000a). Na presença da Ln, neurônios de animais onde o gene *Prnp* foi removido apresentaram neuritogênese diminuída em relação aos animais tipo-selvagem. Por outro lado, quando neurônios eram plaqueados sobre o peptídeo carboxi-terminal da cadeia γ -1 de Ln, apenas aqueles provenientes de animais tipo-selvagem apresentaram neuritogênese. Isto indica que este domínio da laminina é o ligante de PrP^C responsável por desencadear a neuritogênese (GRANER et al. 2000a).

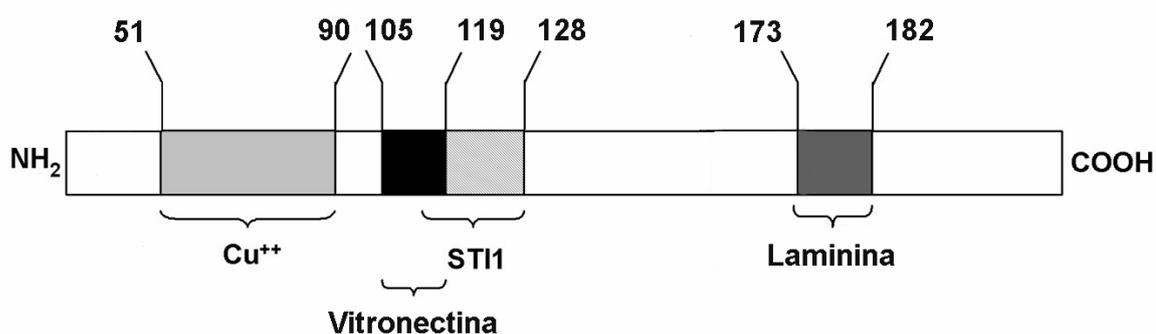
Quanto às vias de sinalização, há evidências que peptídeo γ 1 de Ln é capaz de induzir a sinalização de vias de Ca²⁺, fosfatidil-inositol-3 cinase (PI3K), proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) e de proteína cinase dependente de AMP cíclico (PKA) (BERALDO et al. em preparação).

Outras evidências apontam para o papel da interação entre PrP^C-Ln na plasticidade neuronal *in vivo*. Dados do nosso grupo mostram que o bloqueio da interação PrP^C-Ln com anticorpos específicos prejudica a consolidação da memória de duração (COITINHO et al. 2006) que é um processo cognitivo altamente dependente de plasticidade neuronal (SHORS 2004).

PrP^C também é capaz de interagir com outras proteínas da matriz extracelular, como vitronectina (Vn). Vn é uma glicoproteína expressa em diversos tecidos e está envolvida em vários processos biológicos, tais como

adesão celular, mecanismo de defesa humoral e invasão celular (PREISSNER 1991). A ligação é específica e de alta afinidade e está mapeada entre os resíduos 105 a 119 da molécula de PrP^C e nos resíduos 309-322 na molécula de Vn. Esta interação promove crescimento axonal de gânglios da raiz dorsal e diferenciação de neurônios hipocâmpais (HAJJ et al. submetido).

Outra proteína ligante de PrP^C, também caracterizada pelo nosso grupo, é a proteína STI1 ("stress inducible protein 1") (MARTINS 1999; ZANATA et al. 2002). STI1 ou Hop ("Hsp70/Hsp90 Organizing Protein") é uma co-chaperonina capaz de se associar diretamente com proteínas de choque térmico de 70 e 90 kDa (SMITH et al. 1993; SCHUMACHER et al. 1994; CHANG et al. 1997; BREDEMEYER et al. 2006). A ligação entre PrP^C e STI1 é altamente específica e se dá entre os aminoácidos 113-128 de PrP^C e entre os aminoácidos 230-245 de STI 1 (ZANATA et al. 2002). Essa interação induz sinais neuroprotetores através da via de PKA (CHIARINI et al. 2002; ZANATA et al. 2002) e promove diferenciação neuronal dependente da sinalização de MAPK (LOPES et al. 2005b).



Legenda: Cobre – resíduos 51 a 90 de PrP^C; Vitronectina – resíduos 105 a 119; ST11 – resíduos 113 a 128 e Laminina – resíduos 173 a 182.

Fonte: Adaptado de HAJJ et al. submetido.

Figura 5 - Sítios de interação de PrP^C a alguns de seus ligantes.

1.3 GLICOSILAÇÃO DE PrP^C

A glicosilação é uma característica importante da maioria das proteínas de superfície celular, incluindo PrP^C que apresenta dois sítios de *N*-glicosilação (Asn181 e Asn197, em humanos). A ligação de *N*-glicanos aos sítios potenciais é regulada pela estrutura das cadeias laterais de aminoácidos próximas à seqüência de glicosilação e o processamento adicional dos açúcares é controlado, entre outras coisas, pela estrutura tridimensional desses sítios (RUDD et al. 2002).

Ambos os sítios de *N*-glicosilação de PrP^C são variavelmente ocupados, levando a um complexo padrão de glicosilação que compreende as formas não, mono e di-glicosiladas (PAN et al. 2002; MONNET et al. 2003). O padrão de bandas em SDS-PAGE é um meio de visualizar as quantidades relativas de PrP^C di, mono e não-glicosilado. Acredita-se que os glicanos estabilizam a parte estruturada da proteína (resíduos 127-227), o

que é consistente com simulações moleculares que comprovam o efeito da glicosilação na conformação de PrP^C (WONG et al. 2000).

Atualmente pouco se sabe a respeito à função dos oligossacarídeos ligados às glicoproteínas neuronais, contudo parece bastante provável que a alteração da glicosilação de PrP^C tenha conseqüências funcionais (RUSSELAKIS-CARNEIRO et al. 2002).

1.4 DOENÇAS HUMANAS DE PRION

Aproximadamente 15% das doenças priônicas são hereditárias e são classificadas de acordo com a presença de mutações no gene *PRNP*, codificador de PrP^C em humanos, e com o fenótipo da doença (KOVACS et al. 2002).

A TSE humana mais comum é a doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), que atinge cerca de 1 em 1,5 milhões de pessoas ao ano (LADOGANA et al. 2005). Classicamente tem sido classificada como familiar (fCJD), iatrogênica (iCJD), variante (vCJD) e esporádica (sCJD) (GLATZEL et al. 2003). A forma familiar da doença é caracterizada por hereditariedade e segregação de mutações no gene *PRNP*. Os casos iatrogênicos são atribuídos a intervenções neurocirúrgicas, transplante de tecidos ou administração de hormônio de crescimento contaminado com prion (BROWN et al. 2000). Em 1996, uma nova forma de TSE humana emergiu no Reino Unido e foi assim chamada de nova variante. Evidências bioquímicas e histopatológicas sugeriram que a vCJD representa a transmissão da encefalopatia

espongiforme bovina (BSE) para humanos (AGUZZI e WEISSMANN 1996; HILL et al. 1997). A forma esporádica é assim denominada por apresentar a partícula infecciosa, mas não foi possível relacionar o desenvolvimento da doença com nenhuma das causas acima descritas.

Os sintomas mais comuns são desordens visuais, perda de memória e movimentos mioclônicos, sendo que 80% dos pacientes morrem cerca de 12 meses após o aparecimento dos primeiros sintomas, enquanto que os demais exibem um longo curso clínico (RICHARDSON, Jr. e MASTERS 1995).

A síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) é uma doença rara do sistema nervoso, autossômica dominante, caracterizada principalmente por anormalidades motoras e intelectuais. Sintomas como ataxia cerebelar, tremores severos, dificuldades de locomoção, distúrbios da fala, irritabilidade e redução da capacidade intelectual são comuns nos indivíduos portadores de GSS (BUGIANI et al. 2000). Deposição de placas amilóides de PrP^{Sc} em determinadas regiões do cérebro de pacientes é um achado constante (KITAMOTO et al. 1993). Assim como para fCJD, foram identificadas várias mutações no gene *PRNP* associadas a GSS.

A Insônia Familiar Fatal (FFI) causa distúrbios do sono, do sistema endócrino e motor. Está associada a uma mutação no códon D178N, quando no mesmo alelo de *PRNP* se encontra metionina no codon 129 (GOLDFARB et al. 1992).

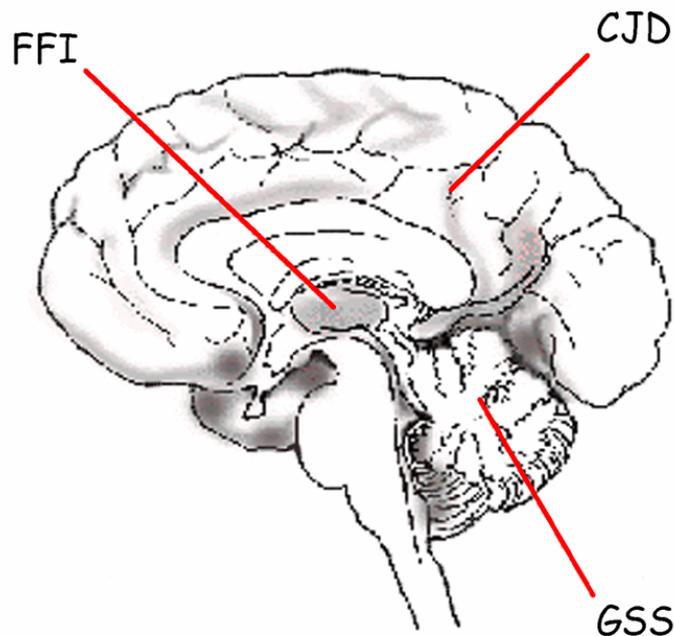
Um marcador para essa doença é a perda neuronal e astrogliose no tálamo, que está presente em todos os indivíduos com exames histológicos

detalhados, independente da duração da doença (MANETTO et al. 1992). Mais tarde foi demonstrado que a perda neuronal na FFI é causada por apoptose (DORANDEU et al. 1998).

O diagnóstico das doenças priônicas é baseado em avaliação de sintomas, sinais clínicos e vários exames auxiliares. Por um longo tempo, o eletroencefalograma foi o método de escolha para substanciar o diagnóstico, mas devido a sensibilidade deste teste ser limitada, o seu uso para esse tipo de investigação tem sido questionado (ZERR et al. 2000).

Recentemente avanços na neuroimagem, especificamente em imagem por ressonância magnética, estabeleceu padrões específicos para doenças humanas de prion (TRIBL et al. 2002). Aliado a isso, com o grande aumento do conhecimento das mutações associadas a doenças humanas de prion, o seqüenciamento do gene *PRNP* habilita a exclusão/inclusão de causas genéticas para esse tipo de enfermidade (WINDL et al. 1999).

Há também testes bioquímicos para a caracterização da presença de PrP^{res} através de digestão por proteinase K (GLATZEL et al. 2005). Investigações neuropatológicas por meio de histologia em regiões definidas no SNC e imunohistoquímica também são usadas para o diagnóstico da doença, já que o padrão de áreas cerebrais afetadas pelas doenças são normalmente distintos (Figura 6) (BUDKA et al. 1995).



Legenda: Diferentes doenças de príon afetam diferentes regiões no cérebro. As principais regiões afetadas por: CJD – córtex, GSS – cerebelo, FFI – tálamo.

Fonte: Adaptado de SCHNEIDER (2000)

Figura 6 - Principais regiões cerebrais afetadas por TSEs.

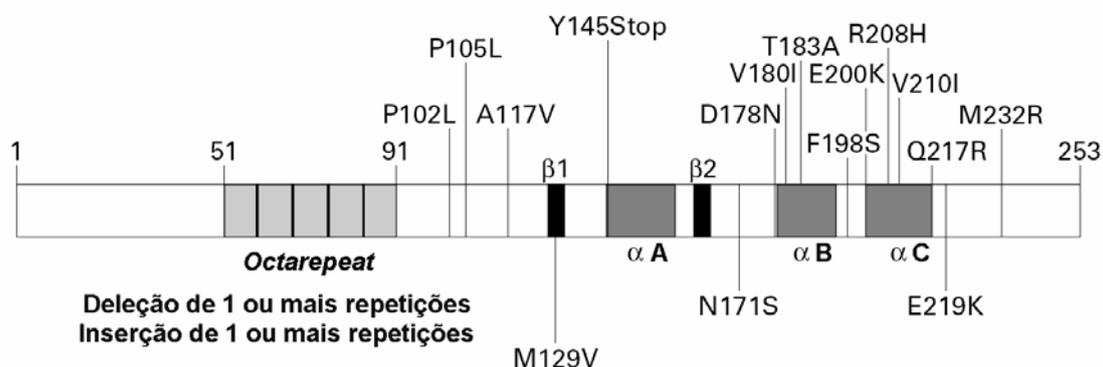
1.5 POLIMORFISMOS E MUTAÇÕES NO GENE *PRNP*

O gene *PRNP* está localizado no braço curto do cromossomo 20 (20p12.17), apresenta 3 exons, e sua fase aberta de leitura (ORF) está contida no terceiro exon (GLATZEL et al. 2005).

Postula-se que mutações pontuais associadas a doenças por príon hereditária promovam a conversão espontânea de PrP^C para PrP^{Sc} por uma diminuição da estabilidade da forma nativa de PrP^C (COHEN et al. 1994; HUANG et al. 1994). Estudos com proteínas clássicas na formação de amilóides, como presenilina 1 e 2 (associadas a doença de Alzheimer), indicam que a via de formação desses agregados envolve um dobramento parcial. Assim, na presença de mutações é possível que a maior parte das

proteínas adote uma conformação intermediária facilitando a formação de agregados (BOOTH et al. 1997; KHURANA et al. 2001; CANET et al. 2002; BERTRAM e TANZI 2005).

Atualmente são conhecidas 55 mutações patogênicas e 16 polimorfismos no gene de *PRNP* (Figura 7). Isto inclui 24 mutações “missenses” (tradução da proteína com troca de aminoácidos), 27 mutações por inserção, 2 mutações por deleção, 2 mutações “nonsense” (tradução de proteína truncada), 12 polimorfismos que não resultam em modificação do aminoácido e 4 que resultam em modificação do aminoácido (PRUSINER 1997; COLLINGE 2001; GAMBETTI et al. 2003).



Legenda: Os pontos de mutação são mostrados na parte superior da figura, os polimorfismos na parte inferior. Exceção feita à região do *octarepeat*, onde apenas 1 deleção é considerada polimorfismo, 2 ou mais deleções ou inserções estão relacionadas a doenças.

Fonte: Adaptado de JACKSON e COLLINGE (2001).

Figura 7 - Principais mutações patogênicas e polimorfismos em PrP^C humano.

O polimorfismo no codon 129 é o mais comum. Os indivíduos homocigotos M/M, V/V e heterocigotos somam 43%, 8% e 49%

respectivamente na população caucasiana (ZIMMERMANN et al. 1999). Esses valores mudam para 92%, 0% e 8% respectivamente na população japonesa e 97%, 0% e 3% respectivamente na população Chinesa (DOHURA et al. 1991; TSAI et al. 2001). O polimorfismo no codon 129 tem se mostrado de particular interesse já que em algumas doenças hereditárias priônicas, esse polimorfismo é determinante no fenótipo da doença, se localizado no mesmo alelo de um codon mutado (GOLDFARB et al. 1992).

Apesar da aparente indiferença quanto ao polimorfismo no codon 129 em afetar a estabilidade global da molécula de PrP^C tipo-selvagem (HOSSZU et al. 2004) a proteína recombinante PrP90-231 (PrP^C resíduos 90-231) contendo a mutação D178N foi fortemente influenciada pela posição 129 quanto a propensão em formar estruturas β pregueadas (APETRI et al. 2005; BARDUCCI et al. 2006).

Já foi demonstrado que algumas mutações, tais como a do codon 178, promovem diminuição da estabilidade termodinâmica de PrP^C em relação à proteína tipo selvagem (LIEMANN e GLOCKSHUBER 1999). Baseado em análise de dados de estrutura por ressonância magnética nuclear (NMR) de PrP^C murino tipo selvagem, notou-se que a Asp-178 forma uma ligação salina com a Arg-164 e uma ponte de hidrogênio com a Tyr-128, resíduo adjacente ao codon 129 (RIEK et al. 1996). Assim, a interação entre os codons 128 e 178 pode ser afetada com a mutação no codon 178, promovendo uma mudança estrutural na proteína.

Em 1997, foi demonstrado uma possível relação entre um polimorfismo raro (FINK et al. 1994) no codon 171 de *PRNP* (Asp→Ser) e

uma forma atípica de esquizofrenia familiar (SAMAIA et al. 1997), sugerindo que outras doenças neurológicas de causa desconhecida possam estar associadas à perda total ou parcial da função de PrP^C.

Embora seja bem estabelecida a localização de PrP^C na membrana plasmática, foram descritas algumas mutações capazes de alterar sua localização subcelular.

