



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**  
**Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho**  
**Doutorado em Ciências Biológicas (Biofísica)**

**Eugênia Terra Granado Pina**

**Participação da Proteína Prion Celular na Diferenciação e**  
**Migração Intratímica de Linfócitos T**

**Rio de Janeiro**

**2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**Eugênia Terra Granado Pina**

**Participação da Proteína Prion Celular na Diferenciação e Migração Intratímica  
de Linfócitos T**

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biofísica)**

**Orientadores: Dr. Wilson Savino**

**Dr.<sup>a</sup>Suse Dayse Silva Barbosa**

**Rio de Janeiro  
2009**

Pina, Eugênia Terra-Granado

Participação da proteína prion celular na diferenciação e migração intratímica de linfócitos T / Eugênia Terra Granado Pina. -- Rio de Janeiro: UFRJ / IBCCF, 2009.

xvii, 133 f.: il; 31 cm.

Orientadores: Wilson Savino e Suse Dayse Silva Barbosa

Tese (Doutorado), UFRJ, IBCCF, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2009.

Referências bibliográficas: f. 111-125.

1. Timo. 2. Proteína. 3. Linfócitos T - Diferenciação 4. Linfócitos T - Migração 5. Biofísica - Tese. I. Savino, Wilson. II. Barbosa, Suse Dayse Silva. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBCCF, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2009. IV. Título.

## **Eugênia Terra Granado Pina**

**Participação da proteína prion celular na diferenciação e migração intratímica  
de linfócitos T**

**Aprovada em: 31 de Agosto de 2009**

**Orientador: Dr. Wilson Savino (Fundação Oswaldo Cruz)**

**Membros da Banca Examinadora:**

**Dr<sup>a</sup>. Luciana Chiarini (Universidade Federal do Rio de Janeiro)**

**Dr. Vinícius Cotta de Almeida (Fundação Oswaldo Cruz)**

**Dr. Alexandre Morrot (Universidade Federal do Rio de Janeiro)**

**Revisora:**

**Dr<sup>a</sup>. Cecília Hedin Pereira (Universidade Federal do Rio de Janeiro)**

**Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, Departamento de Imunologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, tendo recebido suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e da Fundação Oswaldo Cruz.**

**Dedico esta tese aos maiores incentivadores de meus anseios científicos, minha mãe, minha avó Lourdes e meu marido Márlío. E a meu filho.**

## **Agradecimentos**

Como é bom poder agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho prosseguisse e fosse concretizado.

A meu Deus agradeço a vida e chance de aprender.

A meu orientador Savino agradeço a tese e o caminho para chegar até aqui. Todo carinho e preocupação. Você é minha referência, o admiro e respeito muito.

A minha orientadora Suse agradeço toda a ajuda, as horas de bancada, o carinho, a atenção e a força para crescer e alcançar os objetivos.

Agradeço também a minha família pelo amor incondicional, pela formação do meu caráter. Vocês serão sempre meu porto seguro e minha maior fonte de energia.

Márlcio agradeço por estar ao meu lado nos momentos bons e nos difíceis, por compreender a ausência, garantir minha estabilidade e por ser o meu AMOR. Você é essencial nessa jornada.

Ao filhinho da mamãe, agradeço o sorriso, o som da sua voz, a mão nos cabelos e o amor. É lindo te ouvir chamando mamãe.

E ao povo do laboratório, amigos, irmãos, pessoas que viveram o dia-a-dia e sabem bem tudo o que significa chegar até aqui. São muitos os nomes que estão e que já estiveram, mas que farão sempre parte do time LPT. Desde os tempos de IC Silvana, minha mãezinha, Sandra Neves um exemplo de força, João Hermínio um companheiro para todos os momentos. Francisco que já me ajudou em tantos experimentos, Bárbara outra mão forte e constante, Wallace sempre por perto sorrindo e resolvendo tantas coisas, Tininha uma amiga para vida toda, Patrícia, Paulinha, Kenji, Luiz Anastácio, cada um com sua marca especial. E o povo que está, Luiz Ricardo presente nos momentos mais difíceis, e nos tranquilos também, já disse obrigado tantas vezes a você que já estou até sem graça, você é uma das peças chave no andamento deste trabalho, muito obrigada por tudo!! Klaysa, antes de tudo minha amiga, companheira de vida e de experimentos, obrigada por saber que posso sempre contar com você. E a Fernanda ou tia Fê, além de ser uma pediatra muito dedicada (Caio também agradece), ainda é uma amiga com o sorriso sempre a espera, e disposta a ajudar no que for preciso, obrigada pelo tempo, pelas fotos, pelas morfometrias e principalmente pelo carinho. Leandra, sempre forte e



determinada, pronta para contribuir e participar, obrigada pelas conversas, carinho e por toda ajuda. MeM, Marco e Marcele, duplinha bacana, amigos de verdade, Marcele com toda sua eficiência me ensinou como é importante se antecipar aos fatos, Marco um exemplo de maturidade, competência e bom humor tudo junto! A Lulu, nossa quase pós-doc, obrigada pelas ajudas e companheirismo. Cecília tão doce e determinada, obrigada pelas palavras de carinho. Flávia, com um bom humor constante, e boa vontade em ajudar. Ao Vítor pelas discussões interessantes e humor irônico. Ana Flávia, divertida e sempre atenciosa. Ao Eduardo pelos questionamentos, conversas e por tentar não pensar no óbvio. Ao Tiago, Dani, Ednéia, Pedro Henrique pela força e incentivo. Ao Diego, Jairo, Pedro e Sabina pelas dicas e boas risadas. A turminha mais recente Carol, Ariane, Júlia, Marina que trazem a alegria e a inocência dos primeiros tempos.

Ao Désio um professor nato, obrigada por tudo que ensinou e pela amizade. Agradeço a Déa, por toda gentileza e carinho, e por resolver sempre as emergências necessárias, quantos galhos einh! Juju ou Dra. Juliana, além da ajuda na bancada, seus conselhos sensatos me serão sempre caros. A Dani Arêas, me tirando dúvidas e ensinando tanto. Ao Alexandre agradeço a confiança e a força para frente, sem falar no bom humor! Carla, obrigada pelo espaço cedido no momento em que não pude trabalhar “em casa”, e pelo sorriso. Ingo pelo bom humor e atenção. Ao Dumith pelo esmero e cavalheirismo.

A Sueli com seu bom humor e ajuda essencial na secretaria e a Sidnéia que está chegando com todo gás e já mostra segurança e eficiência, muito obrigada.

Ao Dr. Vinícius agradeço a ótima discussão, toda paciência e disponibilidade.

Agradeço também a Dra. Cecília Hedin por aceitar a revisão da tese.

E meu obrigada ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, pela chance de estar em um dos centros de pesquisa mais respeitados do país e ter contato com professores e profissionais de alto padrão de qualidade científica e pedagógica. Agradeço também a Sandra, com suas informações preciosas, sua preocupação e vontade em resolver nossos problemas sempre, e a Gabriela pela atenção e ajuda.

## Resumo

TERRA-GRANADO, Eugênia. Participação da proteína prion celular na diferenciação e migração intratímica de linfócitos T. Rio de Janeiro, 2009. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Biofísica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009

A proteína prion celular (PrP<sup>C</sup>) é expressa constitutivamente em diferentes órgãos do sistema nervoso, mas também no sistema imune, incluindo-se, em particular, o timo. Funcionalmente, tem sido sugerido seu envolvimento em processos como proteção contra apoptose, neuritogênese, metabolismo do íon cobre, e ativação de linfócitos T. Além disso, sua interação com laminina parece estar envolvida em processos de adesão neuronal, extensão e manutenção de neuritos. Ainda assim, seu papel funcional não foi totalmente elucidado. Neste trabalho, analisamos uma possível participação de PrP<sup>C</sup> na diferenciação e capacidade migratória de timócitos provenientes de camundongos com diferentes níveis de expressão da PrP<sup>C</sup>. Nossos resultados mostram que camundongos super-expressando PrP<sup>C</sup> (Tga20) apresentam intensa hipoplasia tímica, com bloqueio parcial de diferenciação de timócitos no estágio DN3 (de fenótipo CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>), e diminuição nas subpopulações subseqüentes. As subpopulações duplo-positivas CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, assim como os timócitos simples positivos CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> do camundongo Tga20 apresentam aumento de morte celular, explicando em parte o pequeno número de células encontrado nestes estágios de desenvolvimento. Linfonodos dos animais com super-expressão de PrP<sup>C</sup> apresentam diminuição no número de linfócitos T $\alpha\beta$  e aumento nos linfócitos T $\gamma\delta$ . Verificamos ainda que animais apresentando variação na expressão de PrP<sup>C</sup> possuem respostas migratórias alteradas frente a diferentes estímulos, incluindo laminina, fibronectina e a quimiocina CXCL12. Em conclusão, nossos resultados mostram que PrP<sup>C</sup> modula diferentes processos biológicos fundamentais no desenvolvimento de linfócitos T.

## Abstract

TERRA-GRANADO, Eugênia. Participação da proteína prion celular na diferenciação e migração intratímica de linfócitos T. Rio de Janeiro, 2009. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Biofísica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009

The cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) is constitutively expressed in different organs of the nervous system, but also the immune system and, particularly, in the thymus. Functionally, it has been suggested a role for PrP<sup>C</sup> in protection against apoptosis, neuritogenesis, ion copper metabolism, and T lymphocyte activation. Moreover, its interaction with laminin seems to be involved in neuronal adhesion, as well as neurite extension and maintenance. Nevertheless, its biological functions have not been completely clarified so far. In the present work, we evaluated the possible participation of PrP<sup>C</sup> in thymocyte differentiation and migration, analysing thymocytes from mice expressing different PrP<sup>C</sup> levels. We showed that mice overexpressing PrP<sup>C</sup> present an intense thymic hypoplasia with a partial developmental arrest at DN3 stage of thymocyte differentiation (with the phenotype CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>), and a reduction of the subsequent subpopulations. The CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double-positive as well as the CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> subsets from PrP<sup>C</sup> transgenic mice exhibit an increase in cell death, partially explaining the reduced cell numbers found in these subsets. Moreover, lymph nodes from mice overexpressing PrP<sup>C</sup> show a decrease in TCRαβ lymphocyte numbers and an increase in TCRγδ T lymphocytes. We also noticed, in mice with an imbalance in PrP<sup>C</sup> expression, altered migratory responses to distinct stimuli, including laminin, fibronectin and the chemokine CXCL12. In conclusion, our results show a PrP<sup>C</sup> modulation in essential biological processes during T lymphocyte development.

## Lista de Figuras

Figura 1.1. Ligantes da proteína príon celular. _____	12
Figura 1.2. Complexo protéico multi-funcional envolvendo a proteína prion celular. _	15
Figura 1.3. Seção histológica de timo mostrando as regiões de córtex e medula. ___	24
Figura 1.4. Diferenciação intratímica de linfócitos T. _____	33
Figura 4.1. Expressão da proteína prion celular (PrP <sup>C</sup> ) em timócitos. _____	50
Figura 4.2. Células do microambiente tímico expressam PrP <sup>C</sup> constitutivamente. ___	51
Figura 4.3. Hipoplasia tímica em camundongos transgênicos para PrP <sup>C</sup> . _____	52
Figura 4.4: Bloqueio de diferenciação em timócitos de camundongos Tga20. _____	56
Figura 4.5: Acúmulo de timócitos em DN3 no timo de camundongos Tga20. _____	57
Figura 4.6: Timócitos com perfil mais imaturo em camundongos Tga20. _____	61
Figure 4.7: Suscetibilidade a morte em timócitos com diferentes níveis de expressão de PrP <sup>C</sup> . _____	62
Figura 4.8: Menor número de linfócitos T nos linfonodos subcutâneos de camundongos Tga20. _____	64
Figura 4.9: Menor número de linfócitos T nos linfonodos mesentéricos de camundongos Tga20. _____	65
Figura 4.10: Menor número de linfócitos T nos baços de camundongos Tga20. ___	67
Figura 4.11: Migração de timócitos com diferentes níveis de expressão de PrP <sup>C</sup> frente à laminina. _____	70
Figura 4.12: Migração de timócitos com diferentes níveis de expressão de PrP <sup>C</sup> frente à fibronectina. _____	71
Figura 4.13: Migração de timócitos com diferentes níveis de expressão de PrP <sup>C</sup> frente a quimiocina CXCL12. _____	72

Figura 4.14: Expressão do receptor de laminina em timócitos.	73
Figura 4.15: Expressão da cadeia $\alpha 4$ receptor de fibronectina VLA-4 em timócitos.	74
Figura 4.16: Expressão da cadeia $\alpha 5$ do receptor de fibronectina VLA-5 em timócitos.	75
Figura 4.17. Expressão do receptor CXCR4 em timócitos.	76
Figura 4.18. Aumento de ligantes de matriz extracelular e de CXCL12 no microambiente tímico do camundongo Tga20.	78
Figura 4.19: PrP <sup>C</sup> como molécula quimioatraente.	80
Figura 6.1. Modelo estrutural de um dímero de PrP <sup>C</sup> .	83

## Lista de Abreviaturas e Siglas

BSA – Albumina sérica bovina

BSE – Encefalopatia espongiforme bovina

CJD – Doença de Creutzfeldt-Jakob

CK – Citoqueratina

CLP – Precursor linfóide comum (do Inglês, *common lymphocyte progenitor*)

ConA – Concanavalina A

DC – Células dendríticas

DN – Células T duplo-negativas (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>)

DP – Células T duplo-positivas (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>)

EAE – encefalomielite autoimune experimental

ECM – Matriz extracelular

ETP – Progenitores de células T (do Inglês *early T lineage progenitors*)

fCJD – CJD familiar

FDCs – Células dendríticas foliculares

FFI – Insônia familiar fatal

GPI – Glicosil-fosfatidilinositol

GSS – Doença de Gerstmann-Sträussler-Scheiker

HD – domínio hidrofóbico da proteína prion celular

HE – Hematoxilina e eosina

HSCs – Células tronco hematopoiéticas

ICAM – Molécula de adesão intercelular

iCJD – CJD iatrogênica

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

IL-7R $\alpha$  - Cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-7

Lin $^-$  – Negativo para marcadores de linhagens celulares hematopoiéticas diferenciadas

LN – Laminina

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

MPP – Progenitor multipotente (do Inglês *multipotential progenitor*)

NCAM - Molécula de adesão neuronal

NMR – Ressonância magnética nuclear

Prion – Partícula infecciosa proteinácea (do Inglês, *proteinaceous infectious particle*)

Prnp – Gene da proteína prion celular

Prnp<sup>0/0</sup> – Camundongo nocaute para o gene Prnp

PrP<sup>C</sup> – Proteína prion celular

PrP<sup>SC</sup> – Proteína prion “scrapie”

PSGL-1 – Glicoproteína ligante da P-selectina 1 (do Inglês, *P-selectin glycoprotein ligand 1*)

Sca-1 – Antígeno de célula tronco do tipo 1 (do Inglês, *stem cell antigen 1*)

SNC – Sistema nervoso central

SOD – Enzima superóxido dismutase

S1P – esfingosina-1-fosfato (do Inglês, *sphingosine 1 phosphate*)

S1P<sub>1</sub> – receptor 1 de esfingosina 1-fosfato (do Inglês, *type 1 sphingosine-1-phosphate receptor*)

SP – Células T simples-positivas (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> ou CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>)

sCJD – Forma esporádica da CJD

STI-1 – Proteína 1 induzida por estresse

TCR – Receptor clonal de células T

TEC – Células epiteliais tímicas, do Inglês *Thymic Epithelial Cells*

Tga20 – Camundongo transgênico super-expressando PrP<sup>C</sup>

TNC – Célula nurse tímica

TSEs – Encefalopatias espongiformes transmissíveis

VCAM-1 - Molécula de adesão vascular 1 (do Inglês, *vascular cell adhesion molecule 1*)

vCJD – Forma variante da CJD

VLA – Antígeno de aparecimento tardio, do Inglês Very Late Antigen

VLA-4 –  $\alpha 4\beta 1$  ou CD49d/CD29, receptor de fibronectina e VCAM-1

VLA-5 –  $\alpha 5\beta 1$  ou CD49e/CD29, receptor de fibronectina

VLA-6 –  $\alpha 6\beta 1$  ou CD49f/CD29, receptor de laminina

WT – Camundongo do tipo selvagem (do Inglês, *Wild Type*)



## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>1.1. PRION</b>	<b>18</b>
1.1.1. ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES TRANSMISSÍVEIS (TSEs)	22
1.1.2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA PROTEÍNA PRION CELULAR	24
1.1.3. LIGANTES E POSSÍVEIS FUNÇÕES DE PrP <sup>C</sup>	26
1.1.4. DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DA PROTEÍNA PRION CELULAR	32
1.1.5. SISTEMA IMUNE E PROTEÍNA PRION CELULAR	33
1.1.6. PROTEÍNA PRION CELULAR NO TIMO	38
<b>1.2. TIMO</b>	<b>40</b>
1.2.1. MICROAMBIENTE TÍMICO	42
1.2.2. DIFERENCIAÇÃO INTRATÍMICA DE LINFÓCITOS T	45
1.2.3. MIGRAÇÃO COMPARTIMENTALIZADA DAS SUBPOPULAÇÕES DE TIMÓCITOS	50
1.2.4. INTERAÇÕES MOLECULARES ENVOLVIDAS NA COMPARTIMENTALIZAÇÃO DOS TIMÓCITOS NO MICROAMBIENTE TÍMICO	52
<b>2- OBJETIVOS</b>	<b>58</b>
<b>3. MATERIAIS &amp; MÉTODOS</b>	<b>59</b>
<b>3.1. ANIMAIS</b>	<b>59</b>
<b>3.2. REAGENTES</b>	<b>59</b>
<b>3.3. ANTICORPOS</b>	<b>60</b>
<b>3.4. HISTOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA</b>	<b>61</b>

<b>3.5. CITOMETRIA DE FLUXO</b>	<b>62</b>
<b>3.6. ENSAIO DE TRANSMIGRAÇÃO</b>	<b>62</b>
<b>3.7. Análise estatística</b>	<b>63</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>64</b>
<b>4.1. PARTICIPAÇÃO DA PROTEÍNA PRION CELULAR NA DIFERENCIAÇÃO INTRATÍMICA DE LINFÓCITOS T</b>	<b>64</b>
4.1.1. EXPRESSÃO DE PRP <sup>C</sup> EM TIMÓCITOS E CÉLULAS DO MICROAMBIENTE TÍMICO	64
4.1.2. HIPOPLASIA NO TIMO DE CAMUNDONGOS QUE SUPER-EXPRESSAM PRP <sup>C</sup>	67
4.1.3. ACÚMULO DE TIMÓCITOS IMATUROS EM CAMUNDONGOS APRESENTANDO SUPER-EXPRESSÃO DA PROTEÍNA PRION CELULAR	69
4.1.4. ANÁLISE DE SUBPOPULAÇÕES DE TIMÓCITOS EM CAMUNDONGOS COM DIFERENTES IDADES	70
4.1.5. ACÚMULO DE CÉLULAS DE FENÓTIPO CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD44 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> (DN3) NO TIMO DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS PARA A PROTEÍNA PRION CELULAR	73
4.1.6. EXPRESSÃO ALTERADA DE HETERODÍMEROS DO RECEPTOR DE CÉLULAS T EM TIMÓCITOS DE CAMUNDONGOS TGA20	76
4.1.7. AUMENTO DE MORTE CELULAR EM CAMUNDONGOS SUPER-EXPRESSANDO PRP <sup>C</sup>	79
4.1.8. ALTERAÇÃO NAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T NOS ÓRGÃOS LINFÓIDES PERIFÉRICOS DE CAMUNDONGOS TGA20	80
<b>4.2. IMPORTÂNCIA DA PROTEÍNA PRION CELULAR NA RESPOSTA MIGRATÓRIA DE TIMÓCITOS</b>	<b>85</b>

4.2.1. DEFEITO NA MIGRAÇÃO INDUZIDA POR MOLÉCULAS DE MATRIZ EXTRACELULAR E CXCL12 EM TIMÓCITOS DE CAMUNDONGOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE PRP <sup>C</sup> _____	85
4.2.2. EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE MOLÉCULAS DE MATRIZ EXTRACELULAR E DE CXCL12 EM TIMÓCITOS EXPRESSANDO NÍVEIS VARIÁVEIS DA PROTEÍNA PRION CELULAR_	90
4.2.3. EXPRESSÃO AUMENTADA DE MOLÉCULAS DE MATRIZ EXTRACELULAR E CXCL12 NO TIMO DE CAMUNDONGOS SUPER-EXPRESSANDO PRP <sup>C</sup> _____	93
4.2.4. PRP <sup>C</sup> COMO MOLÉCULA QUIMIOATRAENTE PARA TIMÓCITOS _____	96
<b>6. DISCUSSÃO</b> _____	<b>98</b>
<b>7- CONCLUSÕES</b> _____	<b>110</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> _____	<b>111</b>
<b>ANEXO</b> _____	<b>126</b>

## 1. INTRODUÇÃO

No presente trabalho, avaliamos a participação da proteína prion celular (PrP<sup>c</sup>) na diferenciação e migração intratímica de linfócitos T. Vários trabalhos sugerem a participação dessa molécula na ativação de linfócitos T, além de já ter sido demonstrada sua expressão no timo, tanto no compartimento microambiental, quanto em timócitos. Por outro lado, PrP<sup>c</sup> interage com a molécula de matriz extracelular laminina, a qual, por sua vez, desempenha um papel relevante na migração de linfócitos T, no timo e em órgãos linfóides periféricos. Em conjunto, tais dados nos levaram a analisar a possível função de PrP<sup>c</sup> nos processos de diferenciação e migração intratímica de linfócitos T. Para realizar tal análise utilizamos camundongos com diferentes níveis de expressão da molécula, dando-se ênfase ao processo de diferenciação de linfócitos T no timo desses animais, e à capacidade migratória desses timócitos, frente a diferentes estímulos.

A seguir, apresentaremos uma série de dados e conceitos, fundamentais para o entendimento dos resultados apresentados posteriormente.

### 1.1. Prion

O conceito de que proteínas corrompidas do hospedeiro poderiam agir como patógenos infecciosos foi primeiramente sugerido em 1967, por Griffith, que tentava entender o *scrapie* (doença neurodegenerativa encontrada em ovelhas e cabras) (Griffith, 1967). A sigla **prion**, derivada de partícula infecciosa proteínica (do Inglês *proteinaceous infectious particle*), foi sugerida em 1982, por Stanley Prusiner para designar o patógeno infeccioso responsável pelo *scrapie*. Esta enfermidade pode ser incluída entre as encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs) ou doenças

causadas por *prion*, doenças neurodegenerativas que acometem tanto humanos quanto animais (Prusiner, 1982).

A busca pelo agente infeccioso responsável pelas TSEs levou a intensas discussões e muitas teorias (Stockel et al., 1998). No entanto, algumas características físico-químicas do material purificado a partir dos tecidos infectados mostraram que o agente infeccioso é composto apenas por proteína, na ausência de ácidos nucleicos. Tais características incluem alta resistência a tratamentos químicos e físicos capazes de inativar ácidos nucleicos, como UV, tratamento com nucleases, hidrólise por cátions divalentes e modificações químicas (Alper et al., 1967; Bellinger-Kawahara et al., 1987). Incluem também a inativação do material purificado através de tratamentos específicos para proteínas, como digestão por proteases (como uma função da concentração enzimática, temperatura e tempo de digestão), inativação por SDS (sodium dodecil sulphate) e inativação por fenol e uréia (Prusiner, 1982).

Estudos de clonagem de cDNA obtido a partir de extratos cerebrais de animais infectados, levaram ao isolamento do gene de prion (*Prnp*). Ao contrário do esperado, descobriu-se que este era um gene constitutivo do hospedeiro e não um gene derivado de um patógeno (Chesebro et al., 1985; Oesch et al., 1985). Isso levou ao reconhecimento da existência de pelo menos duas isoformas da proteína prion, aquela encontrada apenas em animais infectados, denominada prion scrapie ou PrP<sup>SC</sup>, também conhecida como PrPres pela maior resistência a degradação por proteinase K, e a isoforma codificada pelo gene *Prnp* denominada proteína prion celular ou PrP<sup>C</sup>, encontrada também em tecidos de animais não infectados. A existência de duas isoformas está relacionada a alterações pós-transcricionais nas estruturas secundárias: PrP<sup>C</sup> é rico em  $\alpha$ -hélices, com pouquíssimas folhas  $\beta$ -pregueadas, enquanto PrP<sup>SC</sup> apresenta uma quantidade maior de folhas  $\beta$ -

pregueadas. Assim, apesar de possuírem a mesma seqüência de aminoácidos (Basler et al., 1986), as isoformas PrP<sup>SC</sup> e PrP<sup>C</sup> apresentam algumas diferenças marcantes entre si. **1.** Estruturas secundárias distintas: PrP<sup>SC</sup> possui em torno de 30% de  $\alpha$ -hélice e 45% de folha  $\beta$ -pregueada, enquanto PrP<sup>C</sup> possui em torno de 40% de  $\alpha$ -hélice e 3% de folha  $\beta$ -pregueada (Pan et al., 1993). **2.** Degradação por proteinase K: PrP<sup>SC</sup> apresenta maior resistência à degradação por proteinase K, mantendo um núcleo de 27-30 kDa após o tratamento com a enzima, ao passo que PrP<sup>C</sup> é sensível à degradação (Oesch et al., 1985). **3.** Solubilidade em detergentes: PrP<sup>SC</sup> é insolúvel em detergentes, enquanto PrP<sup>C</sup> é facilmente solúvel em condições não-desnaturantes (Meyer et al., 1986). **4.** Distribuição tecidual: os padrões de acúmulo de PrP<sup>SC</sup> no cérebro são diferentes da distribuição de PrP<sup>C</sup> (Taraboulos et al., 1992).

As diferenças estruturais entre as proteínas levaram à sugestão de que a conversão de  $\alpha$ -hélices em folhas  $\beta$  na formação de PrP<sup>SC</sup> seria um evento essencial na propagação da doença (Pan et al., 1993). A conversão de PrP<sup>C</sup> em PrP<sup>SC</sup> provavelmente ocorre na superfície celular e/ou ao longo da via endocítica através de um mecanismo de polimerização específico. Em uma primeira fase, agregados ordenados ou “sementes” de PrP<sup>SC</sup> se ligariam a PrP<sup>C</sup> e, em uma segunda fase, PrP<sup>C</sup> seria alterado conformacionalmente em mais PrP<sup>SC</sup>, através de um processo ainda pouco compreendido (Priola & Vorberg, 2006).

Posteriormente, a impossibilidade de infecção em camundongos nocautes para o gene Prnp demonstrou a necessidade da presença de PrP<sup>C</sup> e fortaleceu a hipótese de que a infecção ocorreria através da interação entre PrP<sup>C</sup> e a isoforma infectante PrP<sup>SC</sup> (Bueler et al., 1993). Porém, a primeira demonstração de que partículas infecciosas de prion poderiam ser geradas *in vitro*, veio no artigo de Castilla e

colaboradores em 2005. Neste trabalho foi utilizada a técnica de PMCA (do Inglês, *protein misfolding cyclic amplification*) que consiste na mistura de uma quantidade mínima de material infectante com homogenato de cérebro não infectado, em ciclos de diluição e sonicação. Ao final do processo são produzidas moléculas de PrP<sup>SC</sup> infectantes, em uma quantidade dependente do número de ciclos, como na reação em cadeia pela polimerase (PCR). Devido ao enorme número de diluições utilizadas as moléculas de PrP<sup>SC</sup> não apresentam traços do material infectante inicial, demonstrando sua origem a partir da conversão de PrP<sup>C</sup> em PrP<sup>SC</sup>. Este estudo mostrou ainda que as moléculas de PrP<sup>SC</sup> produzidas apresentam as mesmas propriedades estruturais e bioquímicas que a proteína associada à doença, e são capazes de infectar animais normais, levando a uma doença com características clínicas, histológicas e bioquímicas idênticas àquela produzida pelo agente infeccioso inicial.

Outro trabalho que contribuiu conceitualmente com a hipótese da conversão por interação entre proteínas, demonstra a produção *in vitro* de PrP<sup>SC</sup>, sem um núcleo inicial de material infectante, utilizando componentes mínimos que incluem moléculas de PrP<sup>C</sup> nativas altamente purificadas, moléculas lipídicas purificadas juntamente com PrP<sup>C</sup> e poliânions sintéticos, como moléculas de RNA poli(A), os quais estimulam a conversão espontânea de PrP<sup>C</sup> em PrP<sup>SC</sup> (Deleault et al., 2007). Esse tipo de conversão pode representar um equivalente *in vitro* da doença de Creutzfeldt-Jacob esporádica, a qual é aceita como uma forma espontânea de doença causada por prions em humanos (Caughey et al., 2009).

### 1.1.1. Encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs)

As doenças causadas por prion ou TSEs, são enfermidades neurodegenerativas fatais caracterizadas por perda do controle motor, demência e paralisia (Cordeiro et al., 2001). Em humanos, elas incluem a doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), a doença de Gerstmann-Sträussler-Scheiker (GSS), a insônia familiar fatal (Griffith, 1967) e o kuru. As TSEs também são observadas em animais, tendo sido primeiramente detectado o “*scrapie*” em ovelhas, e no gado bovino, a encefalopatia espongiforme bovina (BSE) (Jackson & Collinge, 2001). Outras espécies também podem ser acometidas com doenças causadas por prion, como alces (Spraker et al., 2004) e, após infecção experimental, hamsters e camundongos (Stockel et al., 1998).

Formas esporádicas da doença de Creutzfeldt-Jakob (sCJD) são os casos mais comuns de TSEs, com uma taxa de mortalidade de 1-2 casos por milhão de pessoas por ano, com um pico de incidência em indivíduos com 60-70 anos (Ladogana et al., 2005b). Cerca de 10 a 20 por cento dos casos de sCJD ocorrem em famílias, sendo observadas mutações na região codificadora do gene da proteína prion, Prnp, sugerindo uma doença monogênica, ao contrário da maioria das doenças neurodegenerativas (Ladogana et al., 2005a). Outras TSEs familiares mais raras também relacionadas a mutações no gene Prnp são a doença de Gerstmann-Sträussler-Sheinker e a insônia familiar fatal (Pocchiari et al., 2009).

As doenças causadas por prion também podem ter origem infecciosa, como na CJD iatrogênica (iCJD) e no kuru. A transmissão iatrogênica de CJD ocorreu principalmente devido à esterelização inapropriada de instrumentos neurocirúrgicos, e a transplantes de material contaminado, originado de cadáveres resultando em mais de 250 casos de CJD iatrogênica nos anos 70, com drásticas implicações para



a prática clínica (Aguzzi & Polymenidou, 2004). Já o kuru, doença encontrada na tribo dos Fore em Papua Nova Guiné, onde prions eram transmitidos por um ritual de canibalismo, está atualmente quase totalmente extinto (Collinge, 2008).

Com início em 1986, a epidemia de BSE afetou mais de 280.000 cabeças de gado, gerando uma crise econômica e sanitária mundial, devido à alimentação do gado com carne contaminada. Apesar de milhares de animais terem sido sacrificados na Europa e outras partes do mundo a transmissão de BSE para humanos ocorreu nos anos 90, causando a morte de 212 pessoas, a maioria jovem, em decorrência de uma nova doença causada por prion, a forma variante da CJD (vCJD) (Nuvolone et al., 2009; Will et al., 1996). Apesar da estabilização e diminuição na incidência de vCJD (Andrews et al., 2003), novos dados indicam a necessidade de maior vigilância e conhecimento sobre as TSEs. Nesse sentido, relatou-se a ocorrência de transmissão horizontal de vCJD por transfusão sanguínea (Aguzzi & Glatzel, 2006; Hewitt et al., 2006; Llewelyn et al., 2004), e a potencial existência de períodos longos de incubação. Nesse último caso, estão os trabalhos recentes sobre pacientes com kuru de Nova Guiné, indicando que heterozigose no códon polimórfico 129 (129 M/V) do gene *prnp* pode levar a períodos de incubação superiores a 50 anos (Collinge et al., 2006).

A neurodegeneração nas TSEs é caracterizada no sistema nervoso central (SNC) por modificações vacuolares em prolongamentos citoplasmáticos e corpos celulares de neurônios da substância cinzenta com perda neuronal, acompanhada de proliferação de astrócitos. A patologia também inclui ativação em larga escala e proliferação de células da microglia (Aguzzi & Heikenwalder, 2005). É observado ainda acúmulo de PrP<sup>Sc</sup> em tecidos neuronais, formando placas amilóides, e em alguns casos, acúmulo também em tecidos linfóides (Aucouturier & Carnaud, 2002).

### 1.1.2. Características gerais da proteína prion celular

PrP<sup>C</sup> é codificada por um único gene, Prnp, localizado no cromossoma 2 em camundongos e no cromossoma 20 em humanos (Flechsigg & Weissmann, 2004). Este gene apresenta dois éxons em hamsters e humanos, sendo que o segundo e o terceiro éxons, respectivamente, codificam a proteína inteira com aproximadamente 250 aminoácidos. O gene de PrP<sup>C</sup> foi encontrado em todos os vertebrados estudados, sendo altamente conservado (Rongyan et al., 2008; Wopfner et al., 1999). O promotor do gene Prnp não contém uma região *TATA Box*, mas uma região rica em GC, que se assemelha ao sítio de ligação ao fator de transcrição SP1 encontrado em genes *housekeeping* (Basler et al., 1986).

PrP<sup>C</sup> é uma proteína de superfície ligada à membrana através de uma âncora de GPI (glicosilfosfatidilinositol) e possui dois sítios de glicosilação (Stahl et al., 1987). Como revelado por sua estrutura atômica em ensaios de ressonância magnética nuclear (NMR), a molécula de PrP<sup>C</sup> madura contém um domínio carboxi-terminal globular bem definido que compreende os resíduos 127-231 (numeração para camundongos), consistindo de três  $\alpha$ -hélices e duas folhas  $\beta$  antiparalelas (Hornemann et al., 1997; Riek et al., 1997), além de uma região amino proximal menos definida estruturalmente, e que apresenta um trecho com cinco repetições de oito resíduos de aminoácidos (PHGGGWGQ), a qual contém sítios de ligação ao íon Cu<sup>2+</sup> (Riek et al., 1997). Outros sítios de ligação a Cu<sup>2+</sup> também foram sugeridos como os resíduos de histidina 96 e 111, adjacentes à região de repetição dos octapeptídeos (Jackson et al., 2001), além de histidinas no domínio C-terminal estruturado (Cereghetti et al., 2001; Colombo et al., 2008).

Estudos de NMR apresentam PrP<sup>C</sup> com uma estrutura monomérica. No entanto, dados obtidos a partir da cristalização de PrP<sup>C</sup> sugerem a dimerização da molécula

(Knaus et al., 2001). Dímeros de PrP<sup>C</sup> também foram sugeridos em outros trabalhos, que indicam o domínio interno hidrofóbico como um possível sítio de dimerização (Warwicker, 2000) que estaria implicado na proteção contra estresse oxidativo (Rambold et al., 2008).

Modificações pós-traducionais incluem acoplamento da âncora de GPI e adição de cadeias de oligosacarídeos em Asn 180 e/ou Asn 197 (Ermonval et al., 2003). A molécula de PrP<sup>C</sup> final pode não ser glicosilada ou ser mono ou di-glicosilada, com as três formas presentes nos tecidos onde PrP<sup>C</sup> é expressa, embora as proporções possam variar. Após a saída do complexo de Golgi, PrP<sup>C</sup> é transportada para a superfície celular, onde sua âncora de GPI permite sua entrada preferencialmente em domínios de *lipid rafts* (Stahl et al., 1987; Taylor & Hooper, 2006). Em neurônios, foi demonstrado que PrP<sup>C</sup> é continuamente reciclada entre a superfície celular e compartimentos endossômicos. Foi sugerido que PrP<sup>C</sup> saia dos *lipid rafts*, para regiões da membrana solúveis em detergente, entre em vesículas endocíticas, e recicle de volta para a superfície através de compartimentos perinucleares, todo o ciclo durando em torno de 6-10 minutos (Morris et al., 2006; Sunyach et al., 2003).

Além de ligada à membrana celular pela âncora de GPI, PrP<sup>C</sup> também pode ser encontrada no meio extracelular, como foi observado em linhagens celulares, nas quais em torno de 10-30% do pool de PrP<sup>C</sup> da superfície celular são liberados para o meio (Borchelt et al., 1993; Harris et al., 1993), e em culturas primárias de esplenócitos e neurônios, nas quais 60-70% das moléculas de PrP<sup>C</sup> ligadas a membrana são secretadas (Parizek et al., 2001). PrP<sup>C</sup> também pode ser liberada para o meio extracelular ou para outras células através de exossomas (derivadas de vesículas endossômicas) e microvesículas derivadas de membrana (Liu et al., 2002; Mattei et al., 2009; Porto-Carreiro et al., 2005). Em conjunto, estes fenômenos

podem explicar a presença de grandes quantidades de PrP<sup>C</sup> solúvel no plasma (Parizek et al., 2001; Volkel et al., 2001; Ward et al., 2009).

### *1.1.3. Ligantes e possíveis funções de PrP<sup>C</sup>*

Recentemente, PrP<sup>C</sup> foi sugerida como uma plataforma dinâmica na superfície celular que participaria da reunião de módulos de sinalização, a partir dos quais interações específicas com ligantes e vias de sinalização se traduziriam em uma ampla gama de conseqüências fisiológicas (Linden et al., 2008). Embora várias moléculas tenham sido propostas como ligantes de PrP<sup>C</sup>, apenas para algumas interações existem dados mais consolidados indicando respostas celulares deflagradas pela interação com PrP<sup>C</sup> (Figura 1.1). Alguns destes ligantes serão descritos a seguir.

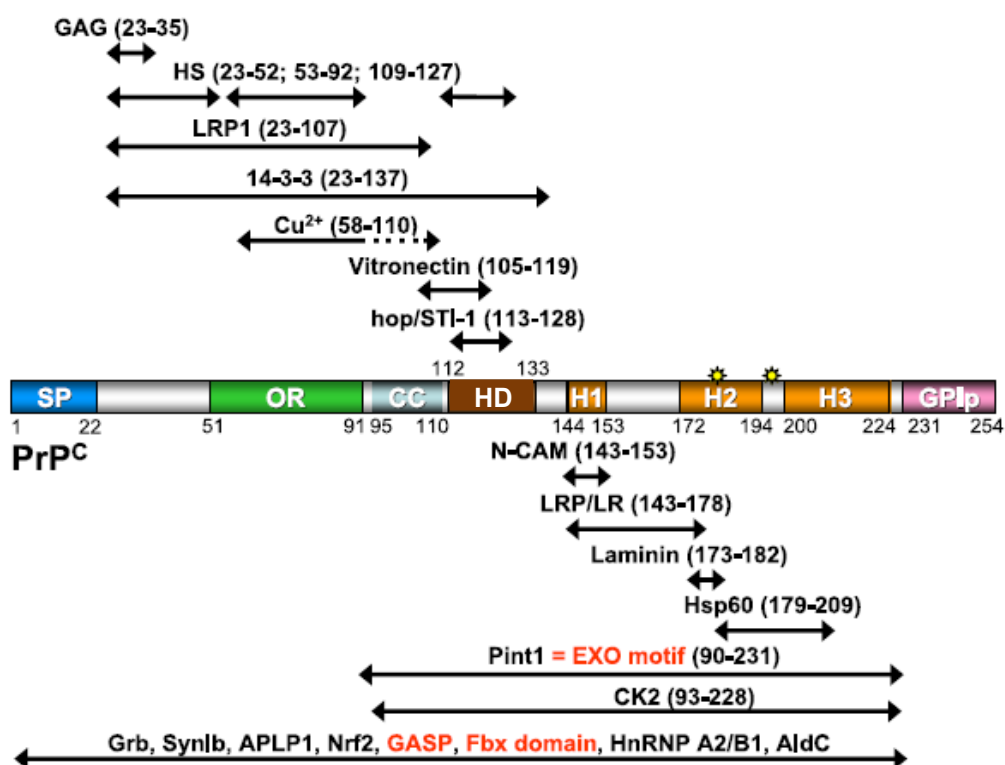
Utilizando a linhagem de neuroblastoma N2a ou células de rim transfectadas, foi demonstrada a interação de PrP<sup>C</sup> com o receptor de laminina de 37/67kDa, na superfície celular, assim como no interior da célula, tendo sido sugerida sua participação no tráfego intracelular de PrP<sup>C</sup> e na sua internalização a partir da membrana (Gauczynski et al., 2001; Nikles et al., 2008). Essa interação pode ocorrer diretamente entre as duas moléculas, ou ocorrer de forma dependente de heparan sulfato (Hundt et al., 2001). PrP<sup>C</sup> se liga a heparina e heparan sulfato através de pelo menos três domínios, um dos quais é o sítio de ligação entre o receptor de laminina e PrP<sup>C</sup>, dependente de heparan sulfato (Warner et al., 2002; Horonchik et al, 2005). Dessa forma foi sugerido um complexo formado por PrP<sup>C</sup>, o receptor de laminina de 37/67 kDa e heparan sulfato na superfície celular (Hundt et al., 2001). Outro ligante de PrP<sup>C</sup> também envolvido em adesão celular é a molécula de matriz extracelular vitronectina. Esta interação é importante no crescimento axonal: em camundongos

nocautes para PrP<sup>C</sup> foi observado um mecanismo compensatório em neurônios, que apresentam uma maior atividade da integrina  $\alpha v\beta 3$ , ligante de vitronectina (Hajj et al., 2007). Foi demonstrada ainda a formação de complexos entre PrP<sup>C</sup> e isoformas da molécula de adesão neuronal (NCAM) (Schmitt-Ulms et al., 2001). A importância dessa interação foi observada em processos como adesão celular e crescimento de neuritos (*neurite outgrowth*), sendo observado o recrutamento de NCAM para regiões de *rafts* de membrana e a ativação da quinase da família Src p59fyn após interação de NCAM com PrP<sup>C</sup> (Mange et al., 2002; Santuccione et al., 2005).

Entre os diversos ligantes já descritos, cobre está entre os mais aceitos, havendo um grande número de trabalhos que descrevem tal ligação e buscam seu papel fisiológico, o qual, no entanto ainda continua em debate (Davies & Brown, 2008). O íon  $Cu^{++}$  é essencial para o funcionamento de enzimas metabólicas importantes, porém na forma livre é altamente citotóxico, podendo gerar espécies reativas de oxigênio (Berlett & Stadtman, 1997). Muitos trabalhos sugerem que a função protetora de PrP<sup>C</sup> contra danos oxidativos, esteja relacionada a sua interação com  $Cu^{++}$ , funcionando como uma proteína ligadora de cobre na membrana e no transporte para o interior da célula. No entanto, os dados da literatura são conflitantes quanto à função de PrP<sup>C</sup> no metabolismo do cobre. Nesse sentido, observou-se que camundongos deficientes em PrP<sup>C</sup> apresentam menores concentrações intracelulares de  $Cu^{++}$  e níveis mais baixos de atividade Zn/Cu superóxido-dismutase (SOD) quando comparados a camundongos normais; além disso, cultivos de neurônios obtidos desses animais são mais sensíveis a estresse oxidativo do que neurônios selvagens, além de serem mais susceptíveis à morte por apoptose (Brown, 2001; Brown & Sassoon, 2002). Também foi observado que PrP<sup>C</sup> recombinante remodelada na presença de  $Cu^{++}$  apresenta atividade de SOD (Brown,

1999). Estes dados são debatidos por outros autores, que não encontraram atividade de SOD diminuída em camundongos PrP<sup>C</sup> nocautes (Waggoner et al., 2000), nem atividade SOD em PrP<sup>C</sup> recombinante (Jones et al., 2005; Sakudo et al., 2003) ou mesmo em animais superexpressando PrP<sup>C</sup>, cruzados com animais deficientes ou superexpressando SOD (Hutter et al., 2003).

Outra possibilidade é que PrP<sup>C</sup> funcione como uma proteína de ligação a Cu<sup>++</sup> (Stockel et al., 1998), podendo tal ligação estar relacionada à internalização de PrP<sup>C</sup> após exposição a Cu<sup>++</sup>, gerando sinal para início de defesa antioxidante (Vassallo & Herms, 2003). Níveis reduzidos de enzimas antioxidantes já foram observados em neurônios deficientes em PrP<sup>C</sup> (White et al., 1999). Por outro lado, a expressão aumentada de PrP<sup>C</sup> parece aumentar tais defesas antioxidantes (Rachidi et al., 2003), ao passo que estresse oxidativo e exposição a cobre induzem aumento na expressão de PrP<sup>C</sup> (Brown & Besinger, 1998; Varela-Nallar et al., 2006). Estas mudanças podem constituir mecanismos alternativos de resistência a estresse oxidativo dependente de PrP<sup>C</sup>. Dessa forma, embora a ligação de cobre a PrP<sup>C</sup> pareça ser importante na resistência celular a estresse oxidativo, os mecanismos ainda são controversos (Linden et al., 2008).