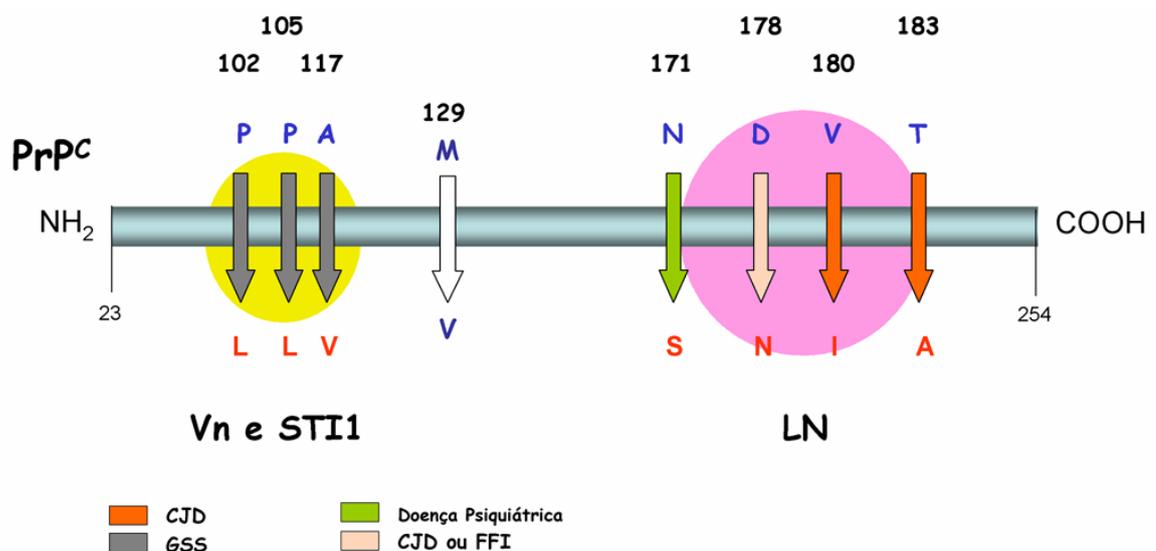
A mutação T183A causa a retenção intracelular de PrP^C, ficando esta acumulada no retículo endoplasmático (CAPELLARI et al. 2000).

Uma construção de PrP^C desprovida de parte de sua porção de ligação à âncora de GPI, ao qual esperava-se localização citoplasmática, surpreendentemente foi observada no núcleo (CROZET et al. 2006). Embora tenha sido intensamente pesquisado em PrP^C um sinal de localização nuclear (NLS), nenhum trabalho até agora foi capaz de demonstrar uma região capaz de cumprir eficientemente esse papel (PFEIFER et al. 1993; CROZET et al. 2006). Também foi observado que células N2a (neuroblastoma murino) apresentaram PrP^C no núcleo quando infectadas com PrP^{Sc} (BASLER et al. 1986).

A conversão de PrP^C à PrP^{Sc} parece envolver somente mudanças conformacionais, o que pode ocorrer através de modificações pós-traducionais ou ainda por alterações na seqüência de aminoácidos da proteína. O que desejamos questionar é a nova possibilidade dessas substituições de aminoácidos provocar prejuízos nas funções de PrP^C quando presentes em sítios de interação a seus ligantes.

O sítio de interação de PrP^C à Ln está mapeado entre os aminoácidos 173 a 182. Este domínio está próximo ao resíduo 171, cujo polimorfismo foi relacionado a doenças psiquiátricas, e ao 178, relacionado a fCJD^{129V/178N} e FFI^{129M/178N} (Figura 8). Desta forma é interessante pensar que a perda de função na interação de PrP^C-Ln possa estar relacionada aos fenótipos patológicos.

Portanto, este trabalho dedicou-se a avaliar a distribuição subcelular, o padrão de glicosilação e migração celular promovida por Ln em células expressando a molécula de PrP^C contendo o polimorfismo N171S e a mutação D178N.



Legenda: As mutações nos codons 102, 105 e 117 estão inseridas no sítio de interação de PrP^C à Vn e STI1 e estão associadas a fGSS, enquanto que o polimorfismo no codon 171 e as mutações nos codons 178, 180 e 183 estão relacionados ao sítio de interação de PrP^C à Ln e estão relacionados a FFI e fCJD.

Figura 8 – Sítios de interação de PrP^C a seus ligantes e alterações polimórficas associadas.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a influência de PrP^C com o polimorfismo N171S e a mutação D178N, associados ou não ao polimorfismo 129M ou 129V no padrão de glicosilação e distribuição subcelular de PrP^C e suas possíveis consequências na migração celular mediada por laminina.

2.2 ESPECÍFICOS

- Construção das quimeras GFP-PrP^C 129M, GFP-PrP^C 129V, GFP-PrP^C 129M/171S, GFP-PrP^C 129V/171S, GFP-PrP^C 129M/178N e GFP-PrP^C 129V/178N em fusão com a proteína fluorescente verde (GFP), em vetores de expressão para células eucarióticas;
- Análise da distribuição subcelular de cada uma das construções em comparação com GFP-PrP^C 129M (tipo-selvagem) através de microscopia confocal;
- Análise do padrão de glicosilação de PrP^C contendo essas alterações utilizando SDS-PAGE;
- Avaliação da migração celular induzida por Ln em células expressando o polimorfismo 171S e o mutante 178N em PrP^C.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CLONAGEM DOS POLIMORFISMOS E MUTAÇÕES PrP^C 129M/171S, PrP^C 129V/171S, PrP^C 129M/178N, PrP^C 129V/178N, PrP^C 129V E PrP^C 129M (TIPO SELVAGEM) NO VETOR pEGFP

a) Amplificação da seqüência nucleotídica de *PRNP*

O gene de *PRNP* foi amplificado através da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) a partir de amostras de DNA previamente obtidas de leucócitos de sangue periférico de indivíduos sem alterações no gene de PrP^C. Estes produtos foram usados como moldes para a construção dos mutantes PrP^C 129M/171S, PrP^C 129M/178N, PrP^C 129V/178N utilizando a técnica de PCR recombinante. Os *PRNPs* contendo os polimorfismos PrP^C 129V/171S e PrP^C 129V foram amplificados a partir de DNA obtido de amostras de pacientes portadores de epilepsias (WALZ et al. 2003). O uso deste material foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (processo 6949/99) e pelo Comitê de Ética do Centro de Tratamento de Pesquisa do Hospital do Câncer “Comissão de Ética em Pesquisa” (CEP) processo nº 701/05.

Para a extração de DNA, foi usado o *Kit Wizard Genomic DNA Purification*. Seguindo o protocolo do fabricante, as amostras de sangue foram homogeneizadas por 15 minutos, 3 ml de sangue foram adicionados a 9 ml de solução de lise, a amostra incubada sob agitação a temperatura

ambiente por 10 minutos, seguido de centrifugação por 10 minutos a 1700xg. O sobrenadante foi descartado e o precipitado homogeneizado vigorosamente. A seguir foram adicionados 3 ml de solução contendo Tris (hidroximetil aminoetano), etilenodiamino-tetra acético e dodecil sulfato de sódio para promover a lise nuclear e 30 µl de RNase seguidos de incubação a 37° C por 30 minutos. A amostra foi então resfriada a 4° C e 2 ml de solução de precipitação de proteínas (contendo SDS) foi adicionada e misturada vigorosamente. O material foi centrifugado (1700xg) o sobrenadante transferido para um tubo contendo 3 ml de isopropanol e misturado lentamente até a precipitação do DNA. Foi realizada uma nova centrifugação (1700xg), o sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com 3 ml de etanol 70%, seguido de uma nova centrifugação (1700xg) por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente desprezado e o DNA foi então seco por 30 minutos e ressuspensão em 100 µl de líquido de hidratação (Tris/EDTA), seguido de uma incubação a 65° C, para a completa solubilização.

Após a extração, o DNA foi dosado por absorbância a 260nm e mantido a - 20°C.

Foram utilizados *primers* (iniciadores) sintetizados baseados na seqüência de *PRNP* depositada no *GenBank* sob o número AY=008282 (NCBI) (Figura 8).

Utilizamos a técnica de PCR recombinante para a construção de PrP^C com as mutações e o polimorfismo que não foram encontradas nos DNAs dos pacientes provenientes do estudo citado acima (WALZ et al. 2003). Essa

técnica consistiu na utilização de dois iniciadores externos e iniciadores internos contendo uma base alterada codificando para a mutação de interesse (Figura 9).

Os iniciadores externos hibridam dos nucleotídeos 110 a 130 (FwPrP^C) e 785 a 805 (RvPrP^C) e contêm sítios das enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*, para que a seqüência amplificada correspondente aos codons 23 a 254 de *PRNP*, depois de digerida com as respectivas enzimas de restrição, tenha extremidades coesivas com as do vetor pEGFP.

Os iniciadores utilizados para a construção de cada um dos insertos foram:

- PrP^C 129V/171S e PrP^C 129V e PrP^C tipo selvagem –
 - *forward* (FwPrP^C):5'CAT GAA TTC T AAG AAG CGC CCG AAG CCT GGA3'
 - *reverse* (RvPrP^C):5'ACT GGA TCC TCA ACC TAC TAT CAG AAA GAT3'
- PrP^C 129M/171S –
 - forward* interno (Fw129M):5'GGC GGC TAC **ATG** CTG GGA AGT GCC3'
 - *reverse* (RvPrP^C):5'ACT GGA TCC TCA ACC TAC TAT CAG AAA GAT3'
 - *forward* (FwPrP^C):5'CAT GAA TTC T AAG AAG CGC CCG AAG CCT GGA3'
 - reverse* interno (Rv129M):5'ACT TCC CAG **CAT** GTA GCC GCC AAG3'

Essa reação utilizou o clone PrP^C129V/171S como molde. Inicialmente fizemos duas reações de PCR, uma utilizando o iniciador FwPrP^C juntamente com o Rv129M para a amplificação da primeira metade da ORF de *PRNP* e outra usando o iniciador Fw129M juntamente com o RvPrP^C para a amplificação da segunda metade da ORF de *PRNP*. Os iniciadores internos (que continham as mutações sítio específico) se sobrepõem em 7 codons, fazendo com que as fitas sintetizadas por eles sejam coesivas. A seguir, fizemos uma reação para ligar as duas metades e estendê-las. A reação de ligação e extensão das metades foi realizada sem o uso de iniciadores, pois cada metade é o próprio iniciador da outra metade em uma ciclagem contendo apenas uma desnaturação, uma hibridização e uma extensão. Logo depois, são introduzidos no sistema os iniciadores externos FwPrP^C e RvPrP^C para a amplificação da nova fita contendo a mutação desejada. A cada passo, foi feita uma eletroforese em gel de agarose 0,8% com marcador molecular de 100 pares de bases para a avaliação da amplificação da reação de PCR.

- PrP^C 129M/178N –
 - forward* interno (Fw178N):5'TTT GTA CAC AAC TGC GTC AAT ATC3'
 - *reverse* (RvPrP^C):5'ACT GGA TCC TCA ACC TAC TAT CAG AAA GAT3'
 - *forward* (FwPrP^C):5'CAT GAA TTC T AAG AAG CGC CCG AAG CCT GGA3'

-reverse interno (Rv178N):5'ATT GAC TCA **GTT** GTG CAC AAA
GTT3'

Essa reação utilizou o clone PrP^C tipo selvagem como molde. Utilizamos o iniciador FwPrP^C juntamente com o Rv178N para a amplificação da segunda metade da ORF de *PRNP* e o iniciador Fw178N juntamente com o RvPrP^C para a amplificação da primeira metade da ORF de *PRNP*. Realizamos a seguir os mesmos passos de ligação e extensão das metades.

- PrP^C 129V/178N –

-forward interno (Fw178N):5'TTT GTA CAC **AAC** TGC GTC AAT
ATC3'

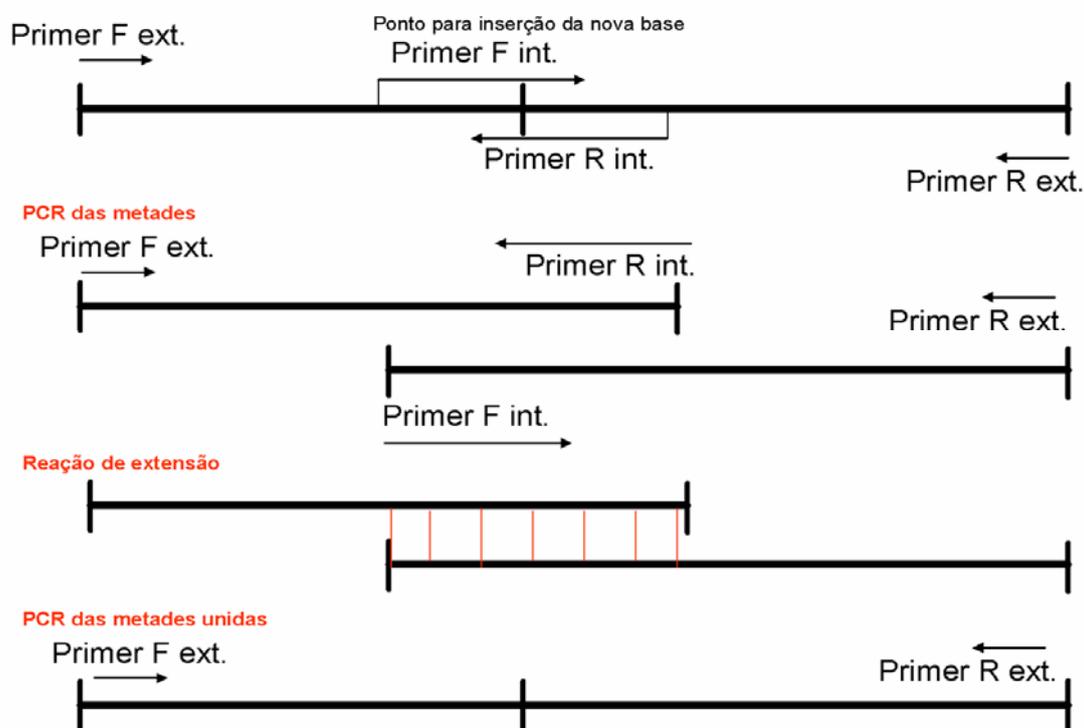
- reverse (RvPrP^C):5'ACT GGA TCC TCA ACC TAC TAT CAG AAA
GAT3'

- forward (FwPrP^C):5'CAT GAA TTC T AAG AAG CGC CCG AAG
CCT GGA3'

-reverse interno (Rv178N):5'ATT GAC TCA **GTT** GTG CAC AAA
GTT3'

Essa reação utilizou o clone PrP^C 129V como molde. Utilizamos o iniciador FwPrP^C juntamente com o Rv178N para a amplificação da segunda metade da ORF de *PRNP* e o iniciador Fw178N juntamente com o RvPrP^C para a amplificação da primeira metade da ORF de *PRNP*. Realizamos a seguir os mesmos passos de ligação e extensão das metades.

PCR recombinante



Legenda: Aqui vemos a amplificação da ORF usada como molde, o produto amplificado representando os fragmentos delimitados pelos iniciadores (metades) e a ligação dessas metades para se obter uma nova ORF, contendo a mutação desejada.

Figura 10 - Ilustração da técnica de PCR recombinante utilizada para a construção dos mutantes de PrP^C.

b) Digestão do vetor e dos insertos com enzimas de restrição

Green Fluorescent Protein (GFP) é uma proteína de 238 aminoácidos clonada a partir de água-viva *Aequorea victoria*. Essa proteína é capaz de emitir a fluorescência por si só quando excitada sob determinados comprimentos de onda sem necessidade de cofatores especiais ou um substrato permitindo seu uso como um fluoróforo funcional (CHALFIE et al., 1994). Além disso, a expressão de GFP parece ser inócua para as células.

Assim, para estudar a localização de PrP^C, construímos a proteína recombinante GFP-PrP^C.

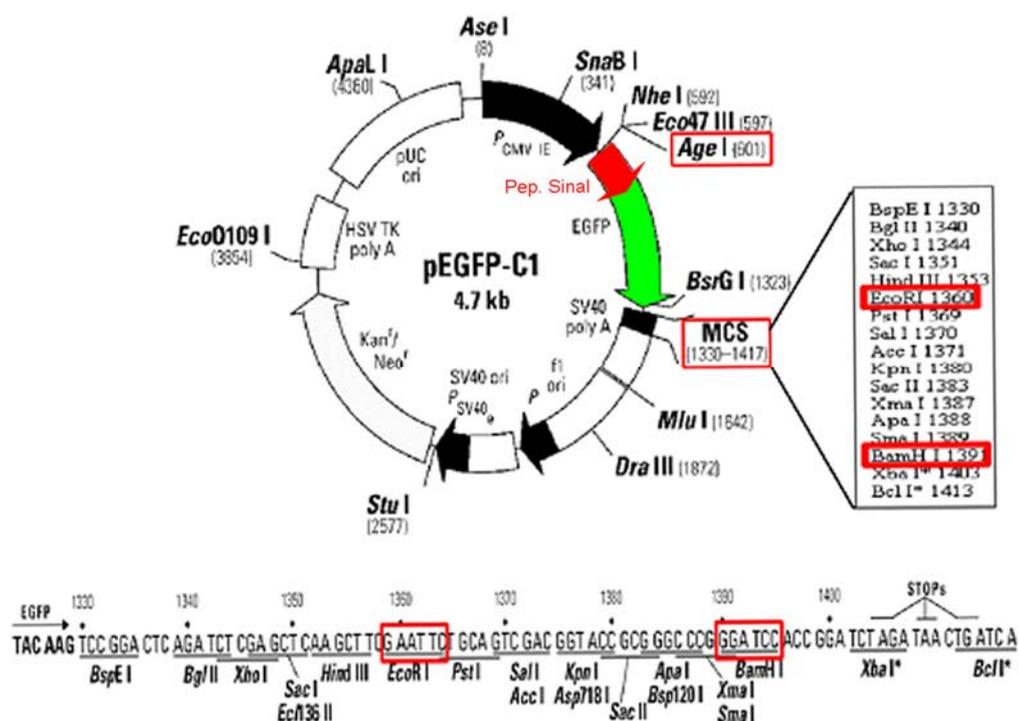
O plasmídeo pEGFP-C1 (Clontech) usado neste trabalho já continha a seqüência do peptídeo sinal de PrP^C de camundongo (1-22) no sítio *AgeI* (LEE et al., 2001). Ele foi digerido com as enzimas de restrição *BamH I* (Biolabs) e *EcoR I* (Gibco). O produto dessa digestão foi purificado com o *Kit Wizard[®] PCR Clean-Up System* utilizando o protocolo do fabricante. Para evitar o processo de reanelamento do plasmídeo vazio, o mesmo foi defosforilado em uma reação com 10 unidades da enzima CIP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, Invitrogen) em tampão fornecido pelo fabricante. A reação foi inativada a 72°C por 10 minutos e passou por um novo processo de purificação. O fragmento digerido e purificado foi então inserido no vetor através de reação de ligação.

Todos os fragmentos de DNA dos mutantes de PrP^C resultantes de reações de PCR foram também purificados com o *Kit* descrito acima e submetidos a uma digestão dupla com as enzimas *EcoRI* e *BamHI*. O produto dessa digestão sofreu então uma nova purificação com o *Kit Wizard[®] PCR Clean-Up System*.

c) Reação de ligação

Os fragmentos de DNA do gene do PrP^C (200ng) foram inseridos no vetor pEGFP-C1 (40ng), através de reação de ligação em um volume total de 20µL utilizando 200 unidades de enzima T4 ligase (Biolabs) por 16 horas a 16°C.

Pronto, o vetor apresentou a seqüência do peptídeo sinal seguida da seqüência de GFP e PrP^C. Com essa estratégia, evitamos que GFP fosse clivado de PrP^C quando o mesmo sofresse modificações pós-traducionais, especificamente a clivagem do peptídeo sinal de endereçamento ao retículo na extremidade amino-terminal ou a adição de âncora de GPI na extremidade carboxi-terminal.



Legenda: Destacam-se os sítios de restrição usados para abrir o sítio múltiplo de clonagem para inserção da seqüência do gene de PRNP (*EcoRI* e *BamHI*) e o sítio de *AgeI* onde já havia sido inserido a seqüência peptídeo sinal de PrP^C.

Fonte: Adaptado de CLONTECH (2002)

Figura 11 - Plasmídeo pEGFP-C1 (BD Biosciences Clontech).

d) Transformação dos produtos das ligações

O produto da reação de ligação foi usado para transformação em bactéria termocompetente *E. coli* cepa BL-21 (Stratagene). Essas bactérias

passaram por um tratamento que as induziu a um estado transitório de “competência”, durante o qual elas foram capazes de internalizar DNA plasmideal, que consistiu em 30 minutos de incubação a 4°C, 2 minutos a 42°C, 3 minutos a 4°C novamente e 1 hora a 37°C.

Em seguida, as bactérias foram sedimentadas através de centrifugação, ressuspensas em meio LB (1% de triptona; 0,5% de extrato de levedura; 1% de NaCl; pH 7,4) e semeadas em placas de LB-ágar (1,5% de ágar), contendo canamicina (50µg/ml). Foram coletadas algumas colônias da placa e crescidas em LB mais canamicina (50µg/ml), para posterior purificação de DNA plasmideal em pequena escala. Os plasmídeos purificados através do *kit Wizard™ Mini preps DNA Purification System* (Promega), foram digeridos com as enzimas *Bam* HI e *Eco* RI, para verificação da liberação do inserto. Os clones que apresentaram o inserto foram então seqüenciados.

e) Seqüenciamento

Para o seqüenciamento, foi utilizado o *kit Dynamic™ ET terminator cycle sequencing* (Amersham Pharmacia) e seqüenciador automático ABI Prism 377 DNA Sequencer (Perkin elmer). Nós utilizamos os mesmos iniciadores externos utilizados nas construções dos insertos.

3.2 TRANSFECCÃO DAS QUIMERAS GFP-PrP^C 129M/171S, GFP-PrP^C 129V/171S, GFP-PrP^C 129M/178N, GFP-PrP^C 129V/178N, GFP-PrP 129V E GFP-PrP^C 129M EM LINHAGENS CELULARES

Foram utilizadas várias linhagem celulares, a saber: células HEK 293 (Human Embryonic Kidney, ATCC CRL-11268TM) cultivadas em meio MEM, N2a (Neuroblastoma de camundongo, ATCC CCL-131TM) cultivadas também em meio MEM e SN56 (SN56.B5.G4, derivada da fusão de neurônios de camundongo de 21 dias pós-natal e linhagem de neuroblastoma murino N18TG2) (BLUSZTAJN et al. 1992) cultivadas em meio DMEM.

Os meios de cultura continham 10% de soro fetal bovino e as células foram mantidas em atmosfera de 5% de CO₂ à 37°C. Os meios foram trocados a cada 48 horas. Um dia antes das transfecções, as células foram plaqueadas com cerca de 60% de confluência.

O procedimento de transfecção utilizou LipofectamineTM 2000 (InvitrogenTM) conforme instruções do fabricante. Brevemente, utilizamos 2,5µg de lipofectamina e 1µg de plasmídeo em 300µl de meio sem soro para a incubação do complexo lipossomo-DNA. Depois de 20 minutos de incubação, a solução foi adicionada a placa de 35mm de diâmetro onde as células foram plaqueadas, juntamente com mais 1,5ml de meio sem soro. As células foram incubadas com essa solução por 4h a 37°C e CO₂ 5% e depois lavadas com PBS e mantidas em meio com soro.

Após a transfecção, as células N2a foram selecionadas pelo tratamento com 600µg/ml Geneticina-Gibco (G418) por pelo menos 14 dias

para que se mantivessem as células que efetivamente receberam as construções. Por sua vez, as células HEK e SN56 não foram selecionadas e os ensaios com estas linhagens foram realizados 48 a 72 horas após a transfecção.

Uma vez que PrP^C foi expresso numa quimera com GFP, as células vivas expressando pEGFP e pEGFP-PrP^C foram observadas em microscopia confocal (BioRad radiance) com microscópio Nikon TE 2000 e laser de argônio (488nm).

As culturas celulares também foram fixadas em paraformaldeído 4%, lavadas com PBS e permeabilizadas com Triton X-100 (2% em PBS) para a marcação do núcleo com DAPI (0,1µg/ml) (4'-6-Diamidino-2-phenylindole, Sigma). As imagens foram adquiridas através de microscopia confocal.

As células HEK 293, para as quais lipofectamina apresentou uma alta toxicidade, foram transfectadas pelo método de co-precipitação de fosfato de cálcio (SAMBROOK et al. 1989). Brevemente, utilizamos 12µg do plasmídeo de interesse, adicionado na superfície de 750µl de água deionizada, seguido de 250µl de solução 1M de CaCl₂ e 1000µl de solução 2X BBS (50mM BES, 250mM de NaCl e 1mM Na₂HPO₄, pH 6,95). Após 5 minutos de incubação a temperatura ambiente, foram adicionados 8 ml de meio de cultura com soro em placas de 100mm de diâmetro onde as células eram cultivadas. As células foram incubadas com a solução acima por 5 horas em estufa úmida com 3% CO₂. Após este tempo, o meio foi retirado e a placa lavada com 5ml de solução PBS (10mM de Na₂HPO₄, 150mM NaCl, pH 7,4). Novo meio de

cultura foi adicionado e a placa incubada em estufa úmida, com 5% de CO₂, por 48-72 horas.

3.3 ENSAIO DE INTERNALIZAÇÃO DE PrP^C

Células de N2a expressando as diferentes construções de PrP^C foram plaqueadas em baixa confluência. Capturamos imagens antes e após o tratamento das células vivas com 0,5mM Cu²⁺ por 10 minutos. As imagens foram capturas por microscopia confocal, utilizando um microscópio Nikon TE 2000 e laser de argônio (488nm) (BioRad radiance). Os resultados foram analisados qualitativamente através dessas imagens com o auxílio de um programa de processamento de imagem (Image J).

3.4 ENSAIO DE “WESTERN BLOT”

Culturas de células HEK transfectadas e não transfectadas, cultivadas em placas de 100mm de diâmetro e apresentando alta confluência, foram incubadas em tampão de lise (50 mM tris-HCl pH 7,5, 0,5% Triton X-100, 0,5% deoxicolato de sódio, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl). A solução foi dosada através de ensaio colorimétrico pelo reagente de Bradford. Utilizamos 40µg de proteína total para análise de cada construção. As proteínas do extrato foram separadas eletroforicamente em gel de poliacrilamida a 10% contendo SDS (SDS-PAGE), transferidas e imobilizadas em membrana de nitrocelulose (0,45µm – Amersham

Biosciences). A membrana foi bloqueada com TBST (120mM de NaCl, 20mM de Tris e 0,05% de Tween 20) contendo 5% de leite desnatado liofilizado (Molico-Nestlé). Em seguida, a membrana foi incubada com soro anti-PrP^C policlonal de camundongo M235 diluído 1:3000 em TBST. Após lavagem com TBST, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado a peroxidase diluído 1:3000. Após nova seqüência de lavagens a reação foi revelada utilizando o "kit ECL Western Blotting Analysis System" (Amersham Biosciences) seguida de exposição de um filme de raio X à membrana.

3.5 CITOMETRIA DE FLUXO

As culturas celulares foram removidas da placa de cultura por tratamento enzimático com tripsina, centrifugadas e incubadas por 30 minutos em meio completo a 37°C para a recuperação da membrana. Alíquotas de 10⁶ células de N2a foram incubadas com anticorpo monoclonal 3F4 (10ng/μl) (Abcam – reconhece PrP^C humano mas não reconhece PrP^C de camundongo), ou anticorpo policlonal M235 (1/100) (produzido em camundongos deletados para o gene de PrP^C imunizados com proteína PrP^C murina recombinante e que reconhece PrP^C murino e humano) em PBS/BSA 0,5% Azida Sódica 0,05% por 1h à 4°C. A seguir, as células foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário (anti-camundongo marcado com *phycoeritrina*, PE) em mesmo tampão, por 1h à 4°C. A leitura da fluorescência foi realizada em aparelho BD FACScan ou BD FACSCalibur

(Becton Dickinson), nos programas *Cell Lyses* ou *Cell Quest Pro*, respectivamente. Para a análise de fluorescência de GFP e de PE utilizamos laser de argônio (emissão 488nm) e detectores de 530nm (GFP) e 585nm (PE).

As populações de N2a expressando as diversas construções foram submetidas à clonagem celular por diluição limitante. Esses clones foram novamente avaliados por citometria de fluxo para depois serem submetidos a ensaios de migração.

A constatação da expressão de PrP^C em células N2a foi feita, a princípio, pela presença de fluorescência de GFP através de citometria de fluxo. Utilizamos a média geométrica da intensidade de fluorescência para avaliar a quantidade de GFP expresso em cada clone, tendo as células não transfectadas como padrão de comparação. Esse valor médio é obtido através do histograma de análise do ensaio de citometria e é calculado através da raiz quadrada do produto da emissão de cada um dos eventos analisados.

Para avaliar a expressão de PrP^C total presente na superfície da célula, o primeiro grupo de clones foi tratado com anticorpo policlonal (M235) que reconhece PrP^C murino e humano. Utilizamos os resultados de 3 ensaios independentes de citometria para PrP^C total para análise de Kolmogorov-Smirnov (teste K-S). Esse teste estatístico pode ser usado para comparações de duas curvas sobrepostas em um histograma, onde é avaliada a frequência de distribuição de pontos em cada curva, expressando um valor estatístico para a diferença máxima entre as populações (D)

expressa em porcentagem. Esses valores tiveram uma significância de $p < 0,001$.

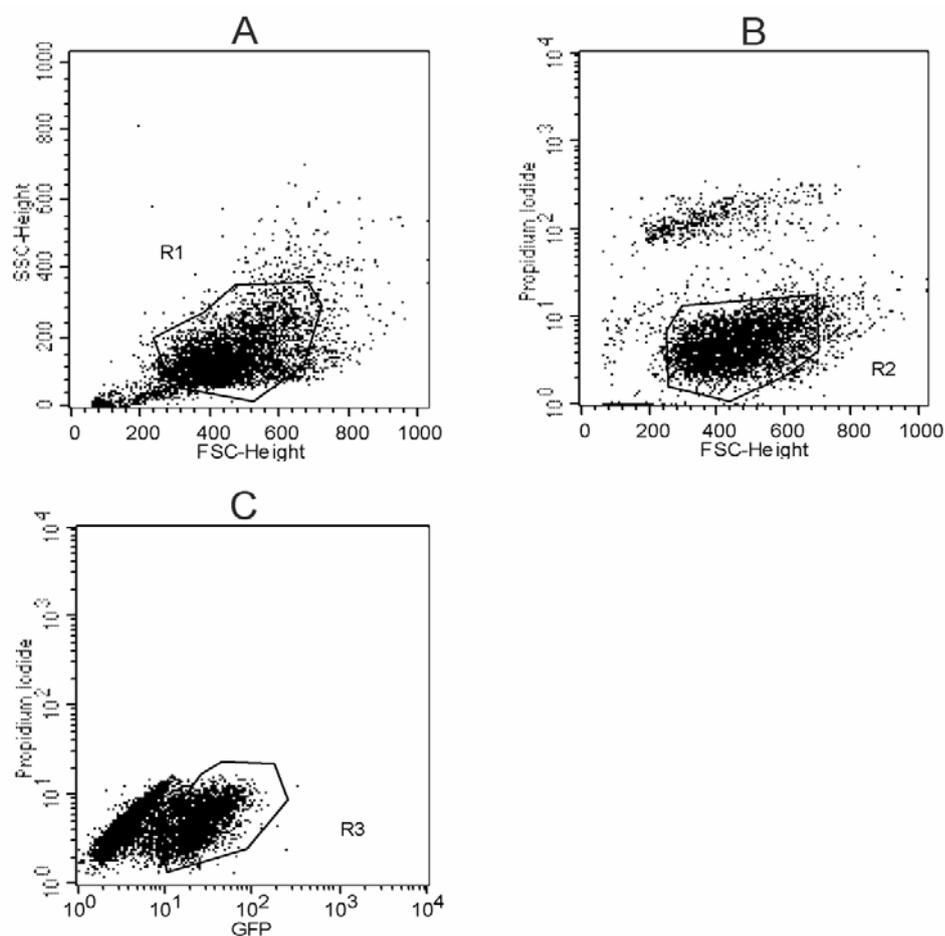
3.5.1 “CELL SORTING”

Para a população de células N2a expressando GFP-PrP^C 129M (tipo selvagem), devido a baixa eficiência de transfecção, não foi possível a obtenção de clones.

Utilizamos então a opção de selecionar uma população de GFP-PrP^C 129M positiva através do método de *cell sorting*, disponível no aparelho BD FACSCalibur.

Neste método, as células N2a transfectadas com GFP-PrP^C 129M e selecionadas com G418 por 15 dias foram incubadas com iodeto de propídeo 1 μ g/ml, um intercalante de DNA não permeável à membrana plasmática, ou seja, é internalizado somente em células não viáveis.

Na figura 11, vemos as regiões selecionadas de células de interesse. Em A, vemos a distribuição populacional de células por tamanho (eixo X) e granulosidade (eixo Y) onde excluimos possíveis fragmentos celulares e células agregadas. Em B, selecionamos as células viáveis, negativas para fluorescência de iodeto de propídeo (eixo Y). Em C, selecionamos as células com maior fluorescência de GFP.



Legenda: As regiões delimitadas pela linha preta denotam a população escolhida. A, Tamanho por granulidade; B, Tamanho por intensidade de fluorescência de iodeto de propídeo; C, intensidade de fluorescência de GFP por intensidade de fluorescência de iodeto de propídeo.

Figura 12 - Ensaio de citometria de fluxo usado para a seleção de células N2a expressando GFP-PrPc 129M.

3.6 ENSAIO DE MIGRAÇÃO

Utilizamos câmaras de *boyden* (Transwell – Corning) com membranas de 6,5 mm de diâmetro contendo poros de 8,0 μm que foram sensibilizadas com soluções de laminina (5 $\mu\text{g/ml}$) ou BSA 0,5% por 1 hora a 37°C. A

seguir, bloqueamos com uma solução de BSA 0,5% por 30 minutos a 37°C. Então, 2×10^5 células foram adicionadas a cada câmara de *boyden*. Deixamos a placa por 6 horas em estufa com atmosfera constante de 5% de CO₂ a 37°C. Após esse período lavamos os poços com PBS, fixamos as células com formaldeído (4%) e coramos com intercalante de DNA 0,1µg/ml DAPI.

As células que não migraram ficaram na parte superior da membrana e foram removidas pela limpeza desta superfície, aquelas que migraram passaram para parte inferior da membrana e não foram removidas.

As membranas foram observadas sob microscópio Olympus IX70 equipado com epifluorescência. As imagens foram adquiridas e o número de células por campo foi determinado com o auxílio de um programa de processamento de imagem.