**Figura 1.1. Ligantes da proteína príon celular.** A seqüência traduzida de PrP<sup>C</sup> está esquematizada como uma forma de bastão (rodlike shape), com domínios principais mostrados em cores (números para resíduos de aminoácidos como para PrP<sup>C</sup> de camundongo). SP – peptídeo sinal; OR – domínio de repetição de octapeptídeo; CC – *cluster* carregado; HD – domínio hidrofóbico; H1, H2, H3 – domínios de alfa hélices; GPIp – peptídeo de sinalização para ligação a âncora de GPI. Estrelas amarelas indicam a posição de resíduos de glicosilação nos aminoácidos 180 e 196. Cada ligante está indicado junto com os resíduos de aminoácidos que contêm que os domínios de ligação no PrP<sup>C</sup> de camundongo. GAG – glicosaminoglicanas; HS – heparan sulfato; LRP1 – low-density lipoprotein related protein; LRP – proteína precursora do receptor de laminina; LR – receptor de laminina; Pint1 – prion protein interactor 1; EXO – domínio de exonucleases; CK2 – caseína quinase 2; Grb – growth factor receptor-bound protein/ Syn1b – synapsin 1b; APLP1 – amyloide precursor-like protein 1; Nrf2 – nuclear factor E2-related factor-2; GASP – G protein-coupled receptor-associated sorting protein; Fbx – F-box only; HnRNP – heterogeneous nuclear ribonucleoprotein; AldC – aldolase C/zebrin. Dados de proteínas humanas, de hamsters ou gado bovino foram transpostos para seqüências de camundongos. Modificado a partir de Linden *et al*, 2008.

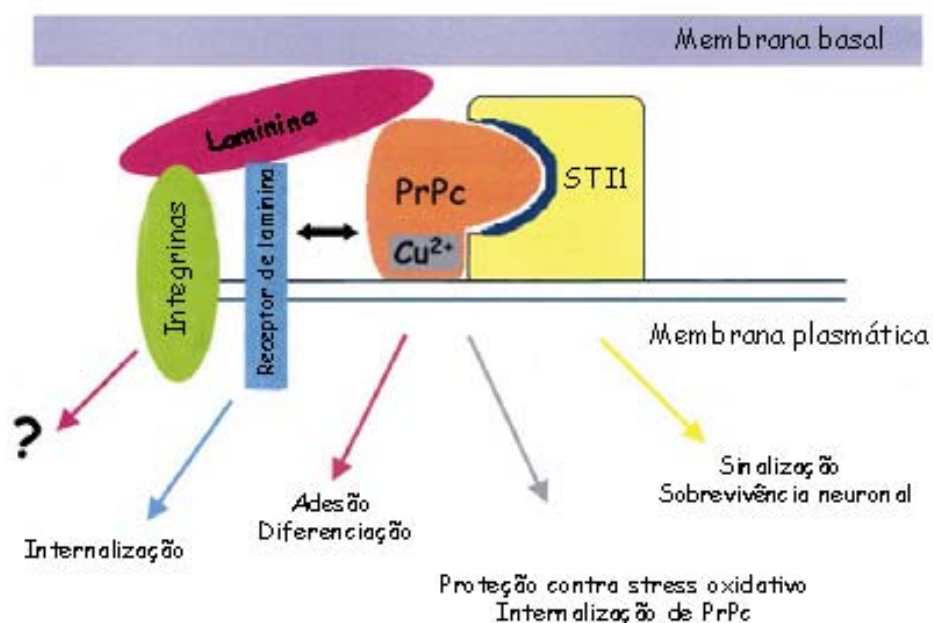
Outra interação de PrP<sup>C</sup> com conseqüências fisiológicas importantes ocorre com a proteína 1 induzida por estresse (do Inglês stress-inducible protein-1, STI-1) também conhecida como co-chaperona organizadora de Hsp70/Hsp90 (Hop). Esta proteína de choque térmico foi primeiramente descrita formando um complexo macromolecular com as proteínas da família das chaperonas Hsp70 e Hsp90 (Scheufler et al., 2000). A descoberta da interação de STI-1 com PrP<sup>C</sup> ocorreu através da produção de um peptídeo (PrR) capaz de interagir com PrP<sup>C</sup> com alta afinidade, desenhado a partir da teoria de hidropatia complementar. Utilizando este peptídeo foi produzido um antissoro, o qual reconheceu uma única proteína ligadora de PrP<sup>C</sup> em extratos cerebrais (Martins et al., 1997), posteriormente identificada como a proteína STI-1 (Zanata et al., 2002). Foi demonstrado que a interação PrP<sup>C</sup>/STI-1 atua tanto na diferenciação neuronal, utilizando neste processo a via de MAPK, quanto na sobrevivência neuronal, utilizando para isso a via de PKA (Chiarini et al., 2002; Lopes et al., 2005; Zanata et al., 2002). Outro dado que reforça a participação de PrP<sup>C</sup> e seu ligante STI-1 na sobrevivência neuronal mostra que estas duas proteínas são produzidas como fatores solúveis por culturas primárias de astrócitos, sendo importantes na sobrevivência neuronal, em modelos de co-cultura (Lima et al., 2007).

Também foi demonstrada a interação de PrP<sup>C</sup> com a molécula de matriz extracelular laminina. Tal interação é específica e saturável, apresentando uma alta afinidade (maior mesmo do que a interação de laminina com integrinas) com um Kd de  $2 \times 10^{-8}$  M (Graner et al., 2000a). PrP<sup>C</sup> se liga à porção C-terminal da cadeia  $\gamma$ -1 de laminina (Graner et al., 2000a), e laminina interage com a região entre os aminoácidos 173 e 182 de PrP<sup>C</sup> (Coitinho et al., 2006). Funcionalmente, esta interação modula a adesão



neuronal e a extensão e manutenção de neuritos estimulada por laminina (Graner et al., 2000a; 2000b). Esta interação está ainda relacionada à consolidação da memória, sendo essa função mediada pela ativação das vias de sinalização de PKA e ERK1/2 (Coitinho et al., 2006). O mesmo grupo também demonstrou a importância da interação PrP<sup>C</sup>-laminina na relação de astrócitos com neurônios (Lima et al., 2007). Nesse trabalho, observou-se que astrócitos obtidos de camundongos selvagens promovem um maior nível de neuritogênese, quando comparados a astrócitos obtidos de camundongos nocautes para PrP<sup>C</sup>. Este efeito poderia ser decorrente do diferente padrão de deposição de laminina entre os astrócitos dos dois camundongos, apresentando um padrão fibrilar nos selvagens e uma distribuição pontual nos nocautes. Como PrP<sup>C</sup> e laminina são expressos também em outros tecidos, além do SNC, é possível que a ligação entre as duas moléculas seja importante em outros sistemas biológicos, entre os quais o sistema imune, o qual guarda diversas similaridades com o sistema nervoso (Savino & Dardenne, 1995; 2000).

Tendo em vista os dados discutidos acima, vemos que PrP<sup>C</sup> atua em processos como proteção contra estresse oxidativo, adesão celular, diferenciação, sinalização e sobrevivência neuronal, em função de suas interações com os diferentes ligantes. Dessa forma é possível que PrP<sup>C</sup> faça parte de um complexo multiprotéico, e devido à sua localização, possa fazer a conexão de sinais oriundos da matriz extracelular com o interior da célula, como ilustrado na Figura 1.2.



**Figura 1.2. Complexo proteico multi-funcional envolvendo a proteína prion celular.** Estão representadas no esquema, interações de PrP<sup>C</sup> com alguns de seus ligantes como laminina, STI-1, íon cobre (Cu<sup>++</sup>) e receptor de laminina. A participação de integrinas em tal complexo ainda não foi comprovada experimentalmente (Martins et al., 2002).

#### 1.1.4. Distribuição tecidual da proteína prion celular

O principal sítio de expressão de PrP<sup>C</sup> é o sistema nervoso central, onde é encontrada em regiões como córtex cerebral, hipocampo, núcleo estriado, bulbo olfatório, hipotálamo, cerebelo e tronco cerebral (Bendheim et al., 1992; Lemaire-Vieille et al., 2000). No entanto, seu conteúdo varia entre regiões distintas do cérebro, entre tipos celulares diferentes, e entre neurônios com fenótipos neuroquímicos distintos. Foi demonstrada expressão de PrP<sup>C</sup> em neurônios, microglia e astrócitos, embora expressão na glia não tenha sido observada por todos os grupos (Ford et al., 2002; Laine et al., 2001). A expressão de PrP<sup>C</sup> no corpo celular de neurônios e em prolongamentos citoplasmáticos distais, sugere que a

molécula possa trafegar no interior dos neurônios (Stahl et al., 1987; Stockel et al., 1998).

PrP<sup>C</sup> também é encontrada em diversos outros tecidos como no coração, músculos estriados, pâncreas, pulmão, testículos, útero e rins (Bendheim et al., 1992; Horiuchi et al., 1995; Lemaire-Vieille et al., 2000). Após vasta investigação sobre o nível de RNAm e de proteína PrP<sup>C</sup> em diversos órgãos, Ford e colaboradores sugerem que embora presente em diferentes tecidos, sua expressão em altos níveis é observada apenas em discretas subpopulações celulares. Entre tais subpopulações se destacam aquelas envolvidas em interações neuroimunes, incluindo pequenos nervos aferentes na pele e lâmina própria do trato aéreo e digestivo, gânglios e nervos simpáticos, células dendríticas, células dendríticas foliculares e subpopulações de linfócitos ativados particularmente na pele, intestino e tecido linfóide associado aos brônquios (Ford et al., 2002).

#### *1.1.5. Sistema imune e proteína prion celular*

A relação entre prions e sistema imune é complexa. A falta de uma resposta imune clara nas TSEs é vista como tolerância a PrP<sup>SC</sup>, já que possui a mesma seqüência de aminoácidos que a isoforma constitutiva PrP<sup>C</sup>. Além disso, o sistema imune contribui para a patogênese através da amplificação dos níveis de prion nos compartimentos linfóides, e através da possível participação de células do sistema imune como uma das vias de acesso de PrP<sup>SC</sup> ao SNC (Aguzzi et al., 2008). Dessa forma, estudos sobre PrP<sup>C</sup> no sistema imune podem levar a novos conhecimentos sobre a patogenia periférica das doenças causadas por prion, além de desvendar as funções dessa molécula no sistema imune (Isaacs et al., 2006).

#### 1.1.5.1. Expressão de PrP<sup>C</sup> no sistema imune

Vários trabalhos apontam para a importância de PrP<sup>C</sup> na fisiologia do sistema imune (Isaacs et al., 2006). Na medula óssea a expressão dessa molécula já foi demonstrada em células progenitoras iniciais, megacariócitos, monócitos e granulócitos em diferenciação (Ford et al., 2002; Liu et al., 2001). Um trabalho muito interessante sugere PrP<sup>C</sup> como um marcador de células tronco hematopoiéticas (HSCs) murinas com maior potencial de auto-renovação, além de mostrar que HSCs obtidas de camundongos nocautes para o gene Prnp ( $Prnp^{0/0}$ ) apresentam menor potencial de auto-renovação após transplantes em camundongos irradiados (Zhang et al., 2006). HSCs humanas CD34<sup>+</sup> também expressam PrP<sup>C</sup>, embora linfócitos e monócitos mantenham esta expressão após diferenciação em células maduras, enquanto que em granulócitos a expressão de PrP<sup>C</sup> diminui durante a diferenciação (Dodelet & Cashman, 1998). De forma semelhante, precursores de granulócitos CD43<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> obtidos de medula óssea murina expressam PrP<sup>C</sup>, ao passo que neutrófilos maduros não (Liu et al., 2001). Por outro lado, o amadurecimento de monócitos e células dendríticas leva a um aumento na expressão de PrP<sup>C</sup> (Burthem et al., 2001; Durig et al., 2000; Martinez del Hoyo et al., 2006). Em conjunto esses dados sugerem que durante o desenvolvimento das diferentes populações leucocitárias a expressão de PrP<sup>C</sup> possa ser regulada de forma específica para cada população, indicando assim uma possível função no desenvolvimento dessas células.

Em órgãos linfóides secundários a expressão de PrP<sup>C</sup> está relacionada principalmente a células dendríticas foliculares (as quais expressam altos níveis),

células dendríticas e granulócitos (Cordier-Dirikoc et al., 2008; Ford et al., 2002). Em camundongos foi sugerida uma expressão diferencial de PrP<sup>C</sup> durante o desenvolvimento de linfócitos, sendo observada maior expressão em linfócitos T em desenvolvimento no timo e em precursores de linfócitos B na medula óssea. A expressão de PrP<sup>C</sup> em linfócitos maduros do baço e linfonodos é mais restrita, onde 10-15% de células B maduras, 10-15% de células T CD4<sup>+</sup> e 5-7% de células T CD8<sup>+</sup> expressam PrP<sup>C</sup> em suas superfícies (Kubosaki et al., 2001; Liu et al., 2001). No entanto, em humanos, a expressão de PrP<sup>C</sup> em linfócitos T e B no sangue é alta, havendo um aumento dos níveis de PrP<sup>C</sup> com a idade (Li et al., 2001; Politopoulou et al., 2000). A expressão de PrP<sup>C</sup> é maior em linfócitos T sangüíneos, que em linfócitos B, enquanto células CD8<sup>+</sup> expressam PrP<sup>C</sup> em níveis um pouco mais altos do que linfócitos CD4<sup>+</sup> (Durig et al., 2000; Politopoulou et al., 2000). A expressão de PrP<sup>C</sup> também é maior em células de memória CD45RO<sup>+</sup>, em comparação a linfócitos T virgens CD45RA<sup>+</sup> (Li et al., 2001). Ainda em humanos, PrP<sup>C</sup> foi descrita em células NK (natural killer), plaquetas, monócitos, células dendríticas e células dendríticas foliculares (Isaacs et al., 2006), tendo sido observado aumento de expressão particularmente durante diferenciação de células NKT humanas (Durig et al., 2000).

#### 1.1.5.2. Funções de PrP<sup>C</sup> no sistema imune

A participação de PrP<sup>C</sup> no processo de ativação de linfócitos T e no controle da resposta imune tem sido sugerida por diversos autores. Foi demonstrado que durante a ativação de linfócitos T, ocorre aumento na expressão de PrP<sup>C</sup> após estímulo com mitógenos como concanavalina A (ConA), fitohemaglutinina ou anticorpos anti-CD3, ao passo que a proliferação e ativação estimulada por mitógenos é inibida na presença de anticorpos anti-PrP<sup>C</sup> (Cashman et al., 1990; Li et

al., 2001). Nesse sentido, PrP<sup>C</sup> foi recentemente sugerido como marcador de ativação tardia de células T (Ingram et al., 2009).

Por outro lado, PrP<sup>C</sup> pode também ser importante na indução de respostas de células T por APCs, já que células dendríticas que não expressam PrP<sup>C</sup> apresentam menor capacidade de induzir a proliferação de células T (Ballerini et al., 2006). O que está de acordo com o aumento da expressão de PrP<sup>C</sup> em células dendríticas após ativação, juntamente com outros marcadores de ativação como molécula MHC de classe II e CD86 (Ballerini et al., 2006; Martinez del Hoyo et al., 2006).

A co-localização de PrP<sup>C</sup> com moléculas presentes no complexo TCR é um tema ainda em debate. Alguns trabalhos mostram sua co-localização e/ou imunoprecipitação com moléculas como Fyn, Lck, Zap-70 e CD3 (Mattei et al., 2004; Stuermer et al., 2004; Paar et al., 2007). Outros estudos apresentaram resultados diferentes: Ballerini e colaboradores (2006) descreveram que embora PrP<sup>C</sup> se acumule em sítios de contato célula T-célula dendrítica durante estímulo via MHC, ele não se co-localize com CD3, LFA-1 (leucocyte function antigen), CD43, LAT (linker for activation of T cells) ou Thy1 (CD90). Além disso, foi demonstrado que o silenciamento na expressão de PrP<sup>C</sup> por siRNA (do Inglês *small interference RNA*) não teve efeito sobre a formação de sinapse imunológica em células T Jurkat (Paar et al., 2007). Assim, a co-localização de PrP<sup>C</sup> com componentes do TCR pode refletir um efeito não específico de formação de agregados moleculares por ativação de componentes dos *lipid rafts*, mais do que uma função específica de PrP<sup>C</sup> na sinapse imunológica.

Dados *in vitro* utilizando linhagens de camundongos nocautes para PrP<sup>C</sup> também divergem quanto a necessidade da molécula para a ativação de células T. O primeiro artigo, o qual utilizou a linhagem de camundongos nocaute denominada

Zurich I descreveu respostas a Con A normais (Bueler et al., 1992). Posteriormente, outro estudo descreveu uma proliferação reduzida nos linfócitos T do mesmo camundongo nocaute (Mazzoni et al., 2005). Além disso, estudos utilizando uma segunda linhagem de camundongo nocaute também divergem. Mabbott e colaboradores (1997) observaram resposta diminuída de esplenócitos frente à Con A, enquanto respostas proliferativas normais após ativação com Con A ou anti-CD3, em linfócitos T da mesma linhagem foram observadas por outro grupo (Liu et al., 2001).

Recentemente, experimentos *in vivo* utilizando os camundongos Zurich I geraram dados mais contundentes sobre a função de PrP<sup>C</sup> no sistema imune. Em um modelo de sepse causada por *Streptococcus pyogenes*, esses camundongos nocautes apresentaram uma maior contagem bacteriana no sítio de infecção do que animais controle. Tal aumento pode estar relacionado a um menor aporte de neutrófilos. Este evento é sugerido pela diminuição nos níveis séricos da quimiocina KC, a qual apresenta quimioatração para neutrófilos (Ingram et al, 2009). Além disso, em outro estudo, utilizando um modelo de peritonite induzida por zimozan, também foi encontrado em camundongos nocautes, um menor aporte de neutrófilos ao sítio inflamatório (de Almeida et al, 2005), indicando que PrP<sup>C</sup> possa estar envolvida no controle da migração leucocitária.

No entanto, de forma aparentemente contraditória, Ingram e colaboradores (2009) observaram ainda que esses mesmos animais nocautes apresentavam bacteremia reduzida, acompanhada por uma menor produção de citocinas inflamatórias. Como discutido pelos autores, nesse modelo de sepse os superantígenos do *S. pyogenes* induzem uma grande produção de citocinas inflamatórias, que levam ao choque. Nos camundongos nocautes, foi observada uma menor produção de citocinas

inflamatórias, o que poderia estar protegendo o animal nesse modelo (Ingram et al, 2009). Dados do nosso laboratório mostram uma maior taxa de sobrevivência entre os camundongos Prnp<sup>0/0</sup> à infecção pelo *Trypanossoma cruzi* do que entre os animais controle, e bem maior do que entre os animais super-expressando PrP<sup>C</sup> (Berbert LR et al, dados ainda não publicados). Esses dados podem estar relacionados à maior capacidade fagocitária de macrófagos obtidos dos camundongos Prnp<sup>0/0</sup> (de Almeida et al, 2005).

Adicionalmente, dois estudos no modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE) observaram exacerbação da doença nos camundongos Prnp<sup>0/0</sup> (Ingram et al., 2009; Tsutsui et al., 2008). No artigo de Tsutsui e colaboradores, uma análise mais detalhada mostra um aumento no infiltrado inflamatório (com presença de células CD3<sup>+</sup>) e na produção de citocinas inflamatórias, em comparação aos camundongos controle.

Esses trabalhos sugerem que PrP<sup>C</sup> seja uma molécula envolvida no controle da resposta imune, e mostram ainda o grau de complexidade nas relações intercelulares em que essa molécula pode estar envolvida *in vivo* (Tsutsui et al., 2008). A tabela 1 resume os dados atualmente disponíveis sobre expressão e papel funcional da PrP<sup>C</sup> no sistema imune.

#### 1.1.6. Proteína prion celular no timo

A expressão de PrP<sup>C</sup> no timo foi demonstrada tanto no microambiente tímico, quanto em timócitos. No compartimento microambiental, PrP<sup>C</sup> foi detectado em células epiteliais tímicas do córtex e mais intensamente em células epiteliais tímicas da medula (Ford et al., 2002), além de células dendríticas CD8<sup>+</sup> (Martinez del Hoyo et al., 2006).



**Tabela 1.1. Distribuição celular e possíveis funções de PrP<sup>C</sup> no sistema imune.**

Tipo celular	Função	Mecanismos	Referências
Células tronco hematopoiéticas	Auto-renovação de longa duração	Transdução de sinais de sobrevivência; <i>Homing</i> de células-tronco via adesão ao estroma da medula óssea	Zhang et al, 2006
Timócitos	Diferenciação	Ligação de cobre no timo	Jouvin-Marche et al, 2006
Linfócitos T	Ativação	Aumento na expressão de PrP <sup>C</sup> após ativação do complexo TCR Co-localização com moléculas de sinalização	Cashman et al, 1990; Ingram et al, 2009  Stuemer et al, 2004; Mattei et al, 2004
Células dendríticas	Apresentação de antígenos	Estabilização de sinapse imunológica	Ballerini et al, 2006; Paar et al, 2007
Macrófagos	Fagocitose	Transdução de sinais PrP <sup>C</sup> modula negativamente a fagocitose	de Almeida et al, 2005
Neutrófilos	Diferenciação  Resposta inflamatória	Expressão de PrP <sup>C</sup> em precursores PrP <sup>C</sup> altera recrutamento para sítio de inflamação	Dodelet & Cashman, 1998 de Almeida et al, 2005

Quanto à expressão de PrP<sup>C</sup> em timócitos, existem alguns dados divergentes na literatura. Kubosaki e colaboradores (2001) descreveram a expressão de PrP<sup>C</sup> em timócitos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> e em timócitos fetais. No entanto, analisando timócitos totais, Liu e colaboradores (2001) relataram a expressão de PrP<sup>C</sup> na maior parte dos timócitos. Mais recentemente, Jouvin-Marche e colaboradores (2006) observaram timócitos expressando PrP<sup>C</sup> em todas as subpopulações analisadas. As diferenças em relação ao primeiro trabalho podem ser decorrentes do uso de diferentes clones de

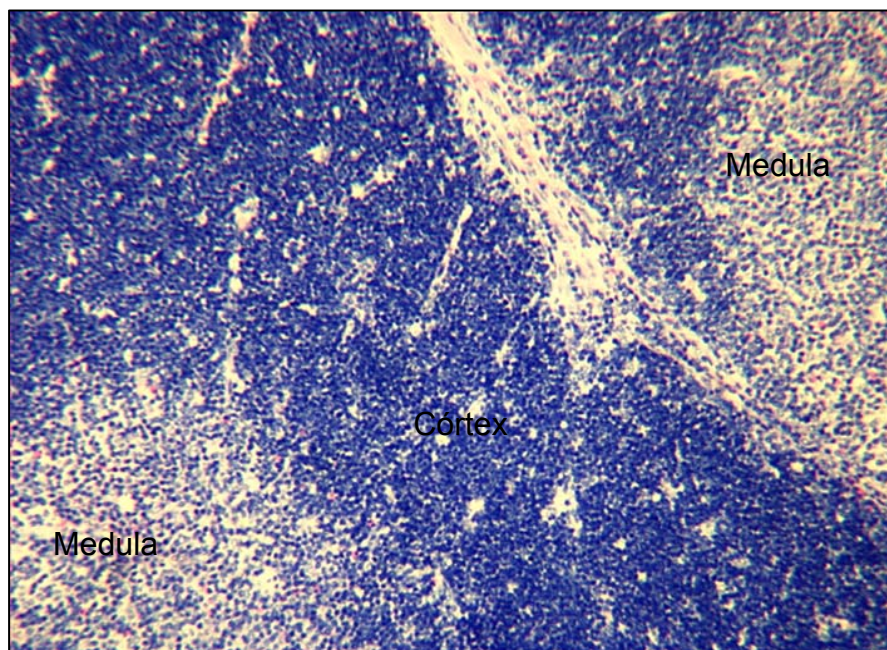
anticorpos anti-PrP<sup>C</sup>, já tendo sido demonstrado que clones diferentes podem não reconhecer o mesmo tipo celular, provavelmente devido à disponibilidade de seus epítomos específicos (Li et al., 2001).

Como discutido anteriormente, a função de PrP<sup>C</sup> ainda não está completamente elucidada. No entanto, vários trabalhos indicam sua importância na proteção contra estresse oxidativo, além de sua provável função no sistema imune em diferentes eventos como ativação de células T, fagocitose e migração. No timo, todos esses processos estão envolvidos na maturação de linfócitos T, sugerindo a participação de PrP<sup>C</sup> na fisiologia do órgão. Além disso, a expressão de PrP<sup>C</sup>, tanto em células do microambiente tímico quanto na superfície de timócitos, fortalecem ainda mais um possível papel funcional de PrP<sup>C</sup> em processos essenciais como a diferenciação e migração de linfócitos T no timo.

## **1.2. Timo**

O timo é um órgão linfóide primário que possui um microambiente especializado na diferenciação e maturação de linfócitos T. Na fase adulta, células precursoras derivadas da medula óssea chegam ao timo e passam por um complexo processo de seleção e maturação, ao fim do qual ocorre a migração de timócitos positivamente selecionados para áreas T dependentes nos órgãos linfóides secundários, tais como baço, linfonodos, placas de Peyer e tonsilas. Esse processo inclui a expressão seqüencial de vários marcadores de membrana, como por exemplo as moléculas acessórias CD4 e CD8, além de rearranjos de genes envolvidos na geração do chamado receptor clonal de célula T (TCR) (Ciofani & Zuniga-Pflucker, 2007; Savino & Dardenne, 2000).

O timo está localizado no mediastino superior, sobreposto ao coração. É um órgão bilobado que apresenta uma cápsula de tecido conjuntivo, a partir da qual se estendem septos para o interior do órgão, os quais irão delimitar os lóbulos tímicos. Estes são constituídos por uma região mais densa e periférica denominada córtex, a qual possui grande número de linfócitos imaturos (timócitos) em diferentes estágios de diferenciação, e uma região mais interna, denominada medula, onde se completa o processo de diferenciação dos timócitos (Figura 1.3). Entre esses dois compartimentos, encontra-se a junção córtico-medular, demarcada por grandes vasos os quais vêm acompanhando os septos que penetram no órgão a partir da cápsula. Em indivíduos adultos, é a partir dos vasos localizados na região córtico-medular, que células precursoras oriundas da medula óssea penetram no órgão (Petrie & Zuniga-Pflucker, 2007).



**Figura 1.3. Seção histológica de timo mostrando as regiões de córtex e medula.** Na figura, é possível visualizar uma região de córtex, onde ocorre maior densidade celular, e duas regiões de medula, onde se observa menor densidade celular (Obtido a partir de Contreiras et al., 2004).

### 1.2.1. Microambiente tímico

O microambiente tímico é composto por células epiteliais tímicas (TECs), macrófagos, células dendríticas, fibroblastos, células endoteliais, etc, e por diferentes proteínas de matriz extracelular produzidas pelas células do estroma (Anderson et al., 2006; Ciofani & Zuniga-Pflucker, 2007; Savino et al., 2003).

As TECs constituem a maioria das células presentes no microambiente tímico e, sendo interconectadas por desmossomas, formam uma rede tridimensional preenchida por timócitos em diferenciação (Nitta et al., 2008; Savino & Dardenne, 2000). O epitélio tímico é um tecido heterogêneo em termos morfológicos, fenotípicos e funcionais. As subpopulações de TECs podem ser identificadas pela sua localização e pela expressão diferencial de citoqueratinas e outros marcadores. Fenotipicamente, TECs corticais são caracterizadas pela expressão de citoqueratina (CK)-8, EpCAM1 (do Inglês *Epithelial-cell-adhesion molecul 1*) e Ly51, expressando ainda as moléculas MHC de classe I e II (Anderson et al., 2007; Derbinski et al., 2001). Estas células estão relacionadas aos eventos de seleção positiva, apresentando neste sentido capacidade de processamento e apresentação de antígenos, além de atividade proteossômica necessária para a seleção positiva de células T CD8<sup>+</sup> (Nedjic et al., 2008; Rezzani et al., 2008). Dentre as TEC corticais, foram identificados alguns padrões morfológicos distintos. De especial interesse, foram observados na região subcapsular tipos especializados de microambientes que são equivalentes estruturais ao complexo linfoepitelial *nurse*. As chamadas células *nurse* do timo (TNC) correspondem a estruturas multicelulares complexas formadas por uma célula epitelial tímica, a qual, em camundongos, é capaz de albergar de 20 a 200 timócitos (revisado em Villa-Verde et al., 1995).

As TECs medulares apresentam fenótipo EpCAM+Ly51-, e também expressam moléculas como CK5, MTS10, e ER-TR5 (Anderson & Jenkinson, 2001; van Ewijk, 1988), além de MHC de classe I e II. São células mais volumosas, com formato oval, curtas extensões citoplasmáticas e que apresentam muitas organelas no citoplasma. O desenvolvimento e organização anormal de TECs medulares são freqüentemente associados à auto-imunidade (Naquet et al., 1999).

Além das TECs, outras células estromais são também encontradas no microambiente tímico, tais como células dendríticas, que possuem origem hematopoiética, e estão localizadas na região córtico-medular e na medula (Barclay & Mayrhofer, 1981; van Ewijk, 1988). Já macrófagos, que também possuem origem hematopoiética, se localizam no córtex e na medula, estando envolvidos na fagocitose de células apoptóticas (Ciofani & Zuniga-Pflucker, 2007). Dados da literatura têm sugerido que células dendríticas e também macrófagos estejam envolvidos no processo de seleção negativa de timócitos (Milicevic & Milicevic, 2004; Wu & Shortman, 2005).

Foi demonstrado que células de origem hematopoiética participam no processo de seleção de clones auto-reativos para antígenos próprios que entram no timo através da corrente sangüínea, enquanto TEC medulares estão envolvidas na seleção negativa no caso de antígenos próprios expressos constitutivamente no timo (Klein et al., 2001). Além disso, a geração de camundongos expressando moléculas MHC apenas em células não-hematopoiéticas resultou na geração de células T auto-reativas, devido à ausência de seleção negativa por células originadas da medula óssea (Laufer et al., 1996).

As células mesenquimais derivadas da crista neural formam outro importante componente celular do microambiente tímico. Essas células contribuem para a

formação da cápsula e dos septos, e podem também estar localizadas no córtex tímico, onde interagem com timócitos imaturos (Anderson et al., 1997; Suniara et al., 2000). Alguns trabalhos demonstraram que o mesênquima possui um papel fundamental no desenvolvimento do timo através de dois mecanismos: influenciando diretamente o crescimento e desenvolvimento das TEC presentes no início do desenvolvimento tímico (Gray et al., 2007; Jenkinson et al., 2003), ou influenciando o desenvolvimento inicial de precursores de células T (Anderson et al., 1997).

Além dos componentes celulares, o microambiente tímico também é formado por uma rede tridimensional de glicoproteínas e proteoglicanas que compõem a rede de matriz extracelular. Estas proteínas formam um complexo macromolecular que contribui com pontos de ancoragem para as células do microambiente e timócitos. São importantes moléculas sinalizadoras que participam no desenvolvimento de timócitos através de eventos de diferenciação, adesão, migração, proliferação e ativação celular (Savino et al., 1993; 2004). Além disso, diferentes fatores de crescimento, quimiocinas e hormônios podem estar associados à rede de matriz extracelular, representando um importante fator de regulação no processo de diferenciação intratímica de linfócitos (Mendes-da-Cruz et al., 2008; Savino et al., 2002; 2004).

### *1.2.2. Diferenciação intratímica de linfócitos T*

Funcionalmente, o timo é um órgão linfóide primário que possui um microambiente especializado no qual ocorre a diferenciação de linfócitos T. Entretanto, os progenitores de células T no timo não são capazes de sustentar seu desenvolvimento indefinidamente, sendo necessária a constante entrada de progenitores hematopoiéticos vindos da medula óssea (Bhandoola & Sambandam,

2006). A cinética de entrada desses precursores é caracterizada por curtos períodos de receptividade intercalados por períodos refratários mais longos (Foss et al., 2001). No entanto, a caracterização desses precursores ainda é bastante controversa.

Muitos progenitores da medula óssea têm potencial para se diferenciar em células T sob estímulos adequados. Tais células são classificadas fenotipicamente como progenitores LSK ( $\text{Lin}^- \text{SCA-1}^+ \text{KIT}^{\text{hi}}$ ), pois, embora não expressem marcadores de diferenciação de linhagens celulares maduras, expressam o antígeno de células tronco (SCA-1, do Inglês *stem cell antigen 1*) e o receptor CD117 (KIT), que se liga ao fator derivado de células tronco (SCF, do Inglês *stem cell factor*) (Bhandoola & Sambandam, 2006). Estes precursores incluem: as células-tronco hematopoiéticas (HSC, do Inglês *hematopoietic stem cells*), que podem originar todas as linhagens celulares sangüíneas e possuem habilidade de se auto-renovar (Morrison et al., 1995); o progenitor multipotente (MPP, do Inglês *multipotential progenitor*), que pode originar todas as linhagens hematopoiéticas, mas não tem capacidade de auto-renovação (Adolfsson et al., 2001; Christensen & Weissman, 2001); o progenitor linfóide comum (CLP, do Inglês *common lymphocyte progenitor*), que foi originalmente identificado como comprometido com a linhagem linfóide (Kondo et al., 1997); e células derivadas do CLP (Balciunaite et al., 2005; Martin et al., 2003). Entretanto, ainda não está claro o quanto cada uma destas células seria fisiologicamente capaz de colonizar o timo a partir da corrente sangüínea. A identificação do CLP foi vinculada à capacidade destas células em originar células T in vivo, sugerindo que essa população de progenitores poderia ser a população imediatamente precursora dos timócitos (Kondo et al., 1997). Entretanto, o modelo proposto contrasta com uma teoria alternativa onde os MPP seriam a principal fonte

de origem dos timócitos (Bhandoola et al., 2007). Trabalhos recentes têm demonstrado que os CLP rapidamente adotam o fenótipo DN1 após sua entrada no timo (Karsunky et al., 2008; Schwarz et al., 2007). Contudo, após a entrada no timo os progenitores, sejam eles CLPs ou MPPs, irão receber sinais específicos deste microambiente que os levarão a migrar e seguir diferentes etapas de diferenciação dentro do órgão. A entrada no timo ocorre através de vênulas pós-capilares localizadas da região córtico-medular (Lind et al., 2001). Após a entrada dos precursores linfóides no timo estes irão se diferenciar em células T maduras. Durante este processo ocorre a expressão seqüencial de vários marcadores de membrana, além de rearranjos de genes envolvidos na geração do TCR. A expressão das moléculas CD4 e CD8 permite a identificação de subpopulações de timócitos com diferentes graus de maturação (Scollay et al., 1988).

Entre as células duplo-negativas (DN ou  $CD4^-CD8^-$ ) do timo são encontradas as células não-T, os progenitores linfóides e as células já comprometidas com a linhagem T. De acordo com a expressão seqüencial das moléculas CD25 e CD44, as células  $CD4^-CD8^-$  podem ser subdivididas em diferentes subpopulações compreendendo os estágios DN1 a DN4 (Godfrey et al., 1993). As células denominadas DN1 expressam a molécula CD44, mas não expressam CD25. Como os precursores linfóides vindos da medula óssea chegam através da corrente sanguínea, as células DN1 são encontrados nas proximidades da região córtico-medular. Acredita-se que os precursores linfóides mais imaturos se encontrem entre as DN1. Alguns possíveis candidatos já foram descritos como as células DN1a, que apresentam o fenótipo  $Lin^-CD25^-CD44^+CD117^+CD24^-CD90^-$  (Porritt et al., 2004) e os ETPs (do Inglês, *Early T Lineage Progenitors*) com fenótipo  $Lin^{lo}$  (devido a baixa expressão de CD4)  $CD117^{hi}CD25^-IL-7R\alpha^{-/lo}CD44^+SCA1^+$  (Allman et al., 2003). Mais



recentemente utilizando-se um modelo de expressão do receptor de quimiocina CCR9 ligado a EGFP, foi descrita uma subpopulação mais imatura entre os ETPs, denominada TMP (do Inglês, *Thymic Multipotent Precursor*). Ela apresenta características fenotípicas e funcionais semelhantes aos precursores hematopoiéticos LSK ( $\text{Lin}^- \text{SCA1}^+ \text{c-Kit}^+$ ) encontrados na corrente sanguínea e na medula óssea, capazes de colonizar o timo (Benz & Bleul, 2005; Benz et al., 2008). Entre os diversos possíveis precursores de células T descritos, já foi obtida, além da diferenciação na linhagem T, diferenciação em células NK, células dendríticas, células mielóides e células B. Atualmente existe uma ampla discussão em relação ao potencial desses precursores em gerar células B ou se ocorreria a chegada de precursores com diferentes potenciais. E ainda, se os precursores de células T são derivados de precursores linfóides comuns ou de precursores que perderam o potencial de gerar células B, mas ainda apresentam capacidade de gerar células mielóides (Bell & Bhandoola, 2008; Benz & Bleul, 2005; Benz et al., 2008; Wada et al., 2008).

A subpopulação subsequente, DN2, é caracterizada pelo aumento na expressão de CD25, o que coincide com perda do potencial de geração de linfócitos B, mas não de células mielóides (Bell & Bhandoola, 2008; Wada et al., 2008). A diminuição na expressão da molécula CD44 define a transição para um próximo estágio,  $\text{CD44}^- \text{CD25}^+$  ou DN3. Os sinais mediados por Notch e IL-7, que são gerados por TEC corticais, promovem o desenvolvimento inicial de timócitos até este estágio de desenvolvimento (Takahama, 2006). Nas células DN3 se observa claramente o rearranjo ativo nas cadeias  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  do TCR, dessa forma, esse estágio marca o comprometimento irreversível com a linhagem T (Godfrey et al., 1994). É ainda durante este estágio que ocorre o chamado processo de seleção  $\beta$ , onde timócitos

são testados quanto ao rearranjo produtivo da cadeia  $\beta$  do TCR, através de pareamento com a cadeia pré-T  $\alpha$  (Godfrey et al., 1994). As células DN3 selecionadas progridem para o próximo estágio de desenvolvimento,  $CD44^-CD25^-$  (DN4 ou pré-DP). As células DN4 proliferam intensamente, dando origem a altos números de células da subpopulação seguinte,  $CD4^+CD8^+$  (duplo-positivas ou DP) (Petrie et al. 2000; Wack et al. 2000). A transição para o estágio DN4 marca o início da recombinação do locus do  $TCR\alpha$  e o comprometimento com a linhagem T  $\alpha\beta$  (Livak et al., 1999), além da expressão simultânea das moléculas CD4 e CD8. As células DP constituem a maioria dos linfócitos presentes no órgão, cerca de 80%. Nesta subpopulação, o complexo TCR é expresso em densidade relativamente baixa na superfície celular (Figura 1.4).

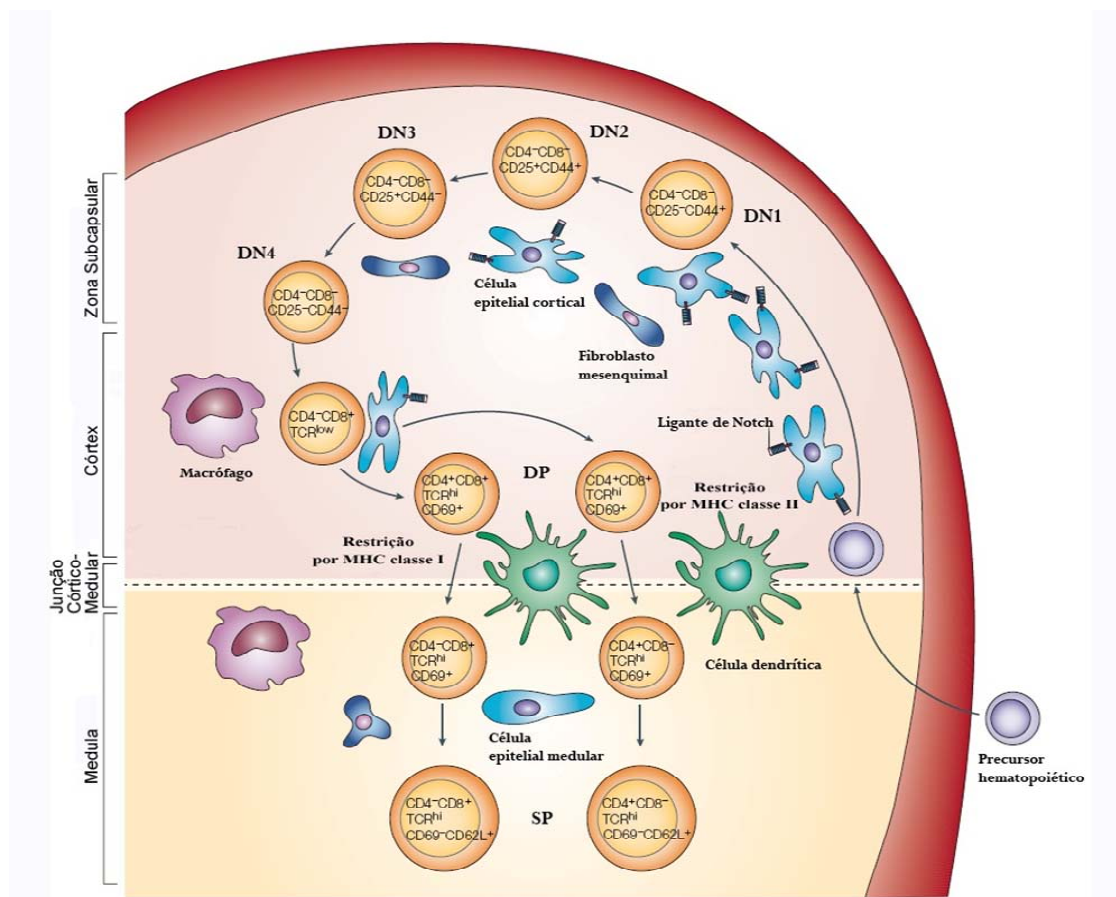
Os timócitos que agora expressam TCR funcionais em suas membranas, serão capazes de interagir com peptídeos apresentados por moléculas de MHC expressas nas membranas de células do microambiente (Figura 1.4). Esta interação irá determinar os eventos denominados de seleção positiva e seleção negativa, cruciais no processo de diferenciação intratímica de células T (Ciofani & Zuniga-Pflucker, 2007; Hogquist et al., 2005; Hollander & Peterson, 2009). Na seleção positiva, timócitos DP reconhecem, em TECs corticais, complexos MHC/peptídeo com avidéz moderada, e o estímulo decorrente de tal reconhecimento os recupera da morte por apoptose; timócitos que não receberem tal estímulo seguirão o programa de morte celular por apoptose (Hare et al., 2003). Esse processo resulta na produção de clones de células T que apresentam um repertório de TCR restrito ao MHC próprio (Mick et al., 2004). Nessa etapa, a especificidade do TCR pelo MHC de classe I ou II é considerada decisiva na diferenciação em timócitos simples positivos (SP) CD4 ou CD8. Um modelo atual, que congrega observações e questionamentos de outros

modelos com novos conceitos, é o modelo de sinalização cinética (Singer et al., 2008). Segundo ele, independentemente da especificidade do TCR pelo MHC, timócitos DP sinalizados durante a seleção positiva são induzidos a “desligar” a transcrição do gene CD8. A persistência da sinalização via TCR bloqueia a sinalização mediada por IL-7 e induz a diferenciação em células T CD4<sup>+</sup> maduras. A ausência da sinalização do TCR permite a sinalização mediada por IL-7, o que induz os timócitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> intermediários (que apresentam um fenótipo CD4<sup>+</sup>CD8<sup>lo</sup>) a sofrer uma reversão no co-receptor, voltando a transcrever o gene da molécula CD8 e reprimindo a expressão de CD4, se diferenciando assim em células T CD8<sup>+</sup> (Brugnera et al., 2000; Yu et al., 2003).

No processo de seleção negativa, timócitos capazes de reconhecer peptídeos próprios com alta afinidade, portanto potencialmente auto-reativos, são induzidos a sofrer morte por apoptose (Nitta et al., 2008; Werlen et al., 2003). Este evento ocorre principalmente na medula tímica, onde TECs medulares expressam antígenos tecido-específicos, os chamados TRAs (*tissue-restricted antigens*) de forma promíscua (Derbinski et al., 2001). A expressão dos TRAs está sob controle do fator de transcrição AIRE (do inglês *Autoimmune regulator*), o qual promove a transcrição de proteínas que não seriam de outra forma encontradas no timo (Anderson et al., 2002). Estas proteínas próprias são apresentadas aos timócitos pelas TECs medulares ou por células dendríticas (capazes de captar tais antígenos), induzindo a deleção clonal de timócitos que reconhecem estes antígenos com alta avidéz (Liston et al., 2003). Alguns clones, no entanto, irão sobreviver se diferenciando em células T com propriedades regulatórias (Derbinski et al., 2005; Gray et al., 2007).

Células SP maduras poderão deixar o órgão através de vasos sangüíneos, localizados na região córtico-medular e na medula tímica, formando a grande

maioria do repertório de linfócitos T localizados em órgãos linfóides secundários, tais como baço, linfonodos, placas de Peyer e tonsilas (Yin et al., 2006).



**Figura 1.4. Diferenciação intratímica de linfócitos T.** Os lóbulos tímicos são organizados em regiões de córtex e medula, cada qual caracterizada pela presença de tipos específicos de células do estroma, assim como timócitos em diferentes estágios de maturação. A diferenciação de timócitos é caracterizada pela expressão de marcadores de superfície bem definidos como CD44, CD25, CD4, CD8, assim como pelo rearranjo do TCR. Adaptado a partir de Zuñiga-Pflucker, 2004.

### 1.2.3. Migração compartimentalizada das subpopulações de timócitos

Durante a diferenciação, os timócitos passam por migrações orquestradas através do timo, antes de serem liberados para a periferia como células T maduras. Esse movimento está intimamente ligado ao programa de desenvolvimento dos timócitos, resultando na compartimentalização do órgão de forma que timócitos em diferentes

estágios de desenvolvimento são encontrados em regiões distintas do timo (Petrie & Zuniga-Pflucker, 2007; Savino et al., 2004; Takahama, 2006).

Os progenitores T hematopoiéticos, oriundos da medula óssea, penetram no timo através das vênulas pós-capilares localizadas na região córtico-medular. Após a entrada no timo, tais progenitores iniciam o processo de diferenciação de timócitos dando origem ao estágio DN do desenvolvimento de células T. A diferenciação para o estágio DN1 ocorre na proximidade da região córtico-medular. Estas células iniciam o processo de migração em direção à cápsula, se diferenciando à medida que se movem em várias profundidades corticais. Dessa forma, a diferenciação para os estágios DN2 e DN3 ocorre no córtex médio e superior respectivamente. Células DN3 se acumulam na região subcapsular enquanto se diferenciam no estágio DN4 ou pré-DP de desenvolvimento. A transição do estágio DN3 para pré-DP é acompanhada por uma reversão na polaridade de migração, de forma que timócitos que se diferenciarem em DP vão migrar através do córtex em direção à medula, muito embora nunca venham a entrar na região medular (Lind et al., 2001; Petrie & Zuniga-Pflucker, 2007).

O próximo passo na migração intratímica é o movimento de células que foram selecionadas positivamente para o interior da medula. Em camundongos, após o processo de seleção positiva ser completado, as células selecionadas permanecem na medula por mais 3-7 dias (Shortman et al., 1990). Nesse período, as poucas células SP ( $CD4^+$  ou  $CD8^+$ ) com capacidade de se tornarem células T funcionais completam sua diferenciação e são exportadas através da corrente sanguínea para os órgãos linfóides periféricos (Petrie & Zuniga-Pflucker, 2007). É sugerido que os timócitos maduros deixem o timo através de espaços perivasculares localizados nas junções córtico-medulares e na medula (Mori et al., 2007).

#### 1.2.4. Interações moleculares envolvidas na compartimentalização dos timócitos no microambiente tímico

Durante o desenvolvimento, timócitos passam por migrações orquestradas através do timo antes de serem liberados para a periferia como células T maduras. Este processo de migração envolve uma rede de sinalização onde participam múltiplos fatores, como polipeptídeos solúveis e moléculas de adesão produzidas por células do microambiente tímico ou pelos próprios timócitos. O vetor resultante do somatório desses sinais dita o direcionamento de timócitos em diferentes estágios de desenvolvimento (Mendes-da-Cruz et al., 2008; Savino, 2007). Faremos a seguir uma explanação sucinta sobre o papel exercido por algumas moléculas durante a migração intratímica de timócitos.

A entrada no timo ocorre através de vênulas pós-capilares localizadas da região córtico-medular (Lind et al., 2001). O recrutamento dos progenitores T hematopoiéticos para o timo é facilitado por uma cascata de adesão iniciada pela interação de PSGL-1 (do Inglês, *P-selectin glycoprotein ligand 1*) expresso na superfície desses precursores, com seu ligante P-selectina, expressa no endotélio tímico (Rossi et al., 2005; Scimone et al., 2006). A interação de PSGL-1 com P-selectina diminui a velocidade dos precursores nas vênulas pós-capilares localizadas na região córtico-medular permitindo que eles respondam a gradientes locais de quimiocinas (provavelmente CCL25) e se liguem fortemente às moléculas de adesão endotelial ICAM-1 (do Inglês, *intercellular adhesion molecule 1*) e VCAM-1 (do Inglês, *vascular cell adhesion molecule 1*) através de integrinas, levando a firme adesão dos precursores no endotélio tímico (Scimone et al., 2006). Fortes indícios indicam CCL25 como a principal quimiocina envolvida no encaminhamento

de precursores para o timo (Svensson et al., 2008). Esses dados mostram que o bloqueio de CCL25 reduz em mais de 50% a entrada de precursores CLP-2 da medula óssea no timo, enquanto precursores nocautes para seu receptor CCR9 são menos eficientes do que progenitores normais na colonização do timo.

Um trabalho bastante recente (Gossens et al., 2009) relaciona o aumento periódico da expressão das moléculas P-selectina e CCL25 no endotélio tímico ao aumento da receptividade do timo a progenitores linfóides oriundos da medula óssea. Essa relação entre expressão de moléculas e receptividade a precursores seria controlada por dois mecanismos de alças regulatórias. O primeiro deles seria dependente da quantidade e, possivelmente, da qualidade dos ETPs presentes na região perivascular tímica, que regulariam a periodicidade da expressão tímica de P-selectina e CCL25. Estes dados têm por base experimentos feitos com camundongos com números reduzidos de ETPs, como IL-7R<sup>-/-</sup>, RAG-1<sup>-/-</sup>, PSGL-1<sup>-/-</sup>, os quais não apresentam periodicidade na expressão tímica de P-selectina e CCL25. O segundo mecanismo seria o tamanho do pool de linfócitos T periféricos, sendo sugerido que os níveis plasmáticos de esfingosina-1-fosfato (S1P), molécula que regula a emigração de timócitos maduros, poderiam estar relacionados ao controle da expressão de P-selectina pelo endotélio tímico. Esses dados mostram que o timo responde a sinais internos e externos para regular a geração de células T (Gossens et al., 2009).

Vários trabalhos apontam para a participação de quimiocinas na migração de timócitos DN do córtex em direção à capsula (Yin et al., 2006). Evidenciou-se que a sinalização através da interação entre o receptor CXCR4 e seu ligante, a quimiocina CXCL12, é crucial para a migração de células DN1 em direção ao córtex medial. Assim, animais com inativação timo-específica de CXCR4 apresentam bloqueio de

diferenciação a partir de DN1 (Plotkin et al., 2003), demonstrando a importância da migração na geração contínua de células T. Foi ainda mostrado que a ausência de CCR7, receptor de CCL19 e CCL21, afeta a migração de progenitores em direção ao córtex superior, com conseqüente bloqueio na diferenciação de timócitos que se encontram entre os estágios DN1 e DN2 (Misslitz et al., 2004). Por outro lado, a expressão do receptor CCR9, receptor de CCL25, é aumentada após o processo de seleção  $\beta$ , de forma que timócitos  $CD4^-CD8^-$  mais tardios (DN3 e DN4), e timócitos  $CD4^+CD8^+$  expressam esse receptor em altas densidades (Norment et al., 2000). Em camundongos nocautes para CCR9, timócitos  $CD4^-CD8^-CD25^+$ , normalmente concentrados na região subcapsular, passaram a apresentar uma localização desorganizada por todo o córtex, indicando uma possível implicação desse receptor no acúmulo de timócitos  $CD4^-CD8^-$  na região subcapsular (Benz et al., 2004).

Respostas a quimiocinas específicas após a seleção positiva parecem estar envolvidas na migração em direção à medula tímica. Foi demonstrado que células selecionadas positivamente  $CD4^+CD8^+CD69^+$  e  $CD4^+CD69^+CD62L^-$  (SP imaturas) migram *in vitro* em resposta a CCL19, CCL21 (ligantes de CCR7), CCL22 (ligante de CCR4) e CCL25 (ligante de CCR9), mas não em direção a CXCL12 (ligante de CXCR4). A resposta negativa frente à CXCL12 pode ser entendida devido à diminuição na expressão de CXCR4 após seleção positiva de timócitos  $CD4^+CD8^+$  (Suzuki et al., 1998).

Dados bastante conclusivos demonstram a relevância da molécula CCR7 neste processo. Observou-se aumento na expressão de CCR7 após seleção positiva, e ainda que a falta de CCR7 ou de seus ligantes levava à localização de timócitos SP no córtex acompanhado pela redução destas células na medula. Apesar da importância desta molécula na migração do córtex para medula, a sua deficiência



não impede a diferenciação de células DP em SP (Ueno et al., 2004). No entanto, mais recentemente foi demonstrado que a migração dependente de CCR7 é essencial para o estabelecimento de tolerância central a antígenos órgãos-específicos, com a ocorrência de auto-imunidade em diversos órgãos de camundongos deficientes em CCR7 ou em seus ligantes (Kurobe et al., 2006; Davalos-Miszlitz et al., 2007).

Além de quimiocinas, timócitos também utilizam outros estímulos migratórios, como moléculas de matriz extracelular (ECM) para se locomover no interior do timo. Proteínas de ECM desempenham papel na fisiologia do órgão, através da interação com seus receptores expressos na superfície de timócitos e/ou células do microambiente tímico, induzindo respostas como proliferação, sobrevivência e diferenciação de timócitos (Savino et al., 2003).

A distribuição da rede de matriz extracelular em um timo normal não segue um padrão homogêneo, e glicoproteínas como fibronectina, laminina e colágeno do tipo IV não estão restritas a regiões típicas de membrana basal. Essas glicoproteínas formam uma rede que está presente em todo o órgão, sendo bem mais densa na região medular, e apresentando fibras mais finas no córtex (Berrih et al., 1985; Lannes-Vieira et al., 1991; De Souza et al., 1993). Diferentes tipos celulares do microambiente tímico são capazes de produzir moléculas de matriz extracelular (Savino et al., 2003; Savino et al., 2004).

Isoformas de componentes de matriz extracelular têm sido descritas no timo. Por exemplo, a isoforma de fibronectina reconhecida pela integrina  $\alpha 5\beta 1$  (CD49e/CD29 ou VLA-5) através do motivo RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) está localizada em todo parênquima tímico humano. Já a isoforma derivada do *splicing* alternativo do RNA mensageiro de fibronectina, reconhecida pela integrina  $\alpha 4\beta 1$  (CD49d/CD29 ou

VLA-4) através do domínio CS1 está mais restrita à medula, definindo claramente os limites com o córtex ao redor (Crisa et al., 1996). A análise em timócitos humanos sugere uma via de diferenciação de células T onde a maior parte das DN expressa VLA-4 e VLA-5 em altas densidades, células DP diminuem a expressão de VLA-5, enquanto timócitos SP diminuem expressão de VLA-4 e aumentam a expressão de VLA-5 (Mojcik et al., 1995). Esta modulação implicaria em envolvimento funcional da expressão de integrinas durante a maturação de células T no timo. Em timócitos DP, a ativação de VLA-4 pode estar relacionada ao evento de seleção positiva. Timócitos DP imaturos expressam VLA-4 na forma constitutivamente ativada levando à adesão a fibronectina e VCAM-1. Por outro lado, as células não-aderentes são em sua maioria timócitos que já passaram pela seleção positiva, ou seja, DP expressando CD3 e CD69 em altas densidades, e timócitos SP (Salomon et al., 1994).

Resultados obtidos em camundongos indicam a participação de fibronectina e seus receptores VLA-4, principalmente e VLA-5 na adesão de timócitos  $CD4^-CD8^-$  e na sua diferenciação em subpopulações mais maduras (Utsumi et al., 1991). Dados do nosso laboratório também mostram a expressão diferencial de receptores de ECM nas subpopulações de timócitos. Timócitos DN apresentam alta expressão de VLA-4, VLA-5 e VLA-6, timócitos DP recém-gerados mantêm essa alta expressão, enquanto células DP maduras exibem diminuição na expressão desses receptores. Nos estágios SP  $CD4^-$  e  $CD8^-$ , a expressão de VLA-4 diminui anteriormente ao receptor VLA-5, o qual também diminui nas células SP maduras. Em células  $CD4^+$  ocorre uma maior diminuição de VLA-6 que em células  $CD8^+$ . Ensaio funcionais mostram um aumento na capacidade de adesão a TECs em estágios iniciais da diferenciação de timócitos, devido a uma alta expressão desses receptores de ECM (Dalmau et al., 1999). Em conjunto, esses dados sugerem que sinais deflagrados

por receptores de proteínas de ECM podem participar na indução de diferenciação de timócitos.

As interações de timócitos através de isoformas de laminina também são reguladas espacialmente e de acordo com o desenvolvimento no timo. As isoformas de laminina 1, 2, 4, 5, 10 e 11 foram encontradas em vasos sanguíneos e/ou células epiteliais do timo (Kutlesa et al., 2002; Ocampo et al., 2008). Ensaio funcionais mostraram adesão de timócitos DN através da integrina  $\alpha 6\beta 1$  (CD49f/CD29 ou VLA-6) às lamininas 10 e 11. Timócitos DP não aderem a nenhuma das isoformas testadas, enquanto timócitos SP CD8 se ligam à laminina 5, através da integrina  $\alpha 6\beta 4$  (Kutlesa et al., 2002). Laminina 2 aumenta adesão TEC/timócito e a migração de timócitos em complexos linfoepiteliais Nurse, de forma  $\alpha 6\beta 1$  dependente (Ocampo et al., 2008). A isoforma laminina 2 também se mostra necessária na diferenciação e sobrevivência de timócitos, como observado em camundongos com ausência desta molécula (Iwao et al., 2000; Magner et al., 2000). Por outro lado, laminina 5 está relacionada ao controle da proliferação de timócitos via  $\alpha 6\beta 4$ , assim como na migração de timócitos com ativação da metaloproteinase-14 e clivagem de CD44 (Vivinus-Nebot et al., 1999).

Outros ligantes e receptores também participam do processo de migração intratímica, como o receptor 1 de esfingosina 1-fosfato (do Inglês, *type 1 sphingosine-1-phosphate receptor* ou  $S1P_1$ ). Em camundongos nocautes para este receptor foi observado bloqueio na saída de células T SP CD4 e CD8 maduras do timo para a periferia, com acúmulo dessas células na medula tímica. Como a expressão do receptor  $S1P_1$  é aumentada em timócitos simples positivos maduros, sua deleção altera a resposta quimiotática de timócitos a  $S1P$ , resultando na

ausência de linfócitos T na periferia do sistema imune (Allende et al., 2004; Matloubian et al., 2004).

## **2- OBJETIVOS**

Os dados mostrados acima deixam claro que diversas moléculas estão envolvidas no desenvolvimento de timócitos. No entanto, muitas questões ainda não estão claras, particularmente no que tange à migração intratímica. Nesse contexto, é relevante a avaliação de novas moléculas que possam contribuir com esse processo.

Apesar da função de PrP<sup>C</sup> ainda não estar completamente elucidada, alguns dados já publicados, sugerem sua provável função no sistema imune em diferentes eventos, tais como ativação de células T, fagocitose e migração. Esses estudos, em conjunto com os dados de expressão constitutiva de PrP<sup>C</sup> no timo, e sua interação com moléculas de adesão como heparan sulfato e, principalmente, laminina (a qual é determinante na migração de linfócitos T), nos levaram a estudar o papel de PrP<sup>C</sup> no timo, avaliando se flutuações nos níveis de expressão intratímica de PrP<sup>C</sup> poderiam modificar os padrões de diferenciação e migração de timócitos.

## **3. MATERIAIS & MÉTODOS**

### **3.1. Animais**

Foram utilizados camundongos com inativação no gene *Prnp* (*Prnp*<sup>0/0</sup>) na região dos aminoácidos 4 a 186, a qual foi substituída por um cassete de neomicina. Esta linhagem foi denominada Zurich I (Zrch I), apresentando um fundo genético misto C57/BL6/J x 129/Sv (Bueler et al., 1992). Foram também utilizados camundongos

transgênicos, denominados Tga20, construídos a partir de blastocistos desse camundongo  $Prnp^{0/0}$ . Neles foram inseridas cópias adicionais do gene  $Prnp$ , utilizando-se o segmento promotor natural de prion, sendo obtida a expressão de aproximadamente 10 vezes mais proteína que nos animais selvagens (Fischer et al., 1996). Como camundongo controle normal foi utilizada a linhagem selvagem Zrch I  $Prnp^{+/+}$  (aqui referida como WT; do Inglês, *wild type*). Esta linhagem foi gerada a partir do cruzamento contínuo dos F1 resultantes de acasalamento entre os animais C57BL/6J e 129/Sv. As três linhagens foram gentilmente fornecidas pela Dr.<sup>a</sup> Vilma Martins, do Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer (São Paulo), e já se encontram no Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fiocruz.

Todos os procedimentos envolvendo a utilização destes animais foram aprovados pela Comissão de Ética de Uso de Animais de Laboratório, e estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### **3.2. Reagentes**

Os seguintes reagentes foram utilizados na realização dos experimentos: albumina bovina sérica (BSA), salina tamponada com fosfato (PBS, 0,15 M, pH 7,2), meio de cultura RPMI 1640, L-glutamina, penicilina, estreptomicina, sulfato de cobre, laminina produzida em sarcoma murino EHS (Engelbreth-Holm-Swarm), fibronectina obtida de fibroblasto humano (Sigma Co., St. Louis, EUA), CXCL12 recombinante de camundongo (R&D Systems, Minneapolis, EUA), soro bovino fetal (SBF) (Cultilab SA, Campinas, SP, Brasil) e soro normal de camundongo (obtido em nosso laboratório).

### **3.3. Anticorpos**

Nos ensaios de imunohistoquímica utilizamos os anticorpos anti-laminina e anti-fibronectina produzidos em coelho (Novotec, Saint Martin-La-Garenne, França), e anti-CXCL-12 produzido em cabra (Santa Cruz, Califórnia, EUA). Também foi utilizado o anticorpo secundário produzido em cabra anti-Ig de coelho conjugado ao fluorocromo alexa-488 (Amersham Biosciences, Limited, Reino Unido), além do anticorpo secundário produzido em burro anti-Ig de cabra conjugado a FITC (Santa Cruz, Califórnia, EUA).

Para as análises de citometria de fluxo, diluições apropriadas dos seguintes anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos foram utilizadas: anti-CD49d-PE, anti-CD49e-PE, anti-CD49f-PE, anti-CXCR4-PE, anti-CD4-PE e -PerCP, anti-CD8-APC e -PerCP, anti-CD44-PE, anti-CD25-FITC, anti-CD90-FITC, anti-CD3-PE, anti-CD19-PE, anti-TCR $\gamma\delta$ -PE e anti-TCR $\beta$ -PE. Também utilizamos o anticorpo monoclonal anti-PrP<sup>C</sup> (SAF-32) (SPI-BIO, Montigny-le-Bretonneux, França) produzido em camundongo, e o anticorpo secundário produzido em cabra anti-Ig de camundongo conjugado ao fluorocromo alexa-488 (Amersham Biosciences, Limited, Reino Unido). Como controles negativos para cada anticorpo específico foram utilizadas imunoglobulinas (Igs) não relacionadas marcadas com fluorocromos correspondentes, como controle negativo de marcação para o anticorpo anti-PrP<sup>C</sup> utilizamos uma IgG1 de camundongo não marcada (Becton-Dickinson Co, San Diego, EUA). Em todos os casos a concentração de Ig dos anticorpos-controle foi a mesma dos respectivos anticorpos específicos.

### **3.4. Histologia e imunohistoquímica**

Para a análise da histologia foi realizada coloração por hematoxilina e eosina em cortes parafinados de timo. Na desparafinização e hidratação, os cortes foram incubados por 2 vezes durante 10 minutos em xilol e, posteriormente, levados a 3 recipientes diferentes contendo álcool absoluto durante 2 minutos em cada; logo a seguir, os cortes foram deixados em água corrente durante 1 minuto. Durante a coloração, os cortes foram deixados por 10 minutos em hematoxilina, lavados em água corrente por 1 minuto, e incubados em solução de eosina por 3 minutos.

No que diz respeito às análises de imunohistoquímica, timos de todos os grupos experimentais foram embebidos em Tissue-Tek (LEICA Instruments, Alemanha) e subsequentemente congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espessura foram assentados em lâminas silanizadas (Easypath), fixados com acetona, bloqueados com PBS- caseína 10% / BSA 2%. As lâminas foram incubadas com os anticorpos anti-fibronectina, anti-laminina ou CXL12, após, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS e incubadas por 30 minutos com o respectivo anticorpo secundário. As amostras foram analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX60, Japão) e as imagens obtidas foram analisadas e quantificadas através do software de imagem Metaview.

### **3.5. Citometria de fluxo**

Animais apresentando diferentes níveis de expressão da proteína príon celular foram sacrificados em câmara de gás carbônico; em seguida, timo, baço e linfonodos subcutâneos e mesentéricos foram retirados e macerados. Depois de isoladas, células obtidas a partir destes órgãos foram ressuspensas em solução de tampão fosfato tamponada (PBS) contendo 5% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab). A contagem do número de células foi feita em câmara de Neubauer utilizando o corante azul de tripan (Sigma) para exclusão de células mortas. Após a contagem, as células foram distribuídas em placas de 96 poços em uma concentração de  $10^6$  células/poço.

Para a caracterização fenotípica, as células foram incubadas com 10 µl de anticorpos monoclonais conjugados a diferentes fluorocromos ou com o anticorpo anti-PrP<sup>C</sup> a 4°C por 30 minutos. Como controles negativos de marcação, foram utilizadas Igs não relacionadas marcadas com os fluorocromos correspondentes ou Ig de camundongo não marcada. Após a marcação, as suspensões celulares foram lavadas em PBS/5% SFB, fixadas em solução contendo formaldeído 1% e adquiridas no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Diego, USA) equipado com o programa CellQuest. Para cada amostra, foram avaliadas pelos menos  $10^4$  células.

### **3.6. Ensaio de transmigração**

A atividade migratória de timócitos foi analisada em câmaras de "*transwell*" (Corning Inc., New York, USA). Primeiramente, insertos com poros de 5 µm foram recobertos com soluções a 10 µg/mL de laminina, fibronectina ou BSA durante 1 hora a 37°C em atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>. Os insertos foram então submetidos a bloqueio com



solução de PBS/BSA 0,5%, durante 45 minutos a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida esses insertos foram colocados em poços contendo 600 µL de RPMI/BSA 1%, e timócitos foram adicionados à parte superior do inserto (2,5x10<sup>6</sup> timócitos em 100 µL de RPMI/BSA 1%), seguindo-se incubação de 4 horas a 37°C em atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de transmigração, as células foram recolhidas e contadas em microscópio óptico, utilizando-se azul de tripan para exclusão de células mortas. As células foram então marcadas com os anticorpos anti-CD4, e anti-CD8, para análise das subpopulações através de citometria de fluxo. Em alguns experimentos, os insertos foram recobertos apenas com BSA, e utilizamos a quimiocina CXCL12 (100 ng/mL), colocada no compartimento inferior.

### **3.7. Análise estatística**

Os resultados foram analisados estatisticamente através do teste “One-way analysis of variance” e subseqüentemente através do pós-teste de Tukey. Os dados foram mostrados como média ± erro padrão e considerados estatisticamente significativos quando os valores de *p* foram menores que 0,05.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Participação da proteína prion celular na diferenciação intratímica de linfócitos T

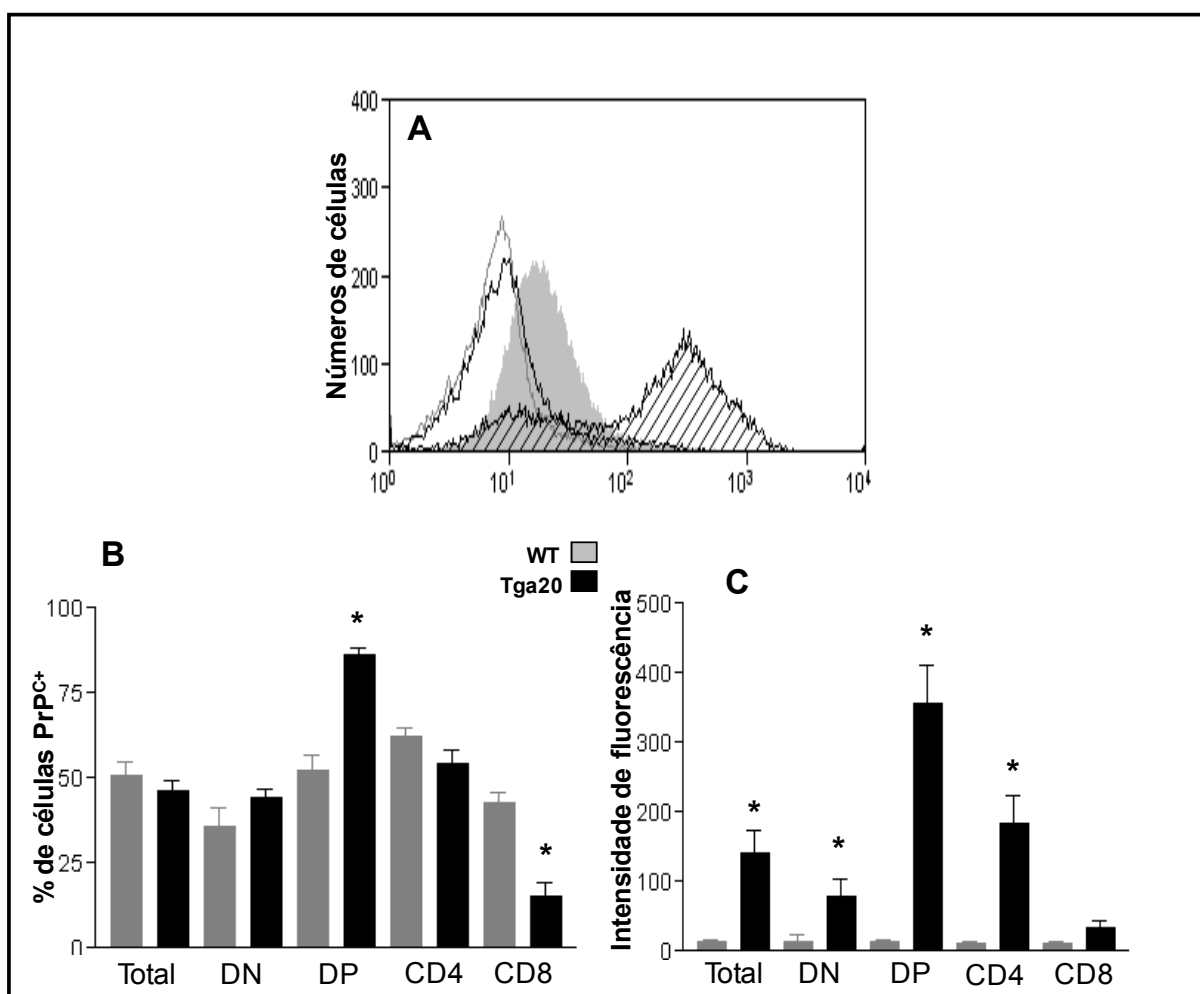
Nesta primeira parte do trabalho, abordamos a questão do possível envolvimento de PrP<sup>C</sup> no desenvolvimento de linfócitos T no timo. Analisamos inicialmente a expressão de PrP<sup>C</sup> em timócitos e em linhagens de células do microambiente tímico. Em seguida, passamos a utilizar camundongos com diferentes níveis de expressão de PrP<sup>C</sup>, ou seja, os camundongos normais (*wild type* - WT), camundongos Prnp<sup>0/0</sup> e camundongos transgênicos super-expressando PrP<sup>C</sup> (Tga20), fazendo uma avaliação quanto ao processo de diferenciação intratímica de linfócitos T e à presença de linfócitos T na periferia do sistema imune.

#### 4.1.1. Expressão de PrP<sup>C</sup> em timócitos e células do microambiente tímico

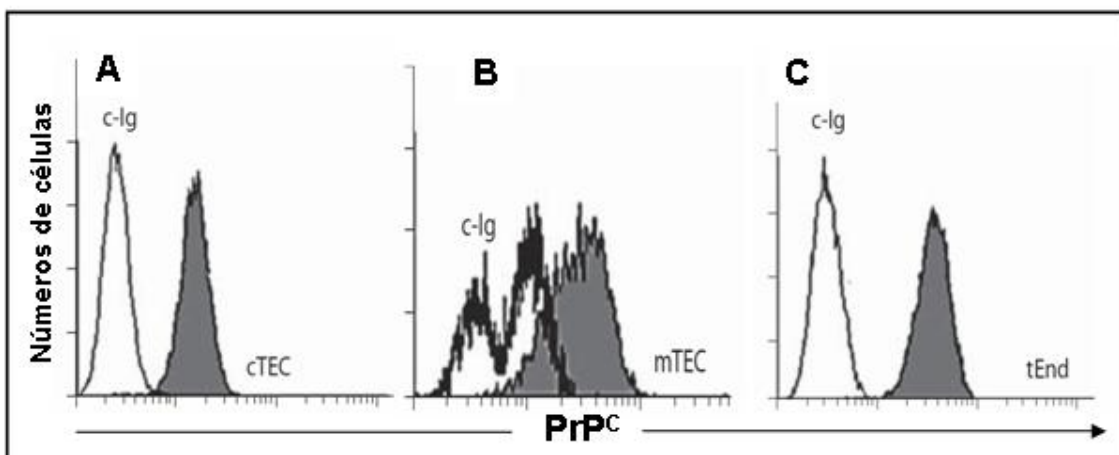
Inicialmente, buscando definir se a expressão intratímica de PrP<sup>C</sup> era variável nos três tipos de animais estudados, analisamos a densidade membranar dessa molécula nos timócitos das três linhagens de camundongos. Na população total de timócitos dos animais que super-expressam o gene da proteína PrP<sup>C</sup> (camundongos Tga20), o aumento da expressão da molécula pode ser detectado em relação ao grupo controle tipo selvagem (WT) de mesma idade e sexo, enquanto que nos camundongos nocautes (Prnp<sup>0/0</sup>) não foi detectada a expressão da proteína na superfície de timócitos (Figura 4.1A). Através da marcação das moléculas CD4 e CD8, analisamos a expressão de PrP<sup>C</sup> nas subpopulações de timócitos. Como pode ser visto na Figura 4.1C, observamos expressão da molécula em todas as subpopulações de timócitos do camundongo WT, com um percentual um pouco menor entre as DN, quando comparadas às outras subpopulações. No camundongo

Tga20 também foi observada expressão de PrP<sup>C</sup> em todas as subpopulações, porém, entre as células CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (duplo-positivas ou DP) ocorre um aumento neste percentual em relação ao controle, enquanto nas simples positivas (SP) CD8 observamos uma diminuição no percentual de células expressando PrP<sup>C</sup> em relação ao camundongo controle (Figura 1B). O aumento na densidade da expressão de PrP<sup>C</sup> foi observado nos timócitos do Tga20 entre as subpopulações CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (duplo-negativas ou DN), DP e SP CD4, com um aumento mais acentuado nas DP. No entanto, nas células CD8 SP não há diferença significativa em relação ao controle (Figura 4.1C). Estes dados confirmam o aumento de expressão de PrP<sup>C</sup> no camundongo Tga20 e mostram uma expressão diferencial entre as subpopulações de timócitos, tanto nos camundongos controles, quanto nos transgênicos.

A expressão de PrP<sup>C</sup> também foi observada em células do microambiente tímico, tendo sido analisadas as linhagens de TEC 1.4C18 e 1C6 (Figura 4.2A-B) representantes dos fenótipos cortical e medular, respectivamente. Também avaliamos a linhagem de célula endotelial tímica tEnd.1, a qual também apresenta clara expressão de PrP<sup>C</sup> (Figura 4.2C).



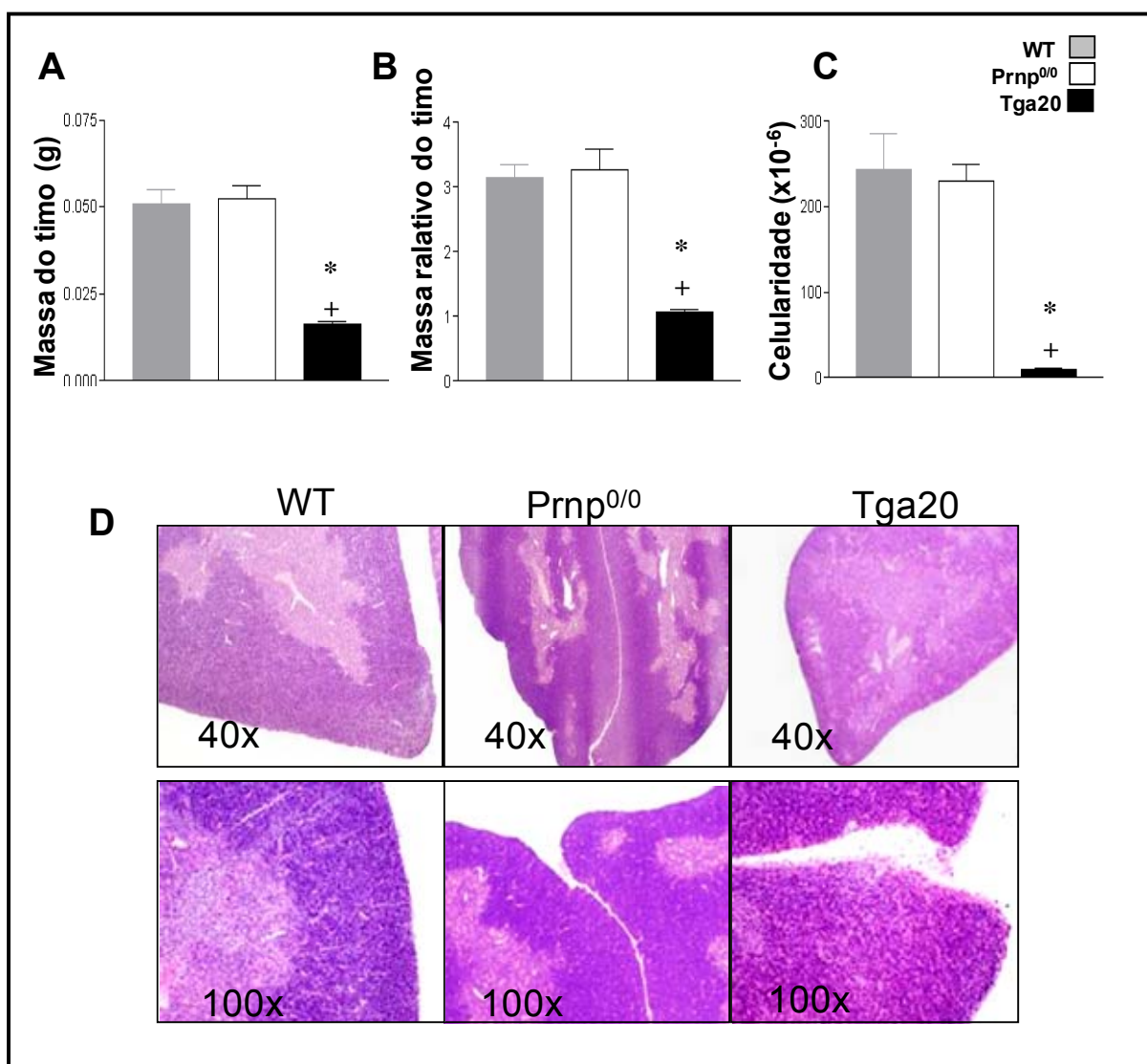
**Figura 4.1. Expressão da proteína prion celular (PrP<sup>C</sup>) em timócitos.** (A) Histograma com expressão de PrP<sup>C</sup> na população total de timócitos de camundongos WT (curva cheia em cinza), Prnp<sup>0/0</sup> (curva vazia em preto) e Tga20 (curva hachurada). O controle de marcação de Ig não relacionada no camundongo WT é mostrado na curva vazia em cinza. (B) Percentual de células expressando PrP<sup>C</sup> na população total e nas subpopulações de timócitos definidas pela expressão de CD4/CD8 como DN (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>), DP (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), CD4 (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) e CD8 (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) nos camundongos WT (barras em cinza) e Tga20 (barras em preto). (C) Intensidade de fluorescência de PrP<sup>C</sup> na população total e nas subpopulações de timócitos definidas pela expressão de CD4/CD8, nos camundongos WT e Tga20. Dados apresentados como média ± erro padrão, com 4 camundongos por grupo. \* p<0,05 em relação aos camundongos do tipo selvagem.



**Figura 4.2. Células do microambiente tímico expressam PrP<sup>C</sup> constitutivamente.** Expressão de PrP<sup>C</sup> em linhagens de células epiteliais tímicas corticais (cTEC) (A) e medulares (mTEC) (B), e na linhagem de célula endotelial tímica (tEnd) (C). A expressão de PrP<sup>C</sup> é mostrada em cinza, enquanto a Ig não relacionada está representada nas curvas vazadas.

#### 4.1.2. Hipoplasia no timo de camundongos que super-expressam PrP<sup>C</sup>

Tendo sido confirmada a expressão de PrP<sup>C</sup> tanto em timócitos quanto em células do estroma tímico, avaliamos os timos provenientes de animais apresentando diferentes níveis de expressão de PrP<sup>C</sup>, quanto a alterações de massa e celularidade. Os timos dos camundongos Prnp<sup>0/0</sup>, quando comparados aos animais controle WT, não apresentaram alterações significativas. Por outro lado, ao avaliarmos os timos dos camundongos Tga20, vimos diminuição estatisticamente significativa na massa relativa e celularidade, quando comparados aos timos de camundongos controle e de camundongos Prnp<sup>0/0</sup> (Figura 4.3B-C).



**Figura 4.3. Hipoplasia tímica em camundongos transgênicos para PrP<sup>C</sup>.** São mostrados massa do timo (A), massa relativa do timo (massa do timo/massa do animal x 1000) (B) e celularidade (C) dos timos de camundongos do tipo selvagem (WT), nocautes para o gene Prnp (Prnp<sup>0/0</sup>) e super-expressando este gene (Tga20). Em D são apresentadas análises histológicas, após coloração com hematoxilina-eosina, de timos dos mesmos grupos de camundongos. Os aumentos das fotomicrografias estão assinalados em cada painel. Os padrões aqui mostrados são representativos de pelo menos 4 animais por grupo. Em A, B e C dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão, sendo  $n \geq 5$ . \*  $p < 0,05$  em relação ao controle WT, +  $p < 0,05$  em relação ao camundongo Prnp<sup>0/0</sup>.

Tendo em vista que a expressão diferencial de PrP<sup>C</sup> é acompanhada por alterações na massa relativa e no número de timócitos, avaliamos em seguida se a arquitetura do órgão também estaria comprometida. Observamos que os timos de animais Prnp<sup>0/0</sup> apresentam um padrão de distribuição das regiões cortical e medular semelhante aos timos de animais do tipo selvagem, com a típica densidade maior de células na região cortical que na região medular. Por outro lado, nos timos de animais Tga20, tal regionalização córtico-medular estava nitidamente alterada, com diminuição da densidade celular na região cortical, e como consequência a delimitação entre as duas regiões se encontrava menos evidente tanto em relação aos timos controles, quanto aos animais nocautes (Figura 4.3D).

#### *4.1.3. Acúmulo de timócitos imaturos em camundongos apresentando super-expressão da proteína prion celular*

Tendo em vista a intensa hipoplasia observada no timo dos camundongos transgênicos para PrP<sup>C</sup>, procuramos investigar se a diferenciação intratímica de linfócitos T estaria alterada nestes animais. Iniciamos esta investigação através da análise das subpopulações de timócitos definidas pela expressão das moléculas CD4 e CD8.

Inicialmente avaliamos camundongos adultos jovens, com idade de 5 a 6 semanas, e expressando diferentes níveis da proteína PrP<sup>C</sup>. Como podemos observar através dos gráficos mostrando a detecção simultânea de CD4 e CD8, os timos de camundongos deficientes em PrP<sup>C</sup> não apresentam diferenças significativas nas proporções relativas e nos números absolutos de subpopulações de timócitos quando comparados aos animais selvagens. No entanto, camundongos Tga20 mostraram uma drástica diminuição no percentual de células DP, acompanhada de

um grande aumento no percentual de células DN, em relação aos timos de animais WT e Prnp<sup>0/0</sup> (Figuras 4.3A-B). Por outro lado, no que diz respeito ao percentual de células SP para as moléculas CD4 ou CD8, não vimos diferença significativa nos valores percentuais dessas subpopulações maduras, quando o grupo Tga20 foi comparado ao WT ou ao Prnp<sup>0/0</sup>.

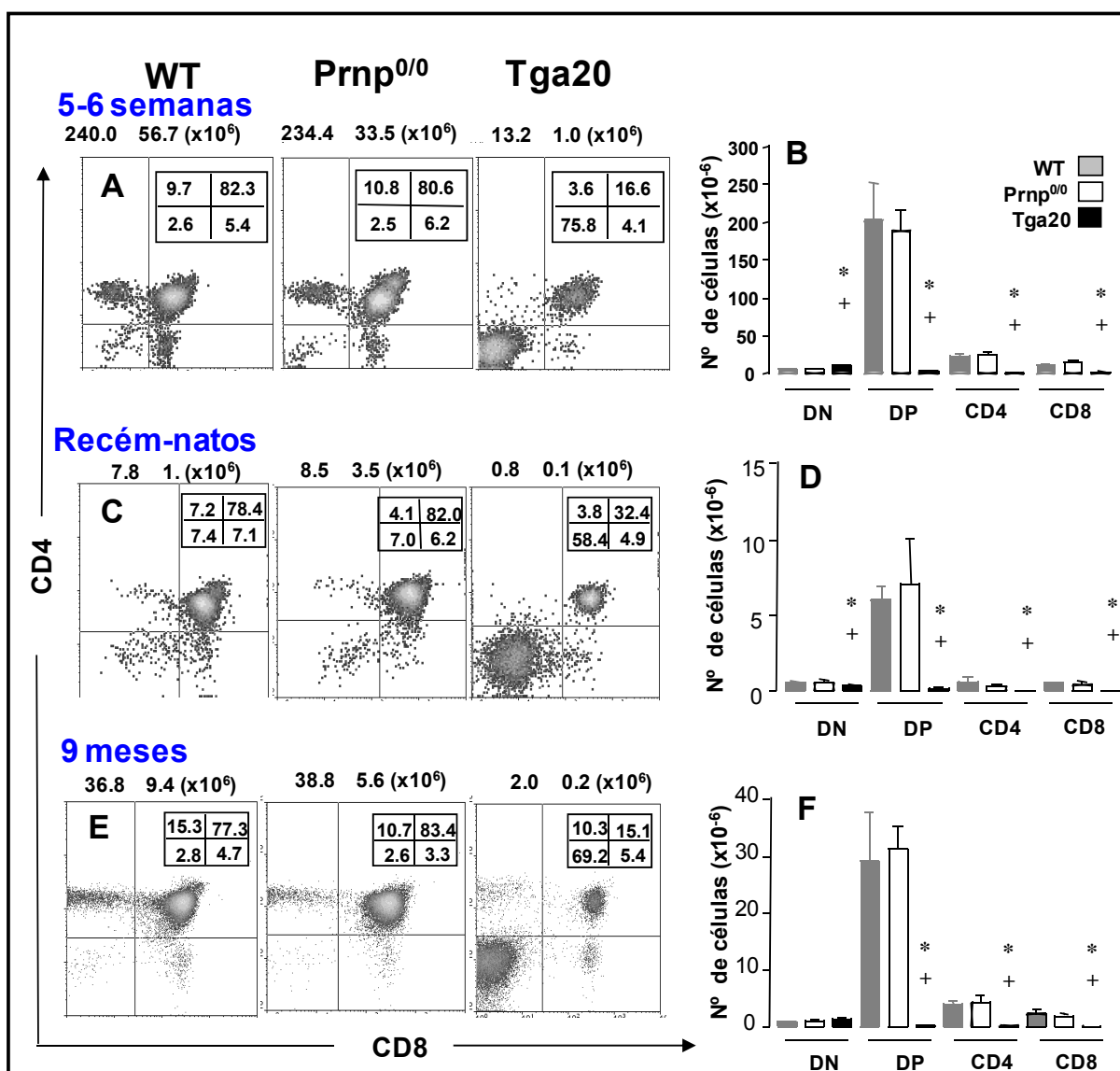
Análise do número absoluto de células revelou discreto aumento no número de células DN, mas uma diminuição significativa no número de células DP e SP CD4 e CD8. Em conjunto, esses dados numéricos sugerem um importante bloqueio na maturação de timócitos. Para investigar essa hipótese, decidimos estudar animais de diferentes idades e, principalmente, analisar os estágios mais imaturos contidos na subpopulação DN.

#### *4.1.4. Análise de subpopulações de timócitos em camundongos com diferentes idades*

Como vimos acima, as alterações no processo de diferenciação de timócitos foram inicialmente observadas em camundongos Tga20 adulto-jovens. Porém não sabíamos em que fase da vida desses animais essas alterações apareciam e se ocorria acúmulo de determinadas subpopulações em animais de idade mais avançada. Além disso, o camundongo Prnp<sup>0/0</sup>, que apresenta perfil de timócitos CD4/CD8 normal, poderia apresentar alterações visíveis apenas após determinada fase da vida do animal. Dessa forma, avaliamos camundongos recém-natos e camundongos com 9 meses de idade provenientes dos três grupos de animais com diferentes níveis de expressão de PrP<sup>C</sup> quanto ao perfil das subpopulações de timócitos CD4/CD8. Vimos que os timos dos camundongos neonatos Prnp<sup>0/0</sup>, assim como nos animais adulto-jovens, são muito parecidos com os camundongos WT.



Como esperado, esses animais apresentavam um pequeno aumento no percentual de células DN, além de alteração na relação de números dos timócitos SP CD4 e CD8, que nos recém-natos era invertida ou próxima a uma relação de 1:1. Já nos camundongos Tga20 recém-natos, observamos o mesmo padrão obtido em camundongos com idade entre 5 e 6 semanas (Figura 4.4). Análise em camundongos de 9 meses mostrou que o envelhecimento não altera a distribuição das diferentes subpopulações de timócitos em cada grupo, embora os animais apresentem decréscimo no número total de timócitos, como esperado (Figura 4.4).



**Figura 4.4: Bloqueio de diferenciação em timócitos de camundongos Tga20.**

Timócitos provenientes de camundongos selvagens (WT), nocautes para o gene Prnp (Prnp<sup>0/0</sup>) e superexpressando este gene (Tga20) foram analisados quanto à expressão das moléculas CD4 e CD8. Em A, C e E perfis de citometria de fluxo mostrando a marcação para CD4/CD8 em timócitos de camundongos em diferentes idades. Os percentuais das subpopulações definidas por CD4/CD8 estão mostrados no interior dos perfis de citometria de cada grupo. Em B, D e F números absolutos de timócitos em cada subpopulação dos grupos analisados. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão, com 3 a 5 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  em relação aos camundongos do tipo selvagem, +  $p < 0,05$  em relação ao camundongo Prnp<sup>0/0</sup>.

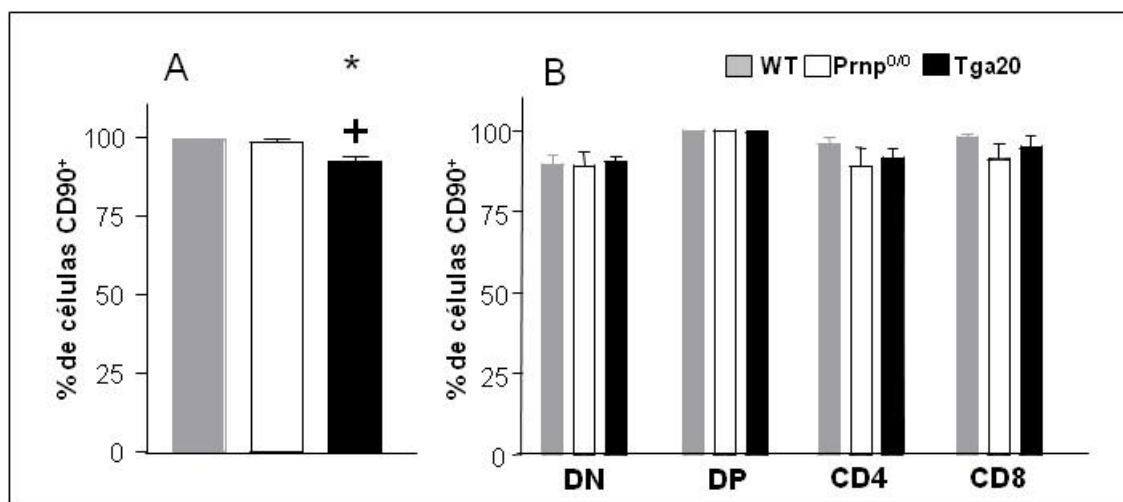
#### 4.1.5. Acúmulo de células de fenótipo $CD4^-CD8^-CD44^-CD25^+$ (DN3) no timo de camundongos transgênicos para a proteína prion celular

Considerando os altos números relativos de timócitos DN no timo do camundongo Tga20, avaliamos se estas células pertenceriam de fato a linhagens de células T. Tendo em vista que a molécula CD90 (o antígeno Thy-1) é expressa em linfócitos T desde os estágios iniciais de desenvolvimento de timócitos DN (Porritt et al., 2004), utilizamos esse marcador como um parâmetro para a análise da população total de linfócitos T no timo. Observamos que a expressão membranar de CD90 é significativamente menor na população total de timócitos de camundongos Tga20, quando comparados aos demais grupos (Figura 4.5A). Porém, quando a expressão dessa mesma molécula foi avaliada em cada uma das subpopulações de células T, não verificamos alterações significativas entre os camundongos analisados (Figura 4.5B). Este dado indica que as alterações detectadas no camundongo Tga20, dentro da população de células DN, não refletem modulações de populações não-T presentes no timo, como células B e dendríticas, mas seja resultado de um bloqueio na via de maturação de linfócitos T  $\alpha\beta$  nesses animais.

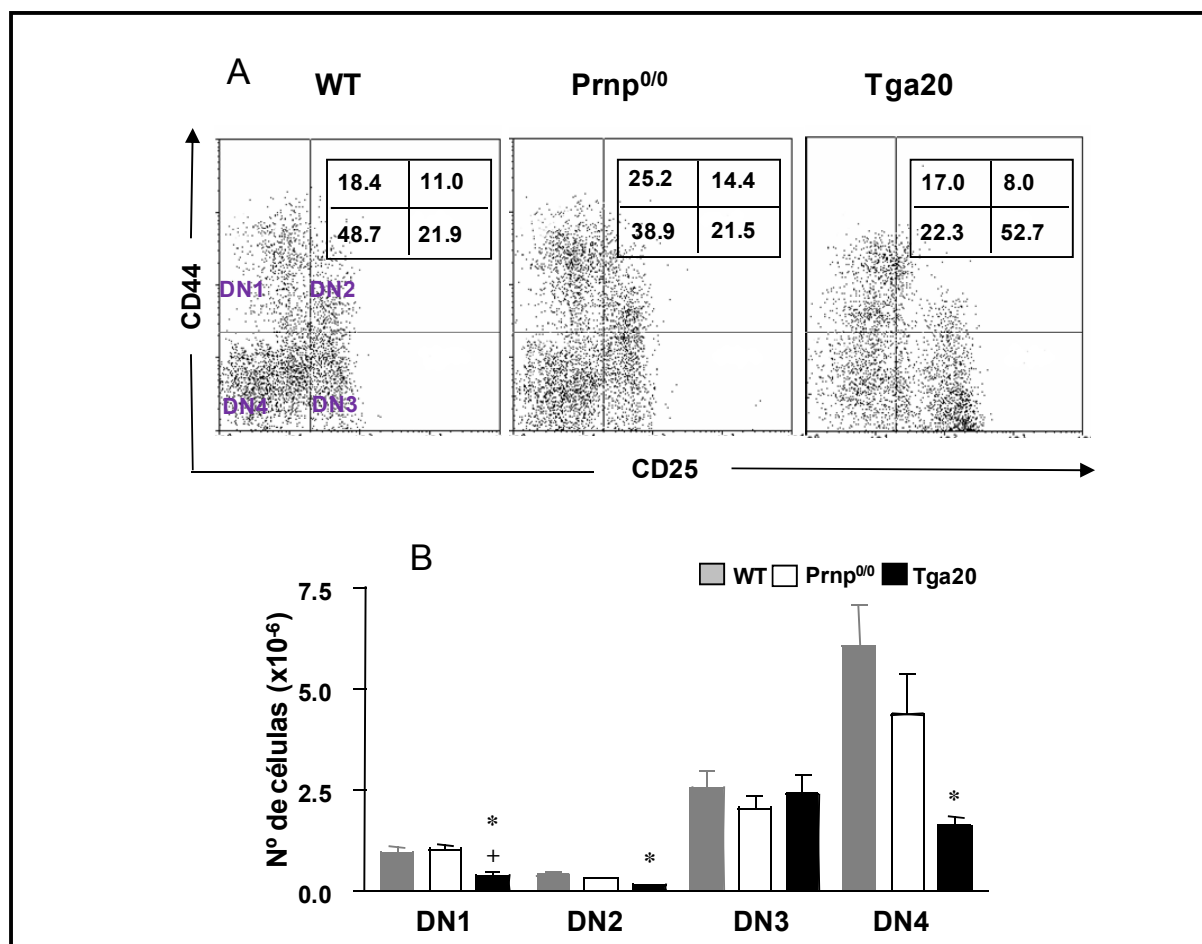
Os estágios de desenvolvimento de células imaturas DN foram avaliados através da análise da expressão diferencial das moléculas CD44 e CD25, que ocorre normalmente durante a progressão desta subpopulação. A seleção das células DN foi realizada apenas pela ausência de marcação para as moléculas CD4 e CD8. Como demonstrado na Figura 4.6A, quando comparados aos animais controle ou àqueles deficientes para PrP<sup>C</sup>, os camundongos Tga20 mostraram alteração nestes estágios, com aumento relativo de células em estágio DN3 ( $CD44^-CD25^+$ ), e diminuição do percentual de células no estágio DN4 ou pré-DP ( $CD44^-CD25^-$ ). Por outro lado, em camundongos nocautes, observamos aumento significativo no

percentual de timócitos no estágio DN1, quando comparados aos grupos controle e Tga20 (Figura 4.6A).

A análise do número absoluto de células nos estágios iniciais de diferenciação mostrou que os camundongos Tga20, quando comparados aos animais selvagens, apresentavam diminuição significativa do número total de células já no estágio DN1, em DN2, e também no estágio mais avançado, DN4 (Figura 4.5D). Esses dados sugerem que a expressão aumentada de PrP<sup>C</sup> interfere em pelo menos dois estágios do desenvolvimento de células T: no estágio precursor DN1 e no estágio seletivo DN3.



**Figura 4.5. Expressão de CD90 em timócitos dos camundongos com variações na expressão de PrP<sup>C</sup>.** Timócitos provenientes de camundongos selvagens (WT), nocautes para o gene Prnp (Prnp<sup>0/0</sup>) e super-expressando este gene (Tga20) foram analisados por citometria de fluxo quanto à expressão de CD90 na população total (A) e nas subpopulações de timócitos definidos pela expressão de CD4/CD8 (B). Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão, com 3 a 5 animais por grupo. \* p<0,05 em relação aos camundongos controle WT; + p<0,05 em relação ao camundongo Prnp<sup>0/0</sup>.



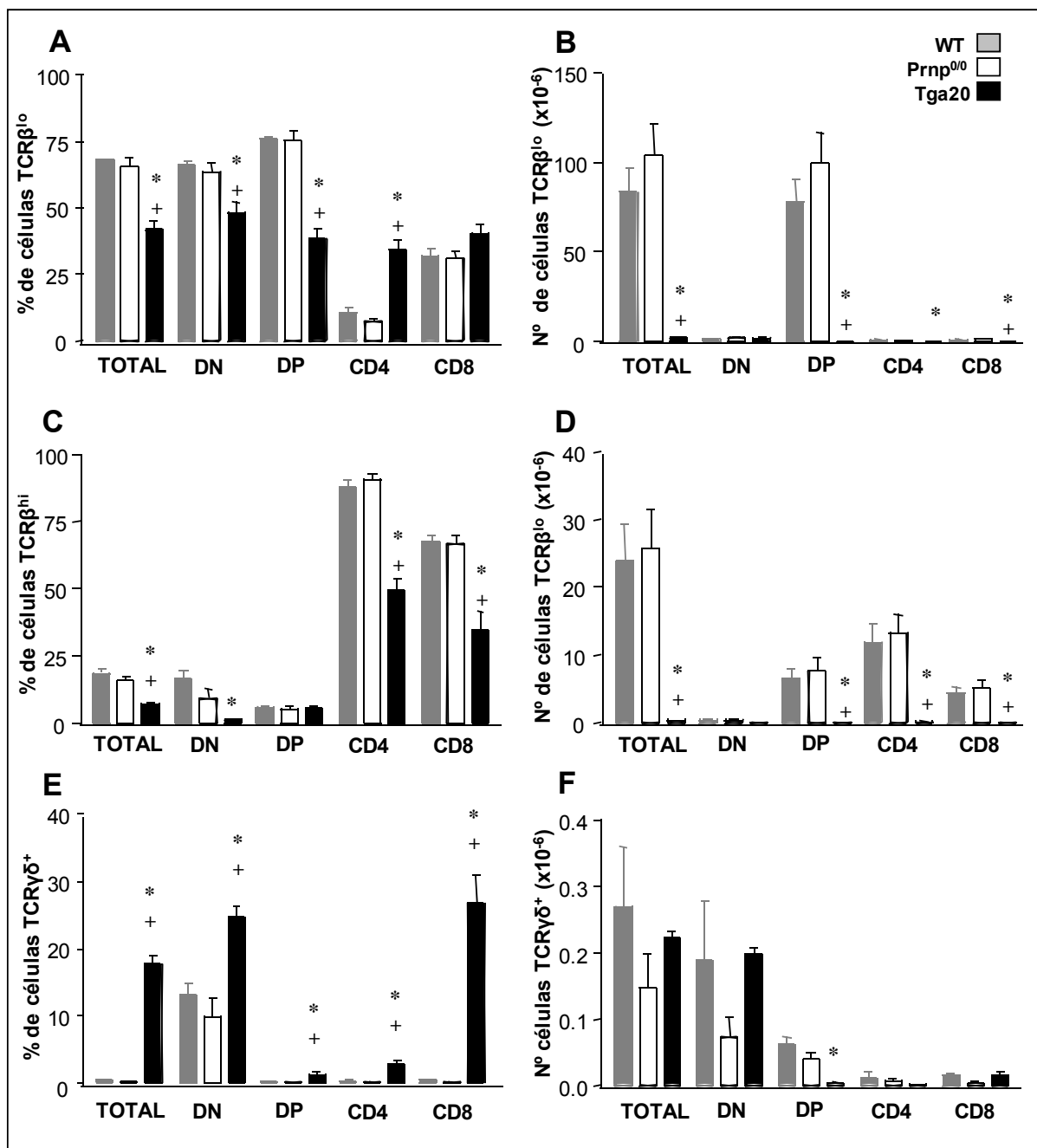
**Figura 4.6: Acúmulo de timócitos em DN3 no timo de camundongos Tga20.** Timócitos provenientes de camundongos selvagens (WT), nocautes para o gene Prnp (Prnp<sup>0/0</sup>) e super-expressando este gene (Tga20). (C) Perfis de citometria de fluxo mostrando a marcação para CD44/CD25 em células CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> definidas como DN1 (CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>), DN2 (CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), DN3 (CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>) e DN4 (CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>). Os percentuais de cada subpopulação estão mostrados no interior dos perfis de citometria de cada grupo. (D) Número absoluto de timócitos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> em cada estágio de diferenciação nos grupos analisados. Dados apresentados como média ± erro padrão, com 3 a 5 animais por grupo. \* p<0,05 em relação aos camundongos controle WT; + p<0,05 em relação ao camundongo Prnp<sup>0/0</sup>.

#### 4.1.6. Expressão alterada de heterodímeros do receptor de células T em timócitos de camundongos Tga20

Nosso próximo passo foi investigar se o bloqueio de diferenciação observado no timo do camundongo Tga20 poderia estar associado a um desvio de diferenciação de linfócitos T  $\alpha\beta$  para linfócitos T  $\gamma\delta$ , levando assim ao pequeno número de timócitos DP, e simples positivos CD4 e CD8. Dessa forma analisamos a expressão dessas moléculas em timócitos de camundongos do tipo selvagem, Prnp<sup>0/0</sup> e Tga20. Uma análise mais detalhada sobre a expressão da cadeia  $\beta$  do TCR nas subpopulações de timócitos nos indica um retardo no amadurecimento de timócitos do camundongo Tga20. Verificamos que enquanto os animais nocautes e selvagens apresentam um perfil semelhante de expressão da molécula, nos camundongos Tga20 ocorre uma diminuição significativa do percentual de timócitos expressando TCR $\beta$  em diferentes densidades, quando comparados aos outros dois grupos. Quando avaliamos a cadeia  $\beta$  do TCR em baixas densidades (Figuras 4.7A e B), observamos no camundongo Tga20 diferenças entre as células DN, DP e SP CD4. Já a análise dessa molécula em altas densidades (Figuras 4.7C e D) mostrou, como esperado, uma diminuição entre os timócitos SP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> e CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>. Entretanto, observamos também uma diminuição no número de timócitos DN TCR  $\beta^{hi}$ , indicando que essa subpopulação madura de timócitos  $\alpha\beta$  DN também é afetada pela expressão aumentada de PrP<sup>C</sup>.

A expressão do TCR  $\gamma\delta$  foi analisada em todas as subpopulações de timócitos, apesar de sua maior ocorrência entre as células DN (Pardoll et al., 1988). Essa análise mostrou nos timócitos do camundongo Tga20, uma diminuição em números absolutos de células DP TCR  $\gamma\delta^{+}$  (Figura 4.7F), e também que apesar de haver aumento no percentual de timócitos expressando a molécula TCR  $\gamma\delta$  em todas as

subpopulações de timócitos, esse aumento não se traduzia em diferença significativa, em termos de números absolutos (Figuras 4.7E-F). Esses resultados indicam que não há um desvio de diferenciação para a população de células T  $\text{TCR}\gamma\delta^+$ , mas sim um bloqueio na via de maturação da população de células T  $\text{TCR}\alpha\beta^+$ .

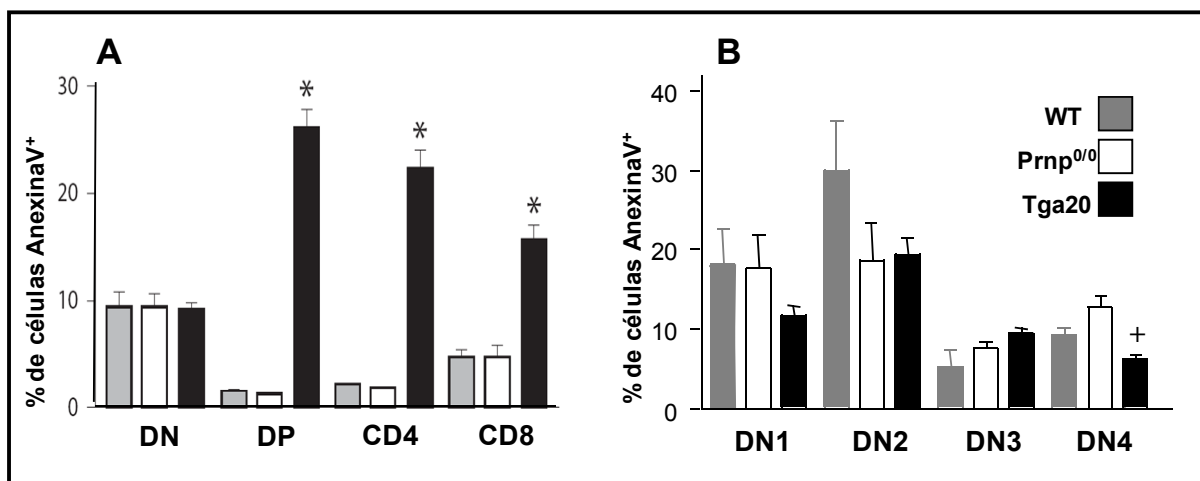


**Figura 4.7: Timócitos com perfil mais imaturo em camundongos Tga20.** Expressão membranar de TCR β em baixa densidade (A e B) e alta densidade (C e D) na população total e nas subpopulações DN, DP, SP CD4 e CD8 de timócitos; são apresentados os números relativos (A e C) e absolutos (B e D). Também é mostrada expressão de TCR γδ em timócitos totais e subpopulações em números relativos (E) e absolutos (F). Dados apresentados como média ± erro padrão, com 3 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  em relação aos camundongos do tipo selvagem, +  $p < 0,05$  em relação ao camundongo Prnp<sup>0/0</sup>.



#### 4.1.7. Aumento de morte celular em camundongos super-expressando PrP<sup>C</sup>

O acúmulo de timócitos DN e a grande diminuição de timócitos DP e SP observados no camundongo Tga20 poderiam ser decorrentes de um aumento de morte celular nos estágios finais de DN ou mesmo a partir de DP. Sendo assim, avaliamos a marcação para anexina V em timócitos recém-isolados das três linhagens de camundongos estudadas. Nos timócitos dos camundongos Tga20 encontramos aumento de células anexina V positivas nas subpopulações DP e simples positivas CD4 e CD8, quando comparadas aos timócitos WT (Figura 4.8A). Como não observamos aumento de células mortas entre os timócitos DN, avaliamos tal subpopulação de forma mais aprofundada, utilizando os marcadores CD44 e CD25 (Figura 4.8B). No entanto, os percentuais de marcação para anexina V nos estágios DN foram semelhantes entre as três linhagens, indicando assim que a deficiência no processo de maturação de timócitos do Tga20 deve-se, pelo menos em parte, ao aumento de morte observado nas subpopulações DP e SP CD4 e CD8. Nos camundongos Prnp<sup>0/0</sup> não verificamos nenhuma alteração nas proporções de células anexina V positivas em nenhuma das subpopulações de timócitos analisadas.