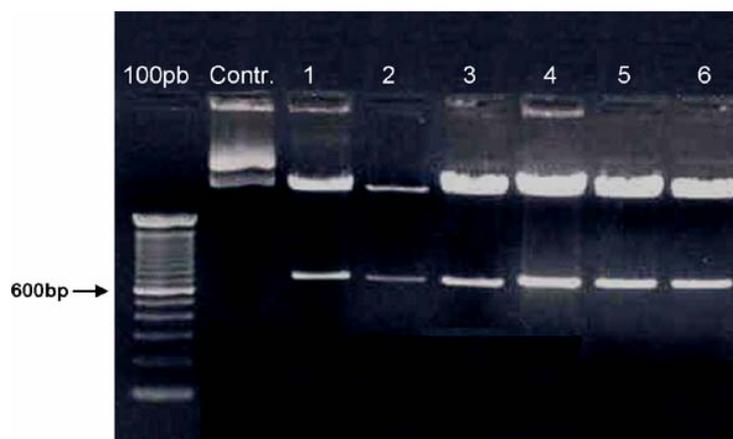
Os valores foram normalizados em relação à migração das células N2a transfectadas com o vetor vazio e as análises estatísticas foram feitas através da análise de variância (ANOVA) e teste de comparações múltiplas Tukey-HSD para a comparação entre clones com diferentes construções. Foi considerada diferença estatisticamente significativa quando $p < 0,05$ em relação à média de migração das células transfectadas com GFP-PrP^C tipo selvagem. Usamos o teste não-paramétrico de Mann-Whitney para comparação entre clones com as mesmas construções de PrP^C.

4 RESULTADOS

4.1 CLONAGEM DOS MUTANTES PrP^C 129M/171S, PrP^C 129V/171S, PrP^C 129M/178N, PrP^C 129V/178N, PrP^C 129V E PrP^C TIPO SELVAGEM NO VETOR pEGFP

Antes do seqüenciamento, todas as construções foram testadas em uma reação de digestão diagnóstica, onde digerimos os plasmídeos com *EcoRI* e *BamHI* e observamos se o inserto era liberado, desta maneira, podemos avaliar se o inserto está corretamente inserido no vetor. Foi levado em consideração o tamanho do plasmídeo sozinho (4.7 Kb) e do inserto (0.8Kb).

Todos os clones apresentaram a liberação do inserto após a digestão, como mostrado na figura 12, nos permitindo partir para o próximo passo, o seqüenciamento de cada um deles.



Legenda: 100pb (marcador molecular de 100 pares de bases); Contr. (Vetor não digerido); 1 (GFP-PrP^C tipo selvagem); 2 (GFP-PrP^C 129V); 3 (GFP-PrP^C 129M/171S); 4 (GFP-PrP^C 129V/171S); 5 (GFP-PrP^C 129M/178N); 6 (GFP-PrP^C 129V/178N).

Figura 13 - Digestão diagnóstica dos mutantes com *EcoRI* e *BamHI* para a liberação do inserto de PrP^C.

Em cada construção verificamos a seqüência correta dos sítios de restrição, a direção do inserto no plamídeo e sua correta inserção, de modo que a ligação no vetor não causasse mudanças na leitura das trincas de bases no inserto.

Comparando o mapa do vetor com os seqüenciamentos dos pontos onde o inserto de *PRNP* clonado foi inserido em pEGFP (Figura 10), vemos o correto posicionamento dos sítios de restrição das enzimas *EcoRI* e *BamHI*, confirmando o resultado encontrado na reação de digestão diagnóstica.

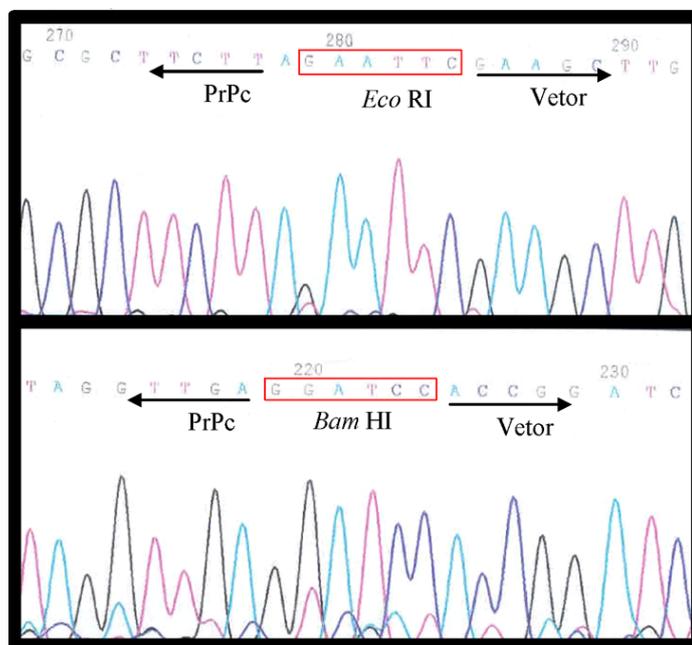
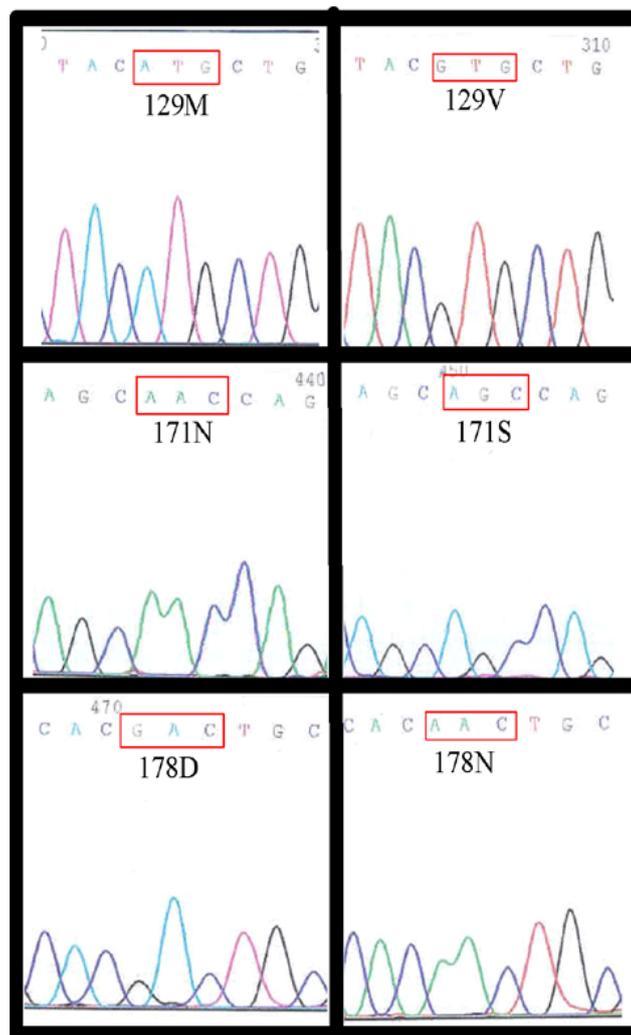


Figura 14 - Eletroferogramas representativos dos seqüenciamentos dos pontos de restrição para as enzimas *EcoRI* e *BamHI* entre o vetor e o inserto de *PRNP*.

Também verificou-se o seqüenciamento quanto à presença dos mutantes desejados e quanto à integridade do restante da seqüência.

Nossos mutantes não apresentaram erros adicionais em suas bases. Observamos a presença das mutações e dos polimorfismos desejados, como mostra a figura 14, onde vemos a correta mudança dos nucleotídeos, representados nos codons 129M como -ATG-, 129V como -GTG-, 171N - AAC-, 171S -AGC-, 178D -GAC- e 178N -AAC-.



Legenda: Os quadros a esquerda mostram a seqüência mais comum encontrada na população; os quadros a direita mostram os respectivos polimorfismos ou mutações que ocorrem nesses codons e que foram clonados.

Figura 15 - Eletroferogramas representativos dos seqüenciamentos dos codons 129, 171 e 178.

4.2 ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO SUBCELULAR DAS CONSTRUÇÕES

Transfectamos células SN56 com as diferentes construções para avaliação da localização subcelular das proteínas mutantes, utilizando microscopia confocal.

O uso da microscopia de confocal é uma ferramenta valiosa na obtenção de imagens com alta resolução e na reconstrução tridimensional de uma variedade de amostras biológicas. A fina espessura do campo de varredura permite que a informação seja coletada a partir de uma seção ótica bem definida, eliminando a fluorescência fora de foco e resultando em um aumento no contraste e na intensidade do sinal detectado.

A soma do uso de GFP e de microscopia confocal trouxe a possibilidade de observar as células vivas, sem fixação ou artefatos de seccionamento físico.

A linhagem SN56 é muito usada em ensaios de localização subcelular por suas características morfológicas. Para o uso em nosso trabalho, também foi considerado o fato de ser oriunda de células de origem neuronal.

As células foram plaqueadas em lamínulas e visualizadas vivas ou fixadas em paraformaldeído 4% em PBS e coradas com intercalante de DNA 0,1µg/ml DAPI.

Como podemos ver na figura 15, o padrão de distribuição de GFP apresenta-se difuso em todo o citoplasma, como é esperado. As células transfectadas com GFP-PrP^C tipo selvagem (GFP-PrP^C 129M) e as quimeras

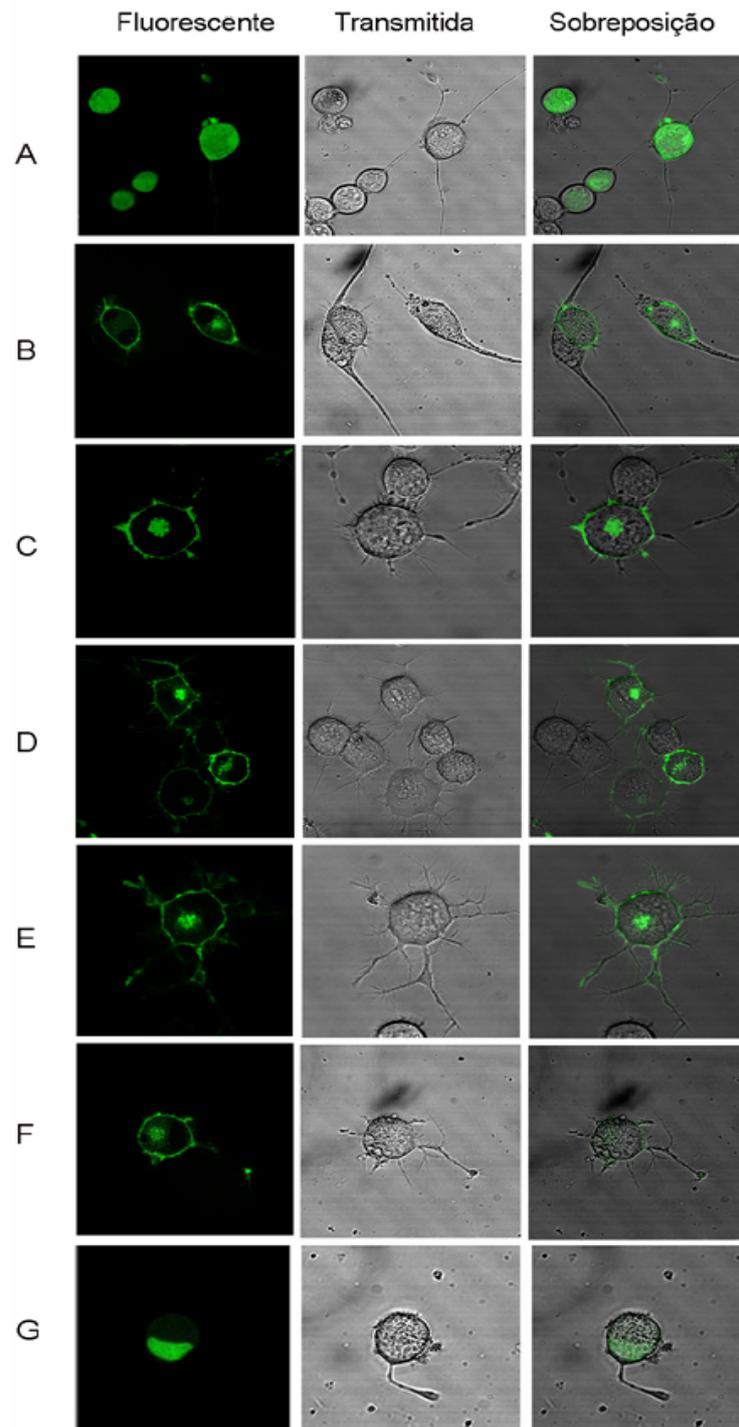
GFP-PrP^C 129V, GFP-PrP^C 129M/171S, GFP-PrP^C 129V/171S e GFP-PrP^C 129M/178N mostraram um padrão de distribuição predominantemente na membrana plasmática e no complexo de Golgi.

Já foi descrito na literatura que PrP^C cicla entre a membrana e o Golgi (LEE et al., 2001) e que mutações em alguns domínios podem interferir nesta dinâmica. Assim, podemos concluir que nossa construção GFP-PrP^C 129M está sendo corretamente distribuída na célula. Além disso, os polimorfismos GFP-PrP^C 129V, GFP-PrP^C 129M/171S, GFP-PrP^C 129V/171S e a mutação GFP-PrP^C 129M/178N não interferiram nesta dinâmica.

Estranhamente encontramos uma alteração drástica na distribuição de GFP-PrP^C 129V/178N, que se acumulou no núcleo das células (Figura 15G).

Replaqueamos as células SN56 transfectadas com esse vetor e coramos o núcleo com DAPI, confirmando o resultado anterior (Figura 16).

Decidimos então ressequenciar o inserto de PrP^C 129V/178N no vetor pEGFP e o seu peptídeo sinal. Essa construção mostrava a inserção do inserto de PrP^C 129V/178N corretamente, mas não apresentava o peptídeo sinal, que deveria estar inserido antes da seqüência de GFP. Devido à necessidade de síntese de novos iniciadores para o peptídeo sinal e a vários passos de seqüenciamento, acabamos não repetindo os ensaios com uma nova construção. Entretanto, utilizamos o plasmídeo sem a presença do peptídeo sinal durante o desenvolvimento do trabalho como um controle para os ensaios de avaliação da glicosilação e migração das construções.



Legenda: A, GFP vetor vazio; B, GFP-PrP^C 129M; C, GFP-PrP^C 129V; D, GFP-PrP^C 129M/171S; E, GFP-PrP^C 129V/171S; F, GFP-PrP^C 129M/178N e G, GFP-PrP^C 129V/178N.

Figura 16 - Células SN56 transfectadas com as diferentes construções de PrP^C.

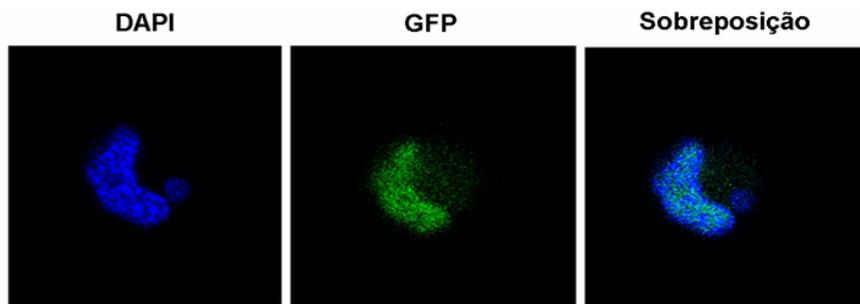


Figura 17 - Células SN56 transfectadas com GFP-PrP^C-129V/178N, fixadas e marcadas com DAPI.

4.3 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE GLICOSILAÇÃO DE GFP-PrP^C

Nosso próximo passo foi transfectar células HEK 293 com as diferentes construções e avaliar o padrão de glicosilação através de SDS-PAGE e Western Blot.

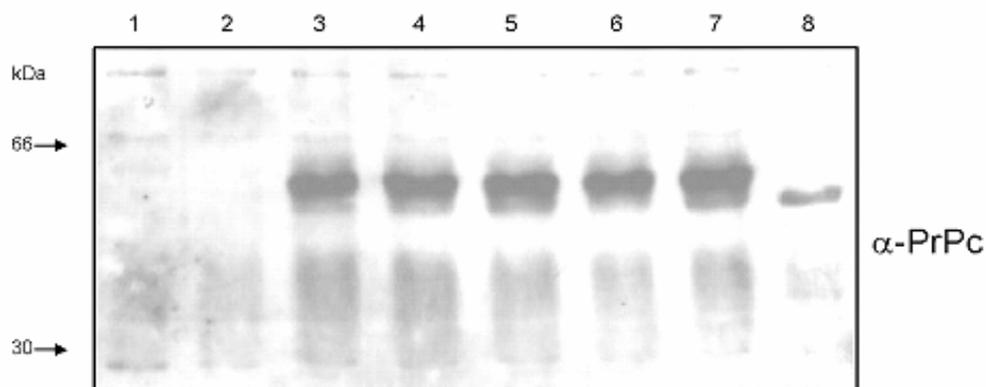
Optamos por transfectar células HEK porque são de origem humana, facilmente cultiváveis, apresentam expressão baixa de PrP^C endógeno e apresentam alta eficiência de transfecção.

PrP^C endógeno, pouco visualizado neste ensaio devido sua baixa expressão em células HEK (Figura 17), encontra-se próximo a altura de 30kDa. Já as células transfectadas apresentam também uma banda próxima a altura de 60 kDa, tamanho esperado para a quimera GFP-PrP^C.

A separação por SDS-PAGE de GFP-PrP^C resultou no aparecimento de uma grande banda, correspondendo às formas diglicosiladas, monoglicosiladas e não-glicosiladas.

Observamos o padrão de glicosilação normal para todos os mutantes exceto para o GFP-PrP^C 129V/178N, mutante que localiza-se no núcleo. No

mutante GFP-PrP^C 129V/178N, vemos uma banda menor e mais baixa, que corresponde a forma não glicosilada de PrP^C, resultado esperado para a proteína que não é encaminhada para o retículo endoplasmático (RE).



Legenda: Na linha 1 temos o extrato de HEK não transfectada; na linha 2, HEK transfectada com pEGFP vetor vazio; na linha 3, pEGFP-PrP^C 129M; linha 4, pEGFP-PrP^C 129V; linha 5, pEGFP-PrP^C 129M/171S; linha 6, pEGFP-PrP^C 129V/171S; linha 7, pEGFP-PrP^C 129M/178N e linha 8, pEGFP-PrP^C 129V/178N.

Figura 18 - "Western Blot" para avaliação de PrP^C a partir de extrato celular total de células HEK.

4.4 CLONAGEM CELULAR DE GFP-PrP^C EM CÉLULAS N2A E ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO PRIMEIRO GRUPO DE CLONES

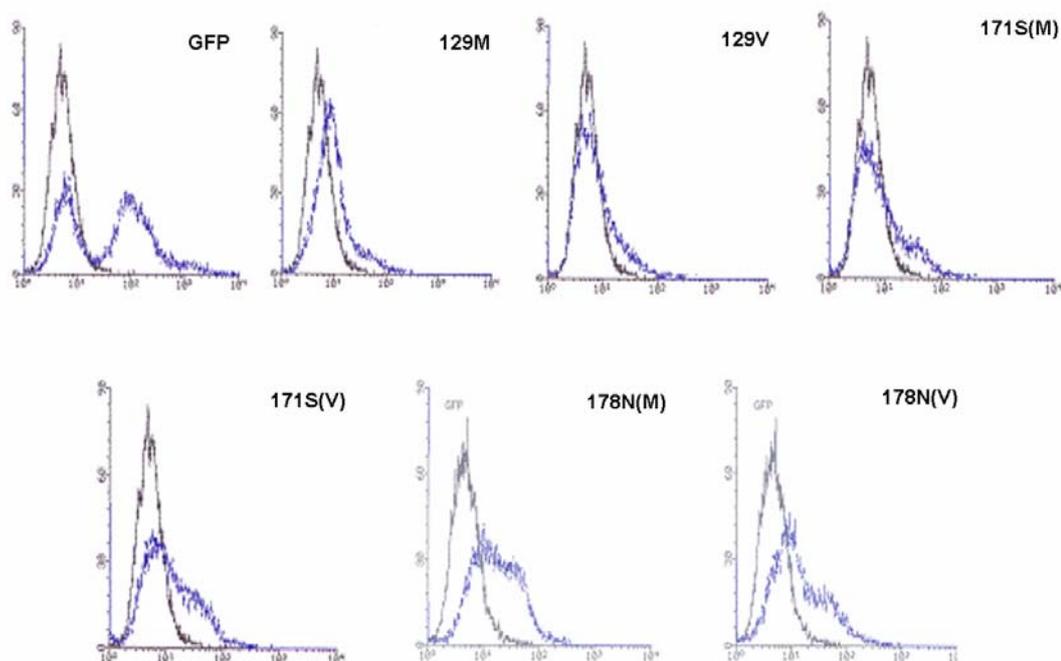
Inicialmente, escolhemos transfectar as células F14, pois era uma linhagem de origem neuronal que não expressava PrP^C, construída a partir da fusão de células de neuroblastoma murino e células cerebelares de camundongo deficiente para o gene de PrP^C (HOLME et al. 2003). Infelizmente, descobrimos mais tarde que as células F14 que recebemos

expressavam PrP^C, e por não saber o que havia ocorrido com elas no laboratório de origem descartamos o seu uso.

Nossa segunda alternativa foi as células CF10, cedidas pela Dra. Sue Priola, do *National Institutes of Health* (NIH) em Hamilton, Estados Unidos. A CF10 é uma linhagem derivada de cérebro de embrião de camundongo deficiente para PrP^C de 15 dias de vida intra-uterina imortalizada com o plasmídeo pSV3-Neo (ATCC[®]37150) e selecionada com o uso do antibiótico G418. Já essa linhagem não demonstrou uma boa eficiência de transfecção, fazendo-nos optar por uma terceira linhagem.

A próxima opção foi transfectar células N2a, linhagem de origem neuronal murina muito usada em trabalhos que estudam PrP^C. Avaliamos a presença de PrP^C exógeno nas células transfectadas com as quimeras e selecionadas por G418. Os *pools* celulares obtidos a partir da seleção foram analisados por ensaios de citometria de fluxo.

As células N2a foram avaliadas, primeiramente, para a fluorescência de GFP, sem a utilização de anticorpos (Figura 18). Pode-se observar que a expressão de GFP não é muito abundante e, em alguns casos, nota-se duas populações celulares com níveis variados de expressão.



Legenda: A curva cinza representa a população N2a não transfectada, enquanto que a azul representa a população transfectada e selecionada com G418. Chamamos de GFP (pEGFP vetor vazio), PrP^C 129M (pEGFP-PrP^C tipo selvagem), 129V (pEGFP-PrP^C 129V), 171S(M) (pEGFP-PrP^C 129M/171S), 171S(V) (pEGFP-PrP^C 129V/171S), 178N(M) (pEGFP-PrP^C 129M/178N) e 178N(V) (pEGFP-PrP^C 129V/178N).

Figura 19 - Histogramas de intensidade de fluorescência para a avaliação da expressão de GFP em células N2a.

A baixa expressão de GFP na população selecionada e a heterogeneidade de alguns *pools* celulares levaram à necessidade do isolamento de clones de células transfectadas. Separamos, portanto, dois clones de cada uma das construções através de diluição limitante para obter populações celulares homogêneas em relação ao nível de expressão de GFP.

Na figura 19, temos o primeiro conjunto de clones. Nela, vemos populações homogêneas quanto ao nível de expressão GFP.

É possível notar que a figura 19 não mostra o clone para a célula transfectada com GFP-PrP^C 129M, pois não conseguimos nenhuma população celular clonal que expressasse quantidades satisfatórias de GFP-PrP^C 129M.

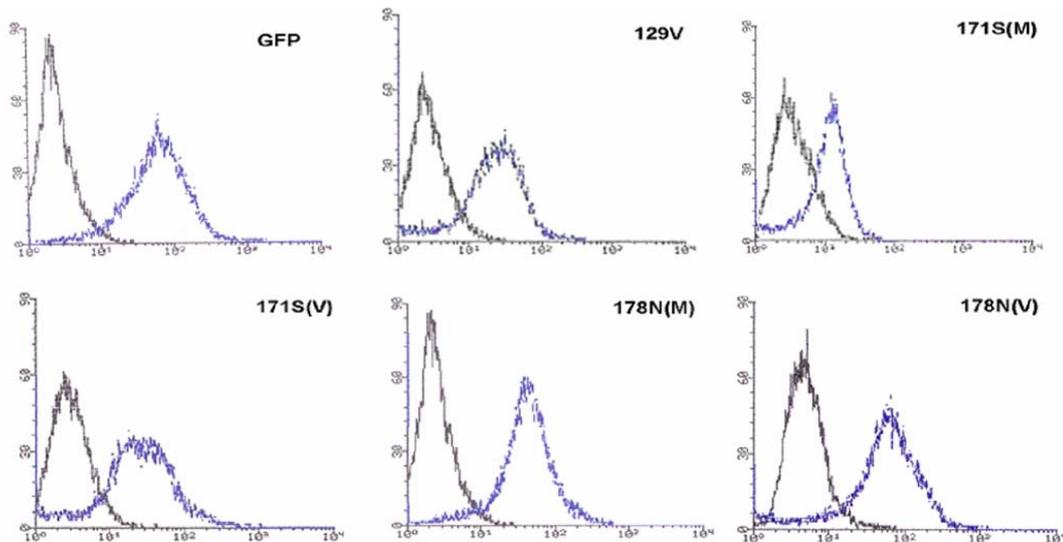
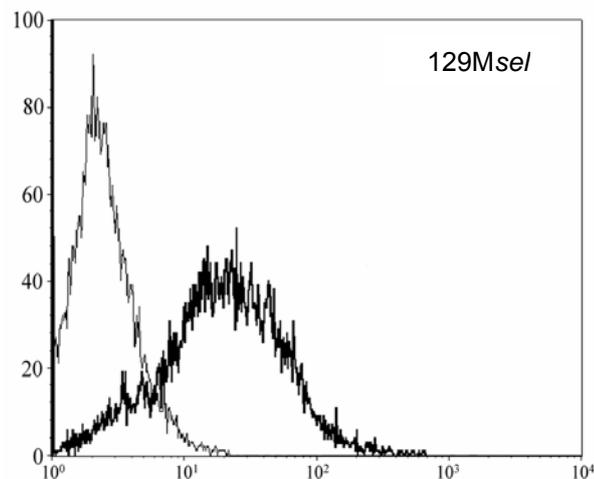


Figura 20 - Histogramas de intensidade de fluorescência para a avaliação da expressão de GFP em clones celulares de N2a (primeiro grupo de clones).

Optamos então por selecionar uma população de PrP^C 129M por nível de expressão de GFP através do método de *cell sorting*, como descrito em materiais e métodos.

A partir das células N2a transfectadas com PrP^C tipo selvagem conseguimos uma população não clonal de GFP-PrP^C 129M homogênea (Figura 20). Denominamos essa população selecionada de GFP-PrP^C 129Msel.



Legenda: A curva mais clara representa a população N2a não transfectada, enquanto a curva mais escura representa a população transfectada e selecionada por *cell sorting* para a obtenção de uma população homogênea quanto à expressão de GFP (129Msel).

Figura 21 - Histograma de intensidade de fluorescência para a avaliação da população selecionada de GFP-PrP^C 129M.

Observamos também, além dos resultados em histograma, a média de intensidade de fluorescência de GFP para cada um desses clones a partir de dois experimentos independentes. Esses resultados estão na Tabela 2.

Nessa tabela vemos resultados normalizados em relação à célula N2a não transfectada, portanto, que não apresenta fluorescência para GFP.

Consideramos que todas as populações, os clones celulares e a população 129Msel, estavam expressando um bom nível de GFP, conseqüentemente, um bom nível de PrP^C exógeno.

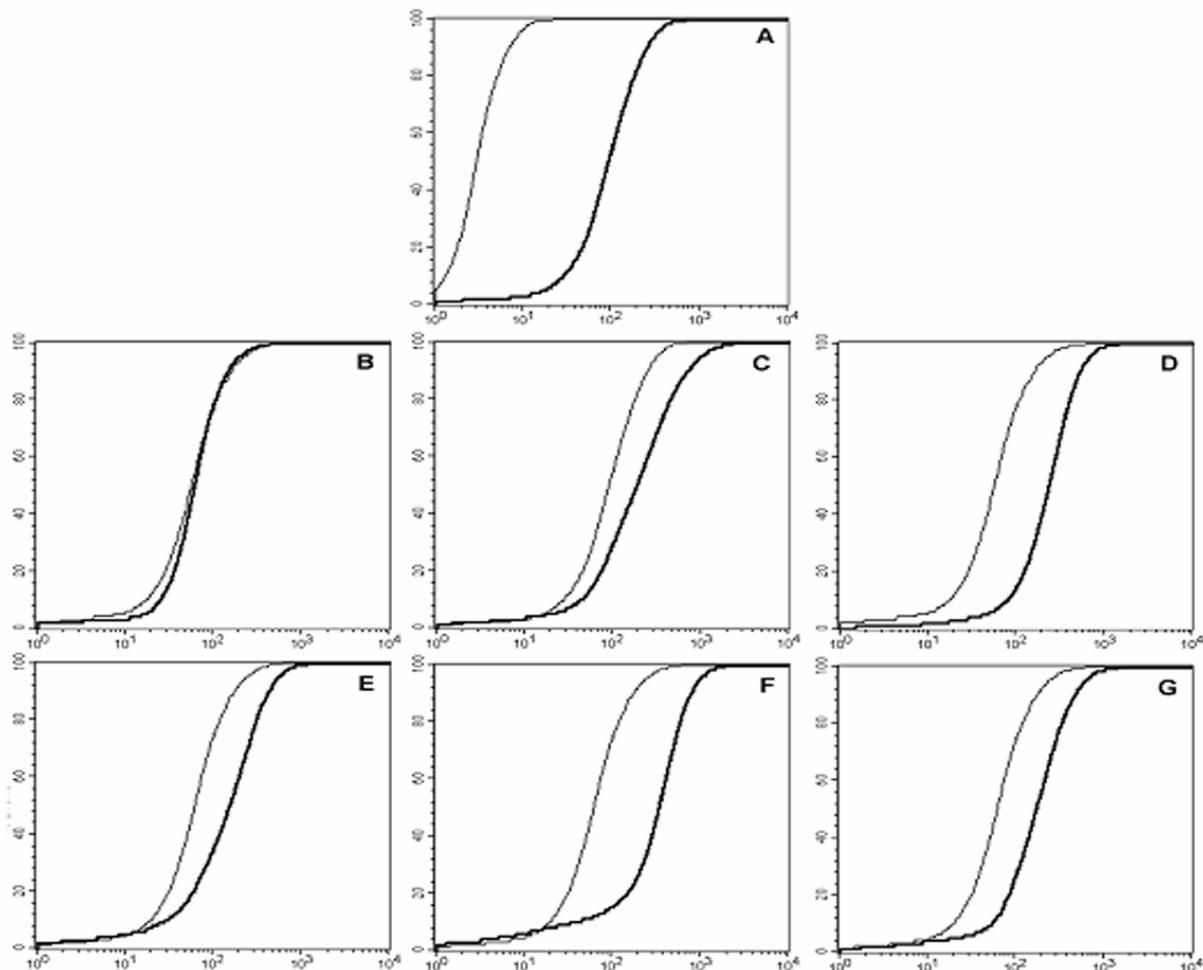
Tabela 2 - Média de intensidade de fluorescência de GFP do primeiro grupo de clones. Os resultados estão normalizados por células N2a não transfectadas.

| N2A | GFP | 129M_{sel} | 129V | 171S(M) | 171S(V) | 178N(M) | 178N(V) |
|------------|------------|---------------------------|-------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 1 | 20,62 | 7,7 | 3,69 | 5,53 | 6,75 | 15,11 | 8,98 |

Depois da avaliação por GFP, optamos por analisar esses mesmos clones em relação à presença de PrP^C total na superfície da membrana celular. Esses clones celulares foram incubados com anticorpo policlonal de camundongo M235, que reconhece tanto PrP^C murino (endógeno) quanto PrP^C humano (proveniente da transfecção) seguido de incubação com anti-IgG de camundongo conjugado a PE.

Utilizamos os resultados de 3 ensaios independentes de citometria para PrP^C total para análise de Kolmogorov-Smirnov (teste K-S). Esse teste estatístico pode ser usado para comparações de duas curvas sobrepostas em um histograma, onde é avaliada a frequência de distribuição de pontos em cada curva, expressando um valor estatístico para a diferença máxima entre as populações (D). Todos valores D tiveram uma significância de $p < 0,001$.

A figura 21 mostra curvas representativas expressas pela análise do teste K-S mostrando a diferença gráfica entre as populações.



Legenda: Esses gráficos são representativos da análise e ilustram os valores D mostrados na tabela 3. No eixo X temos a escala logarítmica de intensidade de fluorescência enquanto que no eixo Y mostramos a escala de porcentagem de células. Em A, N2a (controle negativo, linha clara) X N2a marcada com M235(linha escura); B, N2a M235 (linha clara) X GFP (linha escura); C, N2a M235 (linha clara) X 129MseI (linha escura); D, N2a M235 (linha clara) X 129V (linha escura); E, N2a M235 (linha clara) X 171S(M) (linha escura); F, N2a M235 (linha clara) X 171S(V) (linha escura) e G, N2a M235 (linha clara) X 178N(M) (linha escura).

Figura 22 - Expressão total de PrP^C do primeiro grupo de clones.

Os valores de D (Tabela 3) mostram as diferenças máximas de ligação do anticorpo entre os pares de populações comparadas segundo a intensidade de fluorescência de PE. Este análise permite que seja inferido

quanto PrP^C total está sendo adicionando na membrana plasmática. É valido lembrar que esse é um dado aproximado, já que essa análise foi feita baseada em quantificações que dependem de variáveis intrínsecas ao teste de citometria, como número de células, afinidade do anticorpo primário e secundário, leitura do aparelho etc. O que procuramos mostrar com essa análise é um dado mais fino de quanto estamos adicionando de PrP^C exógeno na membrana.

Tabela 3 - Teste K-S para determinação da diferença máxima de fluorescência entre as populações (D).