**Figure 4.8: Suscetibilidade a morte em timócitos com diferentes níveis de expressão de PrP<sup>C</sup>.** Timócitos obtidos dos camundongos WT, Prnp<sup>0/0</sup> e Tga20 foram analisados por citometria de fluxo quanto à marcação com anexina V nas subpopulações de timócitos definidos por CD4/CD8 (A) e entre as células DN definidas pela expressão de CD44/CD25 (B). Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão, com 6 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  em relação aos camundongos do tipo selvagem, +  $p < 0,05$  em relação ao camundongo Prnp<sup>0/0</sup>.

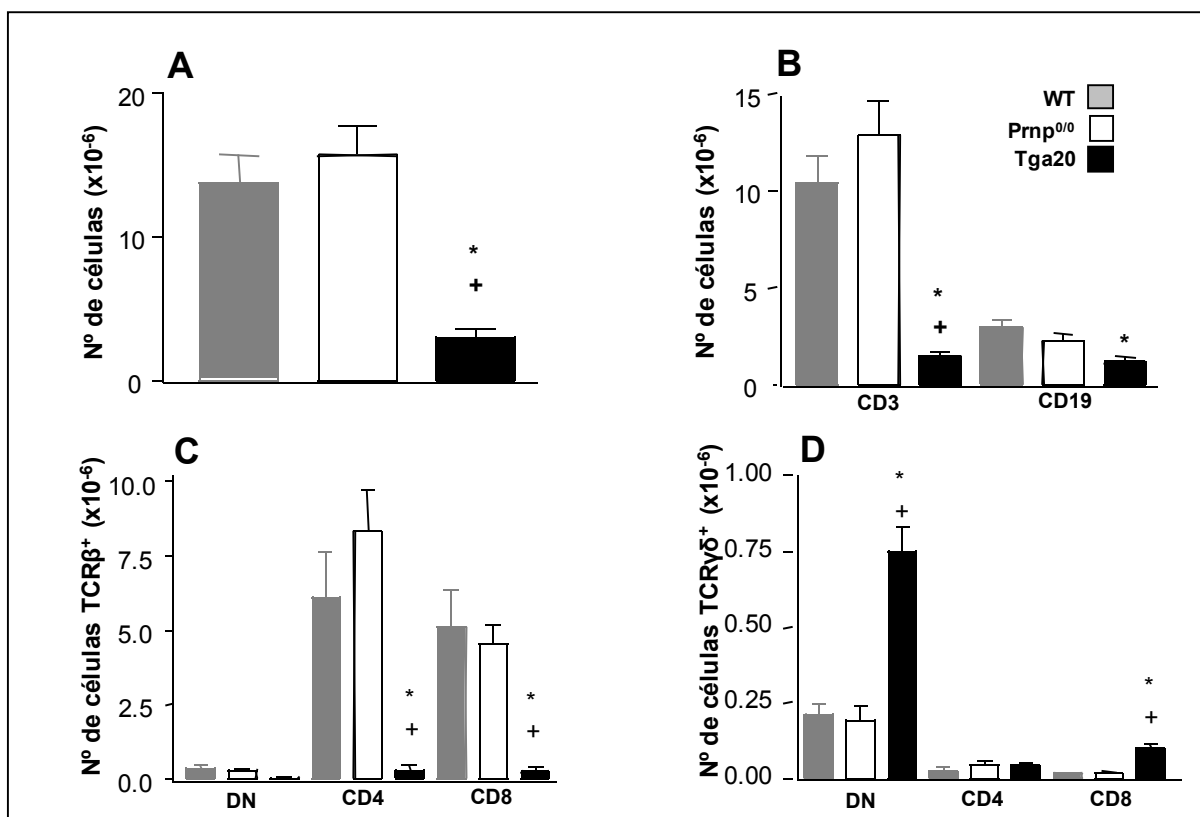
#### 4.1.8. Alteração nas subpopulações de linfócitos T nos órgãos linfóides periféricos de camundongos Tga20

Tendo em vista a menor produção de timócitos pelos camundongos Tga20, analisamos órgãos linfóides periféricos do sistema imune desses animais e dos animais nocautes e controles, mais especificamente linfonodos subcutâneos, linfonodos mesentéricos e baço.

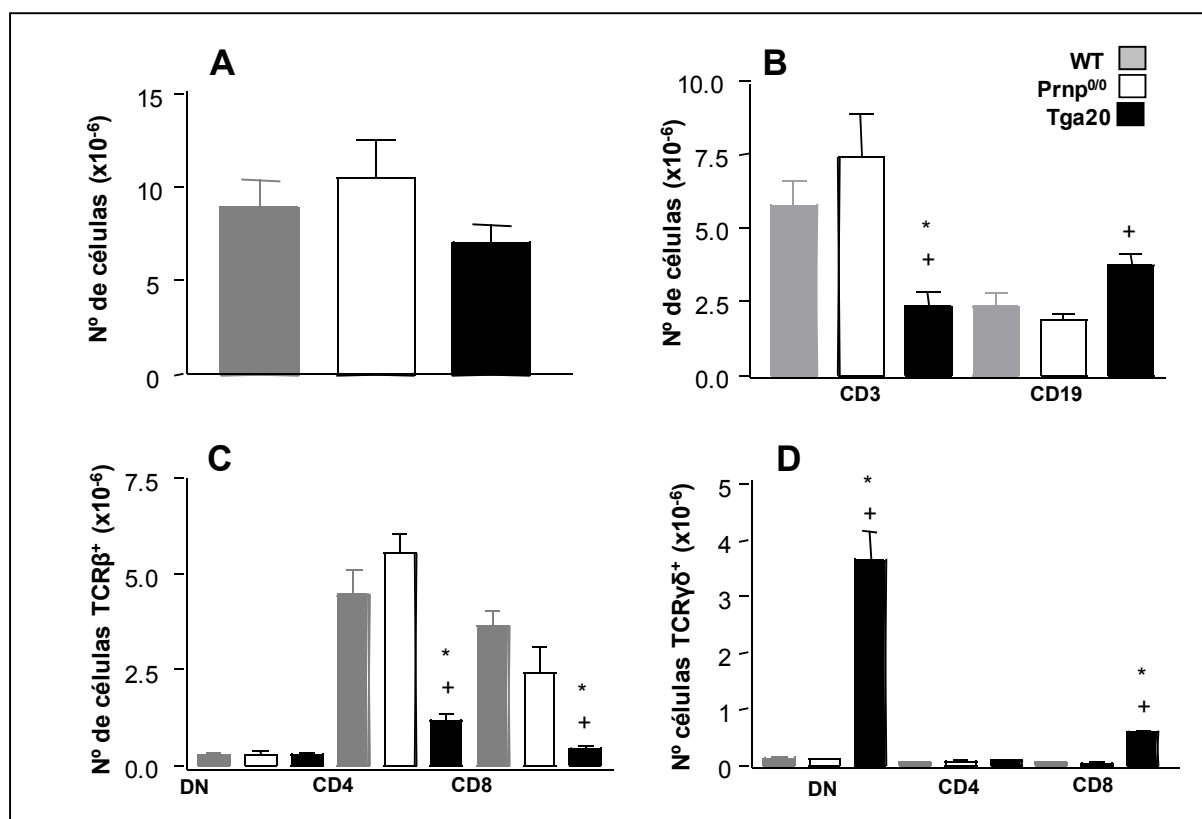
A análise dos linfonodos subcutâneos mostrou nos camundongos Tga20 um decréscimo no número total de linfócitos (Figura 4.9A), com uma acentuada diminuição de linfócitos T CD3<sup>+</sup>, e também de linfócitos B CD19<sup>+</sup> (Figura 4.9B). Encontramos nos linfonodos subcutâneos do camundongo Tga20 uma diminuição de células TCR $\beta$ <sup>+</sup> na subpopulação CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, assim como nas subpopulações

CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> e CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, caracterizando uma diminuição em toda população de células T  $\alpha\beta$ . Por outro lado, observamos aumento de células TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> e TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> nestes animais, quando comparados aos camundongos controle. Nos linfonodos subcutâneos dos camundongos Prnp<sup>0/0</sup> não observamos alterações em relação aos controles WT.

Nos linfonodos mesentéricos das três linhagens de camundongos analisadas também encontramos nos camundongos Tga20 um menor número de linfócitos T, no entanto, esses órgãos apresentam algumas diferenças em relação aos linfonodos subcutâneos. Primeiramente, como pode ser observado na Figura 4.10A não existem diferenças significativas no número total de linfócitos encontrados nos linfonodos mesentéricos dos camundongos WT, Prnp<sup>0/0</sup> e Tga20. No entanto, podemos observar uma tendência de aumento de linfócitos B CD19<sup>+</sup> nos Tga20, e assim como nos linfonodos subcutâneos, uma redução no número de linfócitos T CD3<sup>+</sup> no camundongo Tga20 (Figura 4.10B). Analisando as subpopulações de linfócitos T, quanto à expressão das moléculas CD4 e CD8, encontramos novamente um menor número de linfócitos T  $\alpha\beta$  CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> e CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> (Figura 4.10C), assim como aumento de células CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> expressando TCR $\gamma\delta$  (Figura 4.10D).



**Figura 4.9: Menor número de linfócitos T nos linfonodos subcutâneos de camundongos Tga20.** (A) Contagem de linfócitos totais nos linfonodos subcutâneos de camundongos WT, Prnp<sup>0/0</sup> e Tga20. (B) Números absolutos de linfócitos T CD3<sup>+</sup> e B CD19<sup>+</sup>. Também são mostrados números absolutos de linfócitos TCRβ<sup>+</sup> (C) e TCRγδ<sup>+</sup> (D) analisados quanto a expressão das moléculas CD4 e CD8. Dados apresentados como média ± erro padrão, com 3 a 5 animais por grupo. \* p<0,05 em relação aos camundongos do tipo selvagem, + p<0,05 em relação ao camundongo Prnp<sup>0/0</sup>

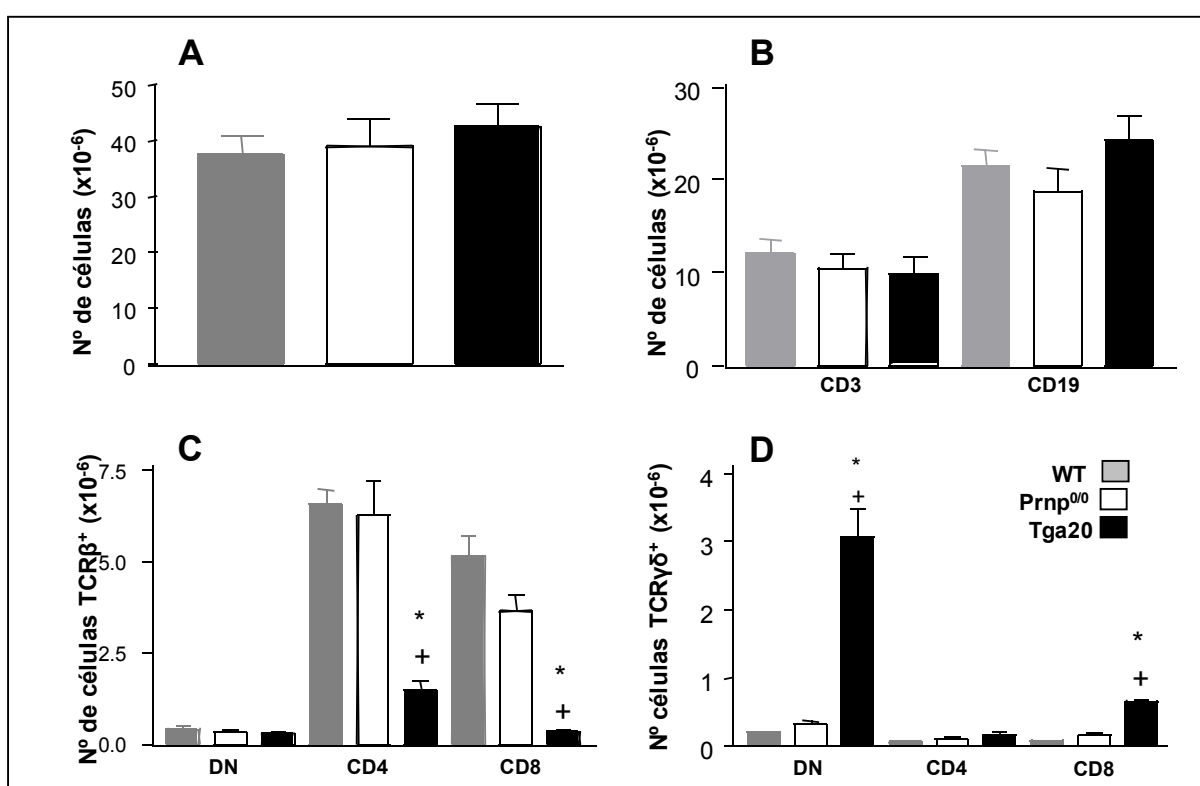


**Figura 4.10: Menor número de linfócitos T nos linfonodos mesentéricos de camundongos Tga20.** (A) Contagem de linfócitos totais nos linfonodos subcutâneos de camundongos WT, Prnp<sup>0/0</sup> e Tga20. (B) Números absolutos de linfócitos T CD3<sup>+</sup> e B CD19<sup>+</sup>. Também são mostrados números absolutos de linfócitos TCRβ<sup>+</sup> (C) e TCRγδ<sup>+</sup> (D) analisados quanto a expressão das moléculas CD4 e CD8. Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão, com 3 a 5 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  em relação aos camundongos controle WT, +  $p < 0,05$  em relação ao camundongo Prnp<sup>0/0</sup>.

Já no baço, não observamos nenhuma diferença no número absoluto de esplenócitos (Figura 4.11A), e a análise das moléculas CD3 e CD19 não indica diferenças entre os camundongos analisados (Figura 4.11B). Tais diferenças foram apenas evidenciadas através da análise das subpopulações de linfócitos T quanto à expressão de CD4 e CD8. De fato, observamos uma diminuição nas subpopulações

TCR $\beta^+$ CD4 $^+$ CD8 $^-$  e TCR $\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^+$  no baço dos camundongos Tga20, e um aumento de linfócitos T  $\gamma\delta$  (Figuras 4.11C-D).

Cumprе salientar que a diminuição de linfócitos T  $\alpha\beta$ , observada no camundongo Tga20 em relação aos camundongos WT e Prnp $^{0/0}$ , é mais evidente nos linfonodos subcutâneos, do que nos linfonodos mesentéricos e no baço, assim como o aumento de linfócitos T  $\gamma\delta$  é maior nesses dois últimos.



**Figura 4.11: Menor número de linfócitos T nos baços de camundongos Tga20.**

(A) Contagem de linfócitos totais nos baços de camundongos WT, Prnp $^{0/0}$  e Tga20. (B) Números absolutos de linfócitos T CD3 $^+$  e B CD19 $^+$ . Também são mostrados números absolutos de linfócitos TCR $\beta^+$  (C) e TCR $\gamma\delta^+$  (D) analisados quanto a expressão das moléculas CD4 e CD8. Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão, com 3 a 5 animais por grupo. \* p < 0,05 em relação aos camundongos do tipo selvagem, + p < 0,05 em relação ao camundongo Prnp $^{0/0}$ .

## **4.2. Importância da proteína prion celular na resposta migratória de timócitos**

Neste segundo conjunto de resultados pretendemos avaliar uma possível participação de PrP<sup>C</sup> na migração de timócitos. Dessa forma apresentamos a seguir resultados cujos experimentos buscavam estabelecer uma correlação entre a expressão diferencial de PrP<sup>C</sup>, existentes nos modelos geneticamente modificados estudados por nós, e a migração de linfócitos em diferentes estágios de maturação, em resposta a diferentes estímulos direcionadores do processo migratório.

### *4.2.1. Defeito na migração induzida por moléculas de matriz extracelular e CXCL12 em timócitos de camundongos com diferentes níveis de expressão de PrP<sup>C</sup>*

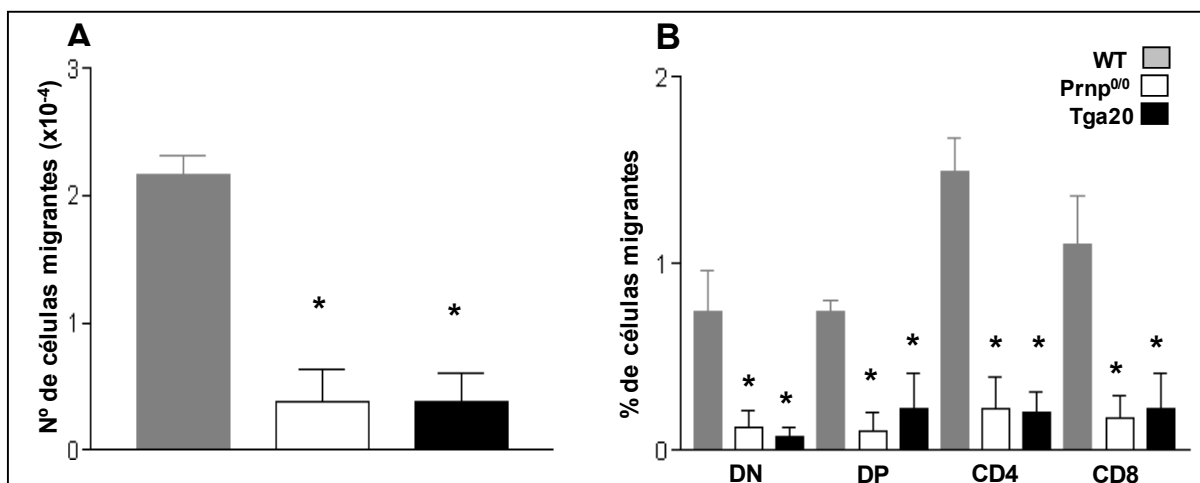
O processo de diferenciação de timócitos é dependente da interação dessas células, com diferentes nichos do microambiente tímico. Para que tal interação ocorra, é essencial a migração dos timócitos, interagindo com células que formam o arcabouço tímico e com moléculas produzidas por essas células, como as moléculas de matriz extracelular. Nesse contexto, além de defeitos relacionados aos processos de diferenciação propriamente ditos, os timócitos do camundongo Tga20 também poderiam apresentar alterações em sua capacidade migratória, prejudicando assim seu processo de diferenciação. Uma indicação de que tal fenômeno esteja acontecendo é o menor número de linfócitos T encontrados nos órgãos linfóides secundários analisados. Analisamos assim a resposta migratória de timócitos dos camundongos com diferentes níveis de expressão de PrP<sup>C</sup> frente a moléculas de matriz extracelular, laminina e fibronectina, e frente à quimiocina CXCL12, as quais participam do processo migratório de timócitos no microambiente tímico.

Utilizando laminina como estímulo haptotático de migração, observamos na população total de timócitos dos camundongos Prnp<sup>0/0</sup> e Tga20 uma resposta

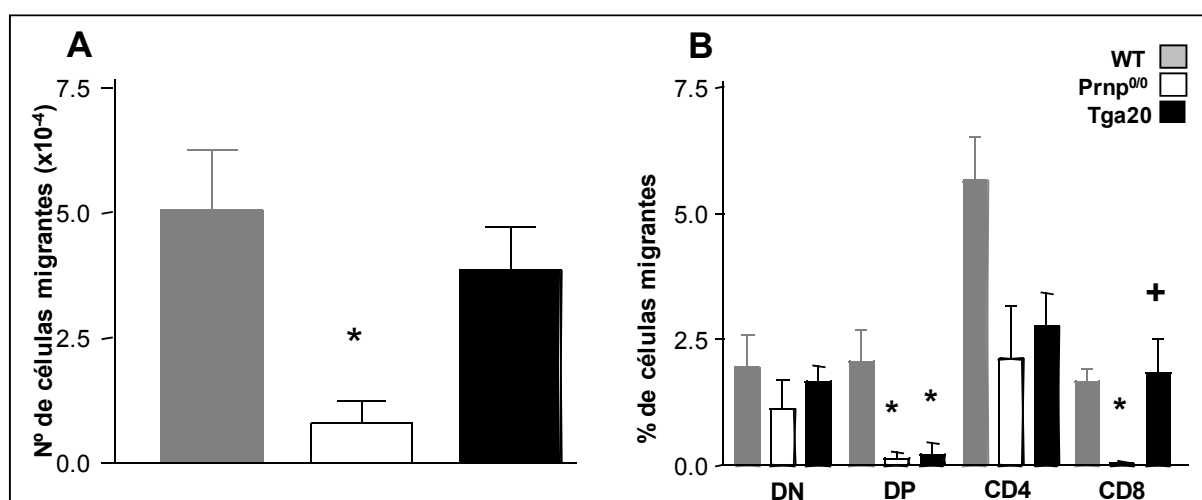
migratória reduzida, quando comparada aos camundongos WT (Figura 4.12A). Avaliando o percentual de células migrantes pertencentes a uma determinada subpopulação, definida pela expressão diferencial de CD4 e CD8, vimos uma diminuição significativa em todas as subpopulações de timócitos dos camundongos Prnp<sup>0/0</sup> e Tga20 comparados aos camundongos controles (Figura 4.12B).

Quando avaliamos a migração frente à fibronectina observamos que timócitos de camundongos Prnp<sup>0/0</sup> apresentam uma resposta migratória reduzida quando comparados aos camundongos WT. Este resultado foi observado nos timócitos totais (Figura 4.13A), e no percentual de células DP e SP CD8 migrantes, além de uma tendência de diminuição nos timócitos SP CD4 (Figura 4.13B). Já no camundongo Tga20 não houve diferença entre os números de timócitos totais que migraram frente à fibronectina. Esse resultado reflete a resposta migratória de células DN do camundongo Tga20, semelhante à de camundongos controles. Nesses animais, apenas a subpopulação DP apresentou menor resposta migratória significativa em relação à mesma subpopulação do camundongo WT (Figura 4.13B).





**Figura 4.12: Migração de timócitos com diferentes níveis de expressão de PrP<sup>C</sup> frente à laminina.** Timócitos isolados de timos de camundongos WT