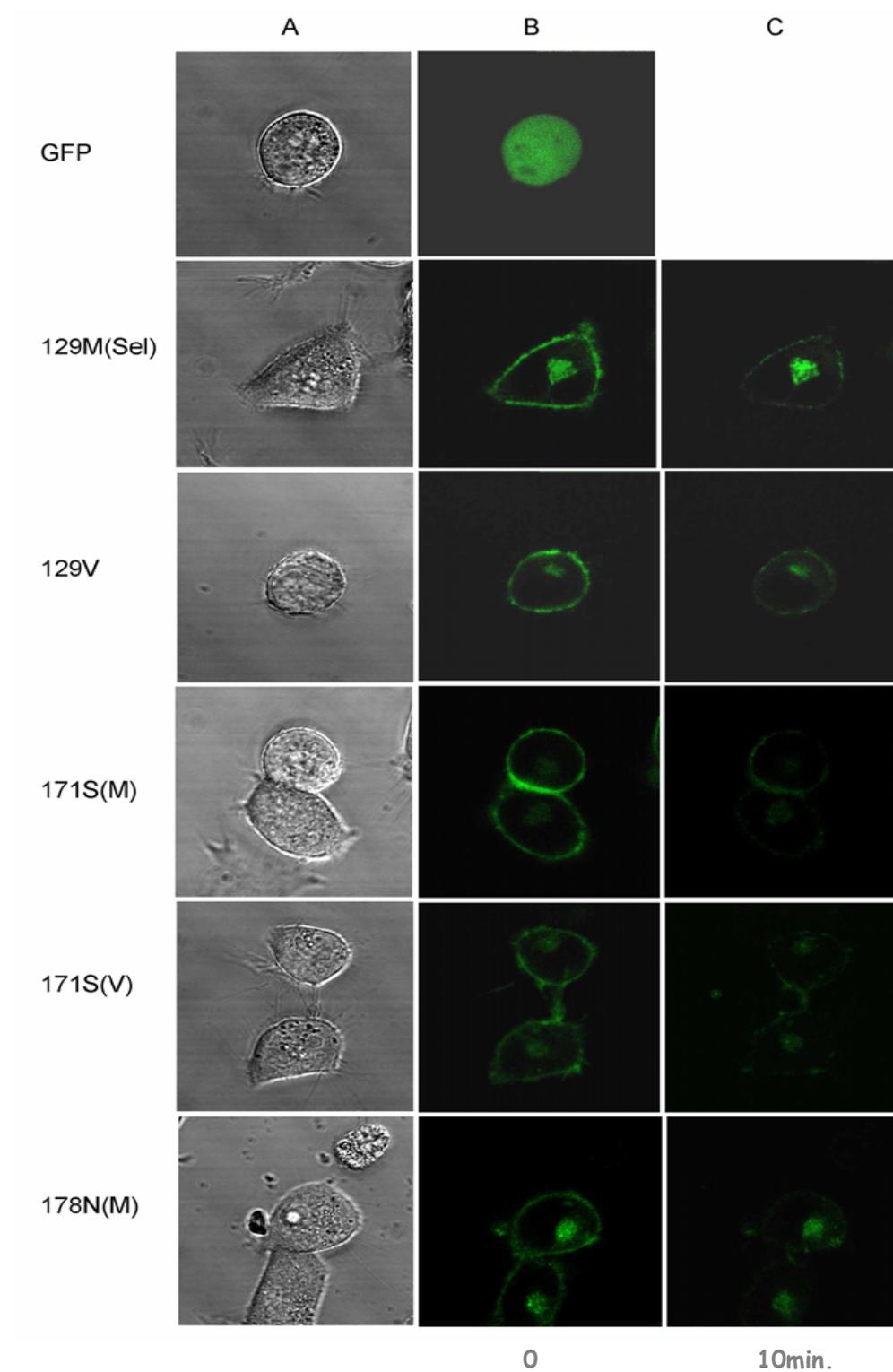
| Controle | Cel. Analizadas | D (%) |
|-----------------|-----------------|-------|
| N2a não marcada | N2a | 93 |
| N2a | GFP | 8 |
| N2a | 129M <i>sel</i> | 26 |
| N2a | 129V | 60 |
| N2a | 171S(M) | 33 |
| N2a | 171S(V) | 60 |
| N2a | 178N(M) | 45 |

Legenda: Todos os valores apresentam um $p < 0,001$. N2a não marcada (célula não transfectada e não tratada com anticorpo), N2a (célula não transfectada tratada com anticorpo M235), GFP (N2a transfectada com vetor pEGFP vazio), 129M*sel* (transfectada com PrP^C tipo selvagem), 129V (PrP^C 129V), 171S(M) (PrP^C 129M/171S), 171S(V) (PrP^C 129V/171S), 178N(M) (PrP^C 129M/178N).

4.5 INTERNALIZAÇÃO DE GFP-PrP^C MEDIADA POR COBRE

Nosso próximo passo foi avaliar se essas construções eram funcionais. Decidimos testá-las através do tratamento com cobre, já que este tratamento induz a internalização de PrP^C da membrana plasmática.

Todas as construções obtidas do primeiro grupo de clones foram tratadas com 500 μ M de íons cobre e apresentaram internalização de PrP^C após 10 minutos (Figura 22).



Legenda: A, luz transmitida; B, fluorescência antes do tratamento; C, fluorescência após 10 minutos de tratamento.

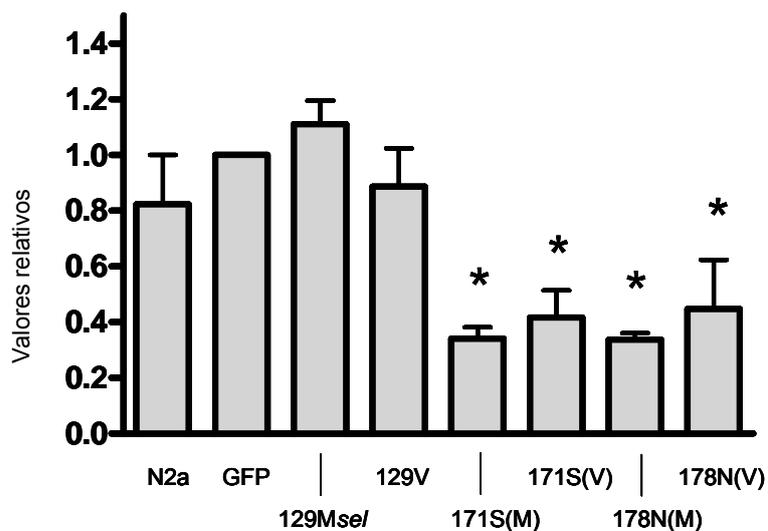
Figura 23 - Imagem de clones celulares de N2a vivas antes e após tratamento com cobre.

4.6 MIGRAÇÃO CELULAR ESTIMULADA POR Ln (PRIMEIRO GRUPO DE CLONES)

Neste experimento avaliamos se a expressão de PrP^C contendo os polimorfismos 129M ou 129V, combinados a 171S ou a mutação 178N, alteravam a capacidade de migração celular estimulada por laminina. No ensaio de migração, o lado inferior do inserto da câmara de *boyden* é sensibilizado com Ln, que sabidamente apresenta um efeito quimiotático. Na face superior da câmara, colocamos as células a serem testadas expressando as diferentes construções de PrP^C.

Ficou evidente com o resultado de migração dos primeiros clones (Figura 23) a interferência que as proteínas GFP-PrP^C 129M/171S, GFP-PrP^C 129V/171S, GFP-PrP^C 129M/178N e GFP-PrP^C 129V/178N exercem sob a migração celular.

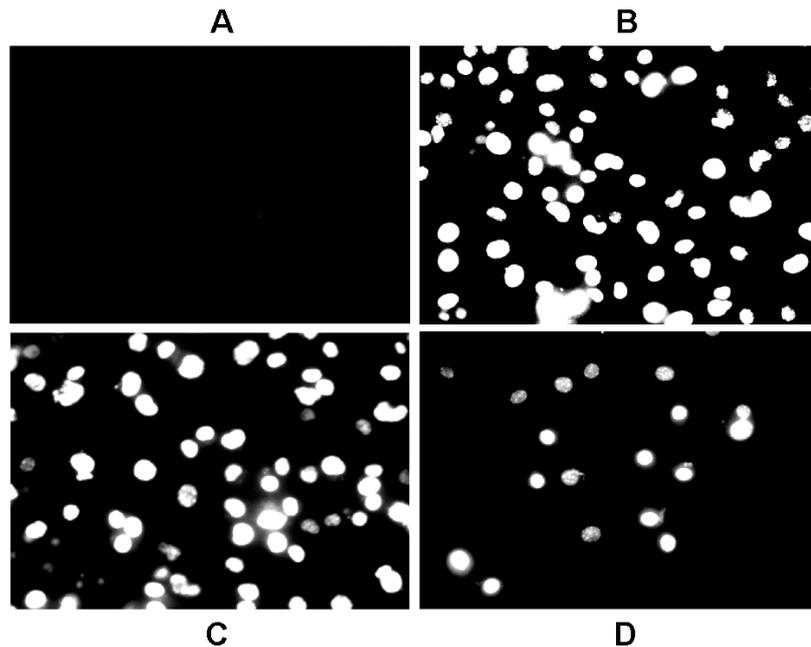
O gráfico mostra a média dos resultados de migração de 3 ensaios independentes e normalizados pela migração de células transfectada com o vetor vazio. A análise estatística foi feita através da variância (ANOVA) e teste de comparação múltiplas Tukey-HSD e foi considerado diferença estatisticamente significativa quando $p < 0,05$ em relação a média de migração da células transfectadas com GFP-PrP^C tipo selvagem (129Msel).



Legenda: Resultados normalizados por GFP e diferença estatística comparada em relação a 129Msel. Vemos uma diferença estatisticamente significativa em 171S(M), 171S(V), 178N(M) e 178N(V).

Figura 24 - Ensaio de migração à Ln do primeiro grupo de clones.

Mostramos também uma figura representativa das imagens adquiridas do ensaio de migração para contagem de células. A figura 24 ilustra o resultado de um ensaio para algumas construções. No primeiro campo temos a membrana sensibilizada com BSA e plaqueada com células N2a não transfectadas. Os demais campos são membranas sensibilizadas com Ln e plaqueadas com N2a não transfectada, GFP-PrP^C 129Msel/ e GFP-PrP^C171S(M), respectivamente.



Legenda: A imagem ilustra o resultado de um campo para a migração de: A, membrana sensibilizada com BSA (células N2a); B, membrana sensibilizada com Ln (células N2a); C, membrana sensibilizada com Ln (GFP-PrP^C 129Mse) e D, membrana sensibilizada com Ln (células GFP-PrP^C 171S(M)). Aumento de 40X.

Figura 25 - Imagem representativa do ensaio de migração dos clones de células N2a.

4.7 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE GFP-PrP^C DO SEGUNDO GRUPO DE CLONES

O segundo grupo de clones foi, como o primeiro, avaliado em relação à homogeneidade das populações em relação ao nível de expressão e média de intensidade de fluorescência de GFP.

Na figura 25, vemos os histogramas de intensidade de fluorescência de GFP do segundo grupo de clones.

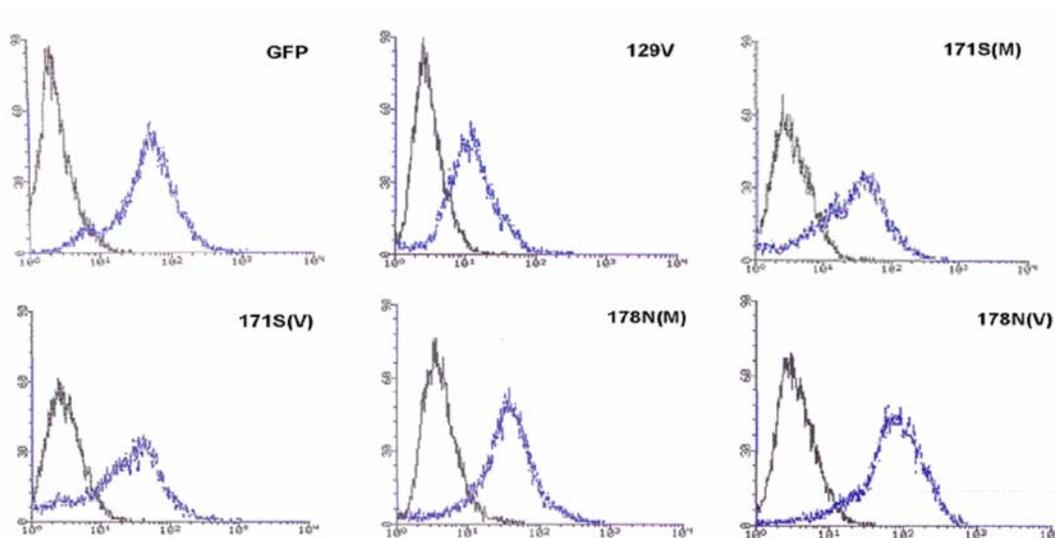


Figura 26 - Histogramas de intensidade de fluorescência para a avaliação da expressão de GFP em clones celulares de N2a (segundo grupo de clones).

Avaliamos também as médias de intensidade de fluorescência obtidas através dos histogramas em relação à GFP, e que estão normalizadas em relação às células N2a não transfectadas (Tabela 4). Os valores são comparáveis às médias de intensidade de fluorescência de GFP dos primeiros clones, exceto para GFP-PrP^C 129M/178N. Apesar do segundo clone dessa construção (média = 7,63) apresentar uma média de fluorescência mais baixa que o primeiro clone (média = 15,11), sua média é comparável à média de fluorescência de 129Msel (média = 7,7).

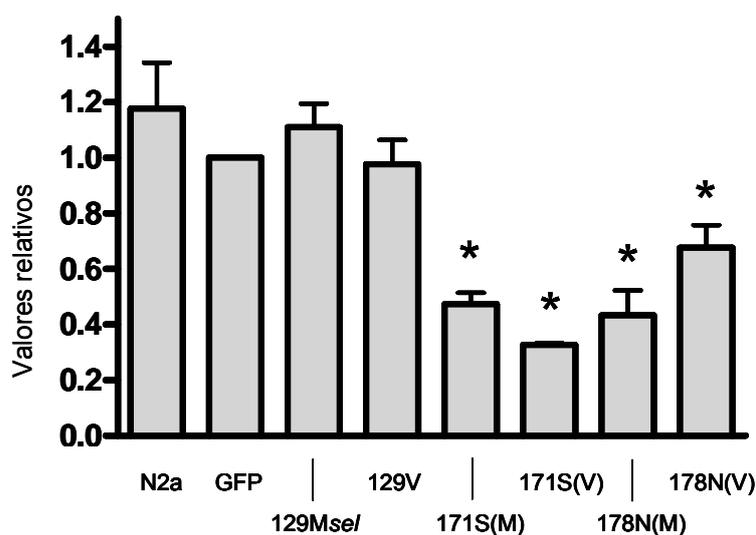
Tabela 4 - Média de intensidade de fluorescência de GFP do segundo grupo de clones. Os resultados estão normalizados por células N2a não transfectadas.

| N2A | GFP | 129Msel | 129V | 171S(M) | 171S(V) | 178N(M) | 178N(V) |
|-----|-------|---------|------|---------|---------|---------|---------|
| 1 | 16,54 | 7,7 | 3,29 | 3,19 | 5,98 | 7,63 | 17,95 |

4.8 MIGRAÇÃO CELULAR ESTIMULADA POR LN (SEGUNDO GRUPO DE CLONES)

Os procedimentos e análises estatísticas para os ensaios de migração do segundo grupo de clones foram os mesmos utilizados para o primeiro grupo.

Notamos queda da migração celular quando as mesmas expressavam 171S(M), 171S(V), 178N(M) E 178N(V) (Figura 26).



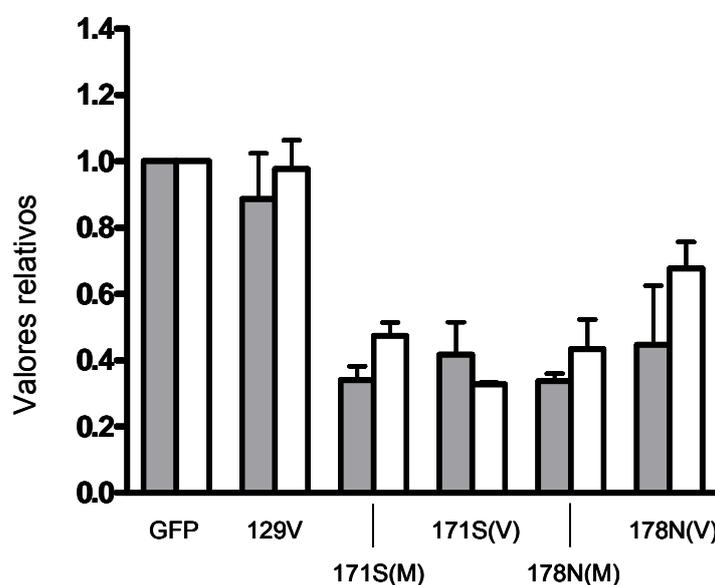
Legenda: Resultados normalizados por GFP e diferença estatística comparada em relação a 129Msel. Vemos uma diferença estatisticamente significativa em 171S(M), 171S(V), 178N(M) e 178N(V).

Figura 27 - Ensaio de migração à Ln do segundo grupo de clones.

4.9 COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE A MIGRAÇÃO DO PRIMEIRO E SEGUNDO GRUPO DE CLONES

Após os ensaios de migração notamos que os dois clones celulares obtidos para os polimorfismos 129M/171S e 129V/171S e para as mutações 129M/178N e 129V/178N foram capazes de diminuir a migração frente a Ln.

Usando a análise estatística de Mann-Whitney, comparamos as médias de migração entre clones celulares expressando as mesmas construções. Esta análise mostrou não haver diferença estatisticamente significativa na migração entre os dois grupos. Este fato nos leva a acreditar que esses resultados não se devam a um fenômeno causado por efeito clonal (Figura 27).



Legenda: Não há diferença estatisticamente significativa entre os primeiros e segundos clones.

Figura 28 - Comparação entre a migração de clones de células N2a expressando as mesmas construções de PrP^C.

5 DISCUSSÃO

Pesquisas sobre doenças hereditárias por prions têm focado em como PrP^C é sintetizado e metabolizado pela célula, e como mutações patológicas podem influenciar nesse processo.

Algumas mutações em PrP^C, que causam alterações na estrutura terciária da molécula, diminuem ou anulam a presença da proteína na superfície celular, sendo estas encontradas em alguns casos em compartimentos intracelulares como o ER. Isto deve-se provavelmente ao seu reconhecimento pela maquinaria de controle de qualidade do retículo, e seu posterior encaminhamento à degradação (FIORITI et al. 2005).

A participação de PrP^C no metabolismo celular é cada vez mais estudada, sendo que é coerente pensar que grande parte de suas funções celulares dependeria de sua presença na superfície celular. Como exemplo disso, estaria a rápida endocitose de PrP^C em células tratadas com íons cobre (HARRIS 2003) e a perda do equilíbrio da concentração de cobre intracelular observada em algumas doenças por prions (THACKRAY et al. 2002).

Esse trabalho teve por objetivo avaliar o impacto que alterações em *PRNP* poderiam ter no contexto celular. O polimorfismo 171S e a mutação 178N foram escolhidos por suas relações, descritas na literatura, com doenças psiquiátricas e neurodegenerativas, respectivamente. De particular importância é o fato dessas alterações localizarem-se em uma região de

PrP^C onde está mapeado o sítio de interação com a laminina, de extrema relevância para a diferenciação neuronal (GRANER et al. 2000a e b).

Alguns trabalhos têm identificado manifestações psiquiátricas em estágios precoces de vCJD, sugerindo que doenças por prion também possam estar associadas a desordens mentais (TSAI et al. 2001). Apesar do polimorfismo N171S estar associado a uma doença psiquiátrica, não existe nenhuma publicação estudando alterações celulares causadas por esse polimorfismo.

Já a mutação D178N é bem estudada. Alguns trabalhos mostraram uma severa instabilidade na forma não glicosilada de PrP^C e alteração da razão das formas de glicosilação na superfície celular, sendo essas mudanças mais evidentes quando a mutação está acompanhada de valina no codon 129 (PETERSEN et al. 1996).

A glicosilação é uma característica importante para maioria das proteínas de superfície celular, incluindo PrP^C, que tem dois sítios de *N*-glicosilação variavelmente ocupados (RUDD et al. 2002). Muito é discutido sobre o papel de alterações na glicosilação de PrP^C e suas consequências funcionais, já que a participação dos açúcares na estrutura de uma glicoproteína pode afetar seu dobramento e sua estabilidade (MITRA et al. 2006).

Usando linhagens celulares diferentes mostramos que a mutação no códon 178 e o polimorfismo no códon 171 associados com metionina ou valina no códon 129 não alteram o padrão de glicosilação, a distribuição subcelular e os mecanismos de internalização de PrP^C por íons cobre.

Portanto, nossos dados sugerem que uma possível perda de função destas proteínas não pode ser associada a compartimentalização nem ao seu padrão de glicosilação.

A análise de expressão das construções foi feita através da intensidade de fluorescência de GFP para os dois grupos de clones celulares obtidos das transfecções em linhagem de células N2a. O primeiro grupo de clones foi também submetido a um teste para a avaliação de PrP^C total na superfície através do uso de um anticorpo anti-PrP^C capaz de reconhecer o PrP^C endógeno e o exógeno. O resultado de expressão de PrP^C com o uso de anticorpo serviu como base para comparação entre os dois grupos a partir da intensidade de fluorescência de GFP e também para descartamos a possibilidade de superexpressão.

Depois de avaliarmos se todas as células escolhidas expressavam as construções, partimos para a análise de possíveis alterações biológicas da presença de PrP^C com mutações em ensaio de migração celular estimulada por laminina.

As células em tecidos estão usualmente aderidas a matriz extracelular, e essa adesão também está envolvida na mobilidade da célula, uma vez que estas podem utilizar a adesão como apoio para a migração. Desta forma, a mobilidade celular está associada ao movimento celular determinado por um gradiente de adesão ao substrato (GRIMSTAD 1987).

Nossos dados mostram que nenhum dos clones transfectados superexpressa moléculas de PrP^C humano tipo selvagem, ou com mutação/polimorfismo, sugerindo que a superexpressão da proteína não

explica as alterações observadas na migração celular. De fato, como pode ser observado na tabela 3 os clones obtidos expressam PrP^C humano numa razão de 23% a 60% do PrP^C já expresso das células N2a.

Dentro deste contexto, a adição de PrP^C tipo-selvagem contendo tanto o polimorfismo 129M como 129V à membrana não influencia a migração celular. Portanto, sugerindo que as vias de sinalização responsáveis por tal fenômeno já estariam saturadas com a presença das moléculas de PrP^C endógenos ou de outros ligantes de laminina como as integrinas.

A Ln apresenta diferentes domínios de ligação a integrinas (AUMAILLEY e SMYTH 1998), sendo essas ligações responsáveis por diferentes processos celulares, como ancoragem, polarização celular e indução de vias de sinalização (AUMAILLEY e SMYTH 1998).

As integrinas consistem de duas subunidades transmembrana α e β que se ligam não covalentemente formando um heterodímero. Foram descritas distintas subunidades α e β , podendo fazer diferentes combinações, proporcionando ligações específicas a diferentes substratos (GIANCOTTI e RUOSLAHTI 1999; TARONE et al. 2000). Estas transduzem sinais através de sua porção citoplasmática, que se associam a proteínas de conexão ao citoesqueleto, a cinases citoplasmáticas e ainda a outros receptores transmembrana (GIANCOTTI e RUOSLAHTI 1999).

Sabe-se que tanto as integrinas (DECKER e FRENCH-CONSTANT 2004) como PrP^C (KANEKO et al. 1997) estão localizados em domínios especializados da membrana plasmática denominados de *lipid rafts* ou

balças lipídicas. Além disso, dados do nosso grupo mostram que PrP^C pode se associar a integrinas na membrana celular (Hajj et al., dados não publicados). Desta forma, uma vez que PrP^C e integrinas ligam a domínios distintos da molécula de Ln (AUMAILLEY e SMYTH 1998), podemos propor que a associação destas moléculas gera uma plataforma de sinalização especializada (Linden et al., submetido) responsável pela ativação de vias de sinalização envolvidas no processo de migração celular.

Interessantemente, os resultados desse trabalho mostraram que células que expressavam moléculas de PrP^C contendo o polimorfismo 171S ou a mutação 178N, mesmo que em concentrações menores que as moléculas de PrP^C endógeno (ver Tabela 3), são capazes de inibir drasticamente a migração celular.

Estes dados sugerem que estas moléculas de PrP^C afetam a migração celular como um todo. É possível que as modificações nos aminoácidos dos codons 171 e 178 na molécula de PrP^C, localizadas particularmente no domínio de ligação à laminina, afetem a sinalização da plataforma de sinalização sugerida acima. Portanto, funcionando como um dominante negativo para a sinalização envolvida com a migração, que é mediada pelo complexo multiproteico que contém pelo menos as moléculas de PrP^C, integrinas e Ln.

Adicionalmente, a construção GFP-PrP^C 129V/178N, que se encontra no núcleo, foi capaz de diminuir o estímulo à migração. Devemos lembrar que há uma alteração nesta construção, uma vez que ela não apresenta o peptídeo sinal de endereçamento à membrana. Nenhum trabalho teve

sucesso em determinar um sinal de localização nuclear (NLS) para PrP^C, apesar de em algumas circunstâncias ele seja encontrado no núcleo (CROZET et al. 2006). Já foi demonstrado que o fator de transcrição Nrf2 é um candidato a ligante de PrP^C (YEHIELY et al. 1997). Em condições de estresse oxidativo Nrf2, que se encontra inicialmente no citoplasma, é translocado para o núcleo e ativa a transcrição de genes relacionados a proteínas antioxidantes (MOTOHASHI e YAMAMOTO 2004).

A molécula de PrP^C sem o peptídeo sinal e com a mutação 178N e o polimorfismo 129V poderia estar interagindo com proteínas citoplasmáticas que vão para o núcleo. Conseqüentemente, essas proteínas poderiam deixar de interagir com seus alvos devido à presença de PrP^C e prejudicar a transcrição de genes relacionados com a migração celular.

Seria interessante a transfecção celular de um vetor contendo a proteína tipo selvagem sem o peptídeo sinal, para avaliarmos se PrP^C estaria no núcleo simplesmente por não ter peptídeo sinal ou se essa mutação estaria influenciando essa localização, além da reconstrução dessa quimera com o peptídeo sinal.

Finalmente, os mecanismos de migração celular são particularmente importantes durante o processo de desenvolvimento do sistema nervoso e também em processos de regeneração mediados pelo recrutamento de células progenitoras. Portanto é plausível pensar que o polimorfismo 171S pode influenciar a migração neuronal e o desenvolvimento de doenças causadas por alterações de migração celular, como as epilepsias causadas pelas malformações do desenvolvimento cortical.

Por outro lado, a mutação 178N que causa FFI ou fCJD pode resultar numa alteração na migração celular durante o desenvolvimento, que só se manifesta com sinais clínicos e morte neuronal em fases mais tardias da vida adulta. Indicando assim, que uma perda de função de PrP^C pode estar envolvida com estas doenças por prions.

Este processo é de grande importância e merecerá um estudo continuado pelo nosso grupo.

6 CONCLUSÕES

- ✓ As construções GFP-PrP^C 129M, GFP-PrP^C 129V, GFP-PrP^C 129M/171S, GFP-PrP^C 129V/171S, GFP-PrP^C 129M/178N são corretamente endereçadas para a membrana plasmática;
- ✓ Não foi observada diferença no padrão de glicosilação entre as construções GFP-PrP^C 129M, GFP-PrP^C 129V, GFP-PrP^C 129M/171S, GFP-PrP^C 129V/171S, GFP-PrP^C 129M/178N.
- ✓ Essas construções se comportaram como a proteína tipo selvagem em ensaios de internalização de PrP^C induzida por íons cobre;
- ✓ As células transfectadas com as quimeras GFP-PrP^C 129M/171S, GFP-PrP^C 129V/171S, GFP-PrP^C 129M/178N apresentaram decréscimo da migração celular induzida por laminina.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguzzi A, Weissmann C. Spongiform encephalopathies: a suspicious signature. **Nature** 1996; 383:666-7.

Aguzzi A, Polymenidou M. Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. **Cell** 2004; 116:313-27.

Apetri AC, Vanik DL, Surewicz WK. Polymorphism at residue 129 modulates the conformational conversion of the D178N variant of human prion protein 90-231. **Biochemistry** 2005; 44:15880-8.

Aumailley M, Smyth N. The role of laminins in basement membrane function. **J Anat** 1998; 193:1-21.

Barducci A, Chelli R, Procacci P, Schettino V, Gervasio FL, Parrinello M. Metadynamics simulation of prion protein: beta-structure stability and the early stages of misfolding. **J Am Chem Soc** 2006; 128:2705-10.

Basler K, Oesch B, Scott M, et al. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. **Cell** 1986; 46:417-28.

Bennion BJ, Daggett V. Protein conformation and diagnostic tests: the prion protein. **Clin Chem** 2002; 48:2105-14.

Beranger F, Mange A, Goud B, Lehmann S. Stimulation of PrP(C) retrograde transport toward the endoplasmic reticulum increases accumulation of PrP(Sc) in prion-infected cells. **J Biol Chem** 2002; 277:38972-7.

Bertram L, Tanzi RE. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. **J Clin Invest** 2005; 115:1449-57.

Blusztajn JK, Venturini A, Jackson DA, Lee HJ, Wainer BH. Acetylcholine synthesis and release is enhanced by dibutyryl cyclic AMP in a neuronal cell line derived from mouse septum. **J Neurosci** 1992; 12:793-9.

Booth DR, Sunde M, Bellotti V, et al. Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis. **Nature** 1997; 385:787-93.

Bounhar Y, Zhang Y, Goodyer CG, LeBlanc A. Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. **J Biol Chem** 2001; 276:39145-9.

Bredemeyer AJ, Carrigan PE, Fehniger TA, Smith DF, Ley TJ. Hop cleavage and function in granzyme B-induced apoptosis. **J Biol Chem** 2006; 281:37130-41.

Brini M, Miuzzo M, Pierobon N, Negro A, Sorgato MC. The prion protein and its paralogue Doppel affect calcium signaling in Chinese hamster ovary cells. **Mol Biol Cell** 2005; 16:2799-808.

Brown DR, Qin K, Herms JW, et al. The cellular prion protein binds copper in vivo. **Nature** 1997; 390:684-687.

Brown DR, Wong BS, Hafiz F, Clive C, Haswell SJ, Jones IM. Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. **Biochem J** 1999; 344:1-5.

Brown P, Preece M, Brandel JP, et al. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease at the millennium. **Neurology** 2000; 55:1075-81.

Brown DR. Prion and prejudice: normal protein and the synapse. **Trends Neurosci** 2001; 24:85-90.

Budka H, Aguzzi A, Brown P, et al. Neuropathological diagnostic criteria for Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (prion diseases). **Brain Pathol** 1995; 5:459-66.

Bueler H, Fischer M, Lang Y, et al. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell- surface PrP protein. **Nature** 1992; 356:577-82.

Bugiani O, Giaccone G, Piccardo P, Morbin M, Tagliavini F, Ghetti B. Neuropathology of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. **Microsc Res Tech** 2000; 50:10-5.

Canet D, Last AM, Tito P, et al. Local cooperativity in the unfolding of an amyloidogenic variant of human lysozyme. **Nat Struct Biol** 2002; 9:308-15.

Capellari S, Zaidi SI, Long AC, Kwon EE, Petersen RB. The Thr183Ala Mutation, Not the Loss of the First Glycosylation Site, Alters the Physical Properties of the Prion Protein. **J Alzheimers Dis** 2000; 2:27-35.

Castilla J, Saa P, Hetz C, Soto C. In vitro generation of infectious scrapie prions. **Cell** 2005; 121:195-206.

Caughey B, Baron GS. Prions and their partners in crime. **Nature** 2006; 443:803-10.

Caughey B, Race RE, Ernst D, Buchmeier MJ, Chesebro B. Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. **J Virol** 1989; 63:175-81.

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science** 1994; 263:802-805.

Chang HC, Nathan DF, Lindquist S. In vivo analysis of the Hsp90 cochaperone Sti1 (p60). **Mol Cell Biol** 1997; 17:318-25.

Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. **EMBO J** 2002; 21:3317-26.

CLONTECH. **pEGFP-1 Vector Information PT3026-5**. PR29973; published 03 Oct 2002. Available from: <URL:http://www.clontech.com/images/pt/dis_vectors/PT3028-5.pdf> [2006 jan 12]

Cohen FE, Pan KM, Huang Z, Baldwin M, Fletterick RJ, Prusiner SB. Structural clues to prion replication. **Science** 1994; 264:530-1.

Coitinho AS, Freitas AR, Lopes MH, et al. The interaction between prion protein and laminin modulates memory consolidation. **Eur J Neurosci** 2006; 24:3255-64.

Collinge J. Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. **Annu Rev Neurosci** 2001; 24:519-50.

Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, et al. Prion protein is necessary for normal synaptic function. **Nature** 1994; 370:295-7.

Crozet C, Vezilier J, Delfieu V, et al. The truncated 23-230 form of the prion protein localizes to the nuclei of inducible cell lines independently of its nuclear localization signals and is not cytotoxic. **Mol Cell Neurosci** 2006; 32:315-23.

Decker L, French-Constant C. Lipid rafts and integrin activation regulate oligodendrocyte survival. **J Neurosci** 2004; 24:3816-25.

Doh-ura K, Kitamoto T, Sakaki Y, Tateishi J. CJD discrepancy. **Nature** 1991; 353:801-2.

Donne DG, Viles JH, Groth D, et al. Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1997; 94:13452-7.

Dorandeu A, Wingertsman L, Chretien F, et al. Neuronal apoptosis in fatal familial insomnia. **Brain Pathol** 1998; 8:531-7.

Fink JK, Peacock ML, Warren JT Jr, Roses AD, Prusiner SB. Detecting prion protein gene mutations by denaturing gradient gel electrophoresis. **Hum Mutat** 1994; 4:42-50.

Fioriti L, Dossena S, Stewart LR, Stewart RS, Harris DA, Forloni G, Chiesa R. Cytosolic prion protein (PrP) is not toxic in N2a cells and primary neurons expressing pathogenic PrP mutations. **J Biol Chem** 2005; 280:11320-8.

Gabriel JM, Oesch B, Kretzschmar H, Scott M, Prusiner SB. Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1992; 89:9097-101.

Gambetti P, Kong Q, Zou W, Parchi P, Chen SG. Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. **Br Med Bull** 2003; 66:213-39.

Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. **Science** 1999; 285:1028-32.

Glatzel M, Ott PM, Linder T, et al. Human prion diseases: epidemiology and integrated risk assessment. **Lancet Neurol** 2003; 2:757-63.

Glatzel M, Stoeck K, Seeger H, Luhrs T, Aguzzi A. Human prion diseases: molecular and clinical aspects. **Arch Neurol** 2005; 62:545-52.

Goldfarb LG, Petersen RB, Tabaton M, et al. Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. **Science** 1992; 258:806-8.

Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, et al. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. **Brain Res Mol Brain Res** 2000a; 76:85-92.

Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Martins VR, Jay DG, Brentani RR. Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. **FEBS Lett** 2000b; 482:257-60.

Grimstad IA. Direct evidence that cancer cell locomotion contributes importantly to invasion. **Exp Cell Res** 1987; 173:515-23.

Harris DA. Cellular biology of prion diseases. **Clin Microbiol Rev** 1999; 12:429-44.

Harris DA. Trafficking, turnover and membrane topology of PrP. **Br Med Bull** 2003; 66:71-85.

Herms JW, Korte S, Gall S, Schneider I, Dunker S, Kretzschmar HA. Altered intracellular calcium homeostasis in cerebellar granule cells of prion protein-deficient mice. **J Neurochem** 2000; 75:1487-92.

Hetz C, Maundrell K, Soto C. Is loss of function of the prion protein the cause of prion disorders? **Trends Mol Med** 2003; 9:237-43.

Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KC, Gowland I, Collinge J, Doey LJ, Lantos P. The same prion strain causes vCJD and BSE. **Nature** 1997; 389:448-50, 26.

Holme A, Daniels M, Sassoan J, Brown DR. A novel method of generating neuronal cell lines from gene-knockout mice to study prion protein membrane orientation. **Eur J Neurosci** 2003; 18:571-9.

Hornshaw MP, McDermott JR, Candy JM, Lakey JH. Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: structural studies using synthetic peptides. **Biochem Biophys Res Commun** 1995; 214:993-9.

Hosszu LL, Jackson GS, Trevitt CR, et al. The residue 129 polymorphism in human prion protein does not confer susceptibility to Creutzfeldt-Jakob disease by altering the structure or global stability of PrPC. **J Biol Chem** 2004; 279:28515-21.

Huang Z, Gabriel JM, Baldwin MA, Fletterick RJ, Prusiner SB, Cohen FE. Proposed three-dimensional structure for the cellular prion protein. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1994; 91:7139-43.

Jackson GS, Collinge J. The molecular pathology of CJD: old and new variants. **Mol Pathol** 2001; 54:393-9.

Kachel N, Kremer W, Zahn R, Kalbitzer HR. Observation of intermediate states of the human prion protein by high pressure NMR spectroscopy. **BMC Struct Biol** 2006; 6:16.

Kaneko K, Vey M, Scott M, Pilkuhn S, Cohen FE, Prusiner SB. COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1997; 94:2333-8.

Khurana R, Gillespie JR, Talapatra A, et al. Partially folded intermediates as critical precursors of light chain amyloid fibrils and amorphous aggregates. **Biochemistry** 2001; 40:3525-35.

Kitamoto T, Ohta M, Doh-ura K, Hitoshi S, Terao Y, Tateishi J. Novel missense variants of prion protein in Creutzfeldt-Jakob disease or Gerstmann-Straussler syndrome. **Biochem Biophys Res Commun** 1993; 191:709-14.

Kovacs GG, Trabattoni G, Hainfellner JA, Ironside JW, Knight RS, Budka H. Mutations of the prion protein gene phenotypic spectrum. **J Neurol** 2002; 249:1567-82.

Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T, et al. Prions prevent neuronal cell-line death. **Nature** 1999; 400:225-6.

Ladogana A, Puopolo M, Croes EA, et al. Mortality from Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders in Europe, Australia, and Canada. **Neurology** 2005; 64:1586-91.

Laine J, Marc ME, Sy MS, Axelrad H. Cellular and subcellular morphological localization of normal prion protein in rodent cerebellum. **Eur J Neurosci** 2001; 14:47-56.

Lee KS, Magalhaes AC, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Prado MA. Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. **J Neurochem** 2001; 79:79-87.

Legname G, Baskakov IV, Nguyen HO, et al. Synthetic mammalian prions. **Science** 2004; 305:673-6.

Liemann S, Glockshuber R. Influence of amino acid substitutions related to inherited human prion diseases on the thermodynamic stability of the cellular prion protein. **Biochemistry** 1999; 38:3258-67.

Lopes MH. **Envolvimento da proteína prion celular e seus ligantes nos mecanismos de plasticidade neuronal e neuroproteção**. São Paulo; 2005a. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Lopes MH, Hajj GN, Muras AG, et al. Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. **J Neurosci** 2005b; 25:11330-9.

Luckenbill-Edds L. Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth. **Brain Res Brain Res Rev** 1997; 23:1-27.

Madore N, Smith KL, Graham CH, et al. Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface. **EMBO J** 1999; 18:6917-26.

Magalhães AC, Silva JA, Lee KS, et al. Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. **J Biol Chem** 2002; 277:33311-8.

Manetto V, Medori R, Cortelli P, et al. Fatal familial insomnia: clinical and pathologic study of five new cases. **Neurology** 1992; 42:312-9.

Martins VR. A receptor for infectious and cellular prion protein. **Braz J Med Biol Res** 1999; 32:853-9.

Martins VR, Linden R, Prado MA, et al. Cellular prion protein: on the road for functions. **FEBS Lett** 2002; 512:25-8.

Mitra N, Sinha S, Ramya TN, Surolia A. N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. **Trends Biochem Sci** 2006; 31:156-163.

Monnet C, Marthiens V, Enslin H, Frobert Y, Sobel A, Mege RM. Heterogeneity and regulation of cellular prion protein glycoforms in neuronal cell lines. **Eur J Neurosci** 2003; 18:542-8.

Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. **Trends Mol Med** 2004; 10:549-57.

[NCBI] National Center Biothecnology Information. **Nucleotide: AY008282**.
Avaliable from: URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=11079225>> [2007 jan 12]

Oesch B, Westaway D, Walchli M, et al. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. **Cell** 1985; 40:735-46.

Oliveira MD, Souza LB, Pinto LP, Freitas RA. [Immunohistochemical study of components of the basement membrane in odontogenic cysts]. **Pesqui Odontol Bras** 2002; 16:157-62.

Pan T, Wong BS, Liu T, Li R, Petersen RB, Sy MS. Cell-surface prion protein interacts with glycosaminoglycans. **Biochem J** 2002; 368:81-90.

Pauly PC, Harris DA. Copper stimulates endocytosis of the prion protein. **J Biol Chem** 1998; 273:33107-10.

Petersen RB, Parchi P, Richardson SL, Urig CB, Gambetti P. Effect of the D178N mutation and the codon 129 polymorphism on the metabolism of the prion protein. **J Biol Chem** 1996; 271:12661-8.

Pfeifer K, Bachmann M, Schroder HC, Forrest J, Muller WE. Kinetics of expression of prion protein in uninfected and scrapie-infected N2a mouse neuroblastoma cells. **Cell Biochem Funct** 1993; 11:1-11.

Preissner KT. Structure and biological role of vitronectin. **Annu Rev Cell Biol** 1991; 7:275-310.

Prusiner SB. Scrapie prions. **Annu Rev Microbiol** 1989; 43:345-74.

Prusiner SB. Prion diseases and the BSE crisis. **Science** 1997; 278:245-251.

Prusiner SB. Prions. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998; 95:13363-83.

[RSC] Advancing the Chemical Sciences. **Battle with the prions**. Available from: <URL:<http://www.rsc.org/chemistryworld/Issues/2005/October/prions.asp>> [2007 jan 12]

Richardson EP Jr, Masters CL. The nosology of Creutzfeldt-Jakob disease and conditions related to the accumulation of PrPCJD in the nervous system. **Brain Pathol** 1995; 5:33-41.

Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wuthrich K. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). **Nature** 1996; 382:180-2.

Rudd PM, Merry AH, Wormald MR, Dwek RA. Glycosylation and prion protein. **Curr Opin Struct Biol** 2002; 12:578-86.

Russelakis-Carneiro M, Saborio GP, Anderes L, Soto C. Changes in the glycosylation pattern of prion protein in murine scrapie. Implications for the mechanism of neurodegeneration in prion diseases. **J Biol Chem** 2002; 277:36872-7.

Samaia HB, Mari JJ, Vallada HP, Moura RP, Simpson AJ, Brentani RR. A prion-linked psychiatric disorder. **Nature** 1997; 390:241.

Santuccione A, Sytnyk V, Leshchyns'ka I, Schachner M. Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. **J Cell Biol** 2005; 169:341-54.

Schneider P. Über die Bedeutung zellwandfreier Bakterienformen (CWD) auch in Bezug auf (Para-)Tuberkulose, Morbus Crohn und BSE. **Elektronische Bücher (Ebooks)**. [serial online]. 2000. Available from: <URL: <http://www.pferdemedizin.com/cwd>> [2007 jan 12]

Schumacher RJ, Hurst R, Sullivan WP, McMahon NJ, Toft DO, Matts RL. ATP-dependent chaperoning activity of reticulocyte lysate. **J Biol Chem** 1994; 269:9493-9.

Shors TJ. Memory traces of trace memories: neurogenesis, synaptogenesis and awareness. **Trends Neurosci** 2004; 27:250-6.

Shyng SL, Huber MT, Harris DA. A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. **J Biol Chem** 1993; 268:15922-8.

Smith DF, Sullivan WP, Marion TN, et al. Identification of a 60-kilodalton stress-related protein, p60, which interacts with hsp90 and hsp70. **Mol Cell Biol** 1993; 13:869-76.

Soto C, Castilla J. The controversial protein-only hypothesis of prion propagation. **Nat Med** 2004; 10 Suppl:S63-S7.

Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. **Cell** 1987; 51:229-40.

Stockel J, Safar J, Wallace AC, Cohen FE, Prusiner SB. Prion protein selectively binds copper(II) ions. **Biochemistry** 1998; 37:7185-93.

Tarone G, Hirsch E, Brancaccio M, et al. Integrin function and regulation in development. **Int J Dev Biol** 2000; 44:725-31.

Thackray AM, Knight R, Haswell SJ, Bujdoso R, Brown DR. Metal imbalance and compromised antioxidant function are early changes in prion disease. **Biochem J** 2002; 362:253-8.

Tribl GG, Strasser G, Zeitlhofer J, et al. Sequential MRI in a case of Creutzfeldt-Jakob disease. **Neuroradiology** 2002; 44:223-6.

Tsai MT, Su YC, Chen YH, Chen CH. Lack of evidence to support the association of the human prion gene with schizophrenia. **Mol Psychiatry** 2001; 6:74-8.

Venstrom KA, Reichardt LF. Extracellular matrix. 2: Role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system. **FASEB J** 1993; 7:996-1003.

Viles JH, Donne D, Kroon G, et al. Local structural plasticity of the prion protein. Analysis of NMR relaxation dynamics. **Biochemistry** 2001; 40:2743-53.

Walmsley AR, Zeng F, Hooper NM. The N-terminal region of the prion protein ectodomain contains a lipid raft targeting determinant. **J Biol Chem** 2003; 278:37241-8.

Walz R, Amaral OB, Rockenbach IC, et al. Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. **Epilepsia** 1999; 40:1679-82.

Walz R, Castro RM, Velasco TR, et al. Surgical outcome in mesial temporal sclerosis correlates with prion protein gene variant. **Neurology** 2003; 61:1204-10.

Windl O, Giese A, Schulz-Schaeffer W, et al. Molecular genetics of human prion diseases in Germany. **Hum Genet** 1999; 105:244-52.

Wong NK, Renouf DV, Lehmann S, Hounsell EF. Glycosylation of prions and its effects on protein conformation relevant to amino acid mutations. **J Mol Graph Model** 2000; 18:126-5.

Yehiely F, Bamborough P, Da CM, et al. Identification of candidate proteins binding to prion protein. **Neurobiol Dis** 1997; 3:339-55.

Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, et al. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. **EMBO J** 2002; 21:3307-16.

Zerr I, Schulz-Schaeffer WJ, Giese A, et al. Current clinical diagnosis in Creutzfeldt-Jakob disease: identification of uncommon variants. **Ann Neurol** 2000; 48:323-9.

Zimmermann K, Turecek PL, Schwarz HP. Genotyping of the prion protein gene at codon 129. **Acta Neuropathol (Berl)** 1999; 97:355-8.

CURRICULUM VITAE

Cleiton Fagundes Machado

DADOS PESSOAIS

Nome Cleiton Fagundes Machado
 Nascimento 16/06/1977, São Paulo, SP, Brasil
 Endereço Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer,
 Laboratório de Biologia Molecular e Celular.
 R. Professor Antônio Prudente, 109, 3º andar
 Liberdade
 01509-010 - Sao Paulo, SP - Brasil
 Phone: +55 11 33883219
 E-mail: cmachado@ludwig.org.br
 Homepage: http://www.ludwig.org.br/groups/d1_BCM

ANO FORMAÇÃO ACADÊMICA

2005 – 2007 Mestrado em Ciências
 Fundação Antônio Prudente, FAP, São Paulo, SP, Brasil.
 Dissertação: Determinação da atividade funcional da proteína prion celular com o polimorfismo N171S e a mutação D178N presentes no domínio de ligação à laminina.
 Orientador: Dra. Vilma Regina Martins
 Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES.

2000 - 2003 Graduação em Ciências Biológicas (Licenciatura Plena e Bacharelado)
 Universidade Cidade de São Paulo, UNICID, São Paulo, Brasil.
 Monografia: Prevalência de Trypanosoma cruzi em candidatos a doador de sangue na Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo
 Orientador: Dra. Ana Lúcia Beirão Cabral

ANO FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2007 - 2007 Fundamentos de Bioestatística
 Faculdade de Saúde Pública
 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, SP, Brasil

2006 - 2006 II International Workshop on Imaging Function in Cells and Organisms.
 Laboratório de Biologia Celular
 Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil

2006 - 2006 Biosecurity of transgenic Organisms Symposium
 Laboratório de Oncologia Experimental
 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, SP, Brasil

2005 - 2005 IV São Paulo Research Conference Cancer today from Molecular Biology to treatment.
 Laboratório de Oncologia Experimental
 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, SP, Brasil

IDIOMAS

Inglês Avançado
 Espanhol Básico

TRABALHOS RESUMIDOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS

1. LANDEMBERGER, M. C., MACHADO, C. F., MALLUCCI, G., CHESEBRO, B., WALZ, R., MARTINS, V. R. Cellular Prion Protein Levels are Associated with Seizure threshold in Null Mice and Transgenic Strains In: Fourth INMED/TINS CONFERENCE, 2005, La Ciotat. Nature and nurture in brain development and neurological disorders. , 2005. v.1.
2. LANDEMBERGER, M. C., MACHADO, C. F., MALLUCCI, G., CHESEBRO, B., WALZ, R., MARTINS, V. R. Cellular Prion Protein Levels are Associated with Seizure threshold in Null Mice and Transgenic Strains In: 26th International Epilepsy Congress, 2005, Paris. The Journal of the International League Against Epilepsy. Paris: Blackwell Publishing, 2005. v.46. p.211 – 211
3. LANDEMBERGER, M. C., MACHADO, C. F., MALLUCCI, G., WALZ, R., MARTINS, V. R. Cellular prion protein levels are associated with seizure threshold in null mice and transgenic strains. In: Keystone Symposia, 2005, Snowbird, Utah. Molecular Mechanisms of Transmissible Spongiform Encephalopathies (Prion Diseases). , 2005.
4. CAJAÍBA, M.M., CUNHA, I. W., CASTRO, R. M. R. P. S., MACHADO, C. F., RIBEIRO, K. B., SOARES, F. A., MARTINS, V. R. Correlação entre a expressão imuno-histoquímica da proteína de estresse ST11 e a proliferação celular em glioblastoma multiforme In: XXV Congresso Brasileiro de Patologia, 2005, Natal. J Bras Patol Med Lab. , 2005. v.41. p.107 – 107
5. COUTO, C. G. C., MACHADO, C. F., MARTINS, V. R. Prion protein expression and its role in protection against doxorubicin toxicity. In: IV São Paulo Research Conference Cancer today from Molecular Biology to treatment., 2005, São Paulo. IV São Paulo Research Conference Cancer today from Molecular Biology to treatment.. , 2005. v.1. p.94 – 95
6. COUTO, C. G. C., MACHADO, C. F., MARTINS, V. R. Prion protein expression and its role against oxidative stress in cardiac cells after doxorubicin treatment In: III international symposium on extracellular matrix and VIII simpósio brasileiro sobre matriz extracelular, 2004, Angra dos Reis. SIMEC 2004. , 2004. v.1. p.128 – 128
7. MACHADO, C. F., SALLES, N. A., CABRAL, A. L. B. Chagas: Panorama brasileiro e prevalência em doadores de sangue em São Paulo In: I Congresso Internacional de Iniciação Científica/ SEMESP, 2003, São Paulo. SEMESP. , 2003. v.1. p.243 – 243
8. MACHADO, C. F., RANZANI-PAIVA, M. J. T. Análise Parasitológica em Brânquias de cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* LINNAEUS, 1766 (TELEOSTEI, SILURIFORMES, PIMELODIDAE), em tanques de cultivo, no estado de São Paulo, Brasil. In: XII Congresso Ibérico de Parasitologia, 2001, Cidade do Porto. Acta Parasitológica Portuguesa. , 2001. v.08. p.84

ARTIGOS EM PREPARAÇÃO

1. LANDEMBERGER, M.C., MACHADO, C. F., LOBÃO-SOARES, B., MALLUCCI, G., CHESEBRO, B., WALZ, R., MARTINS, V.R. Cellular prion protein levels are associated with seizure threshold in null mice and transgenic strains, *in press*.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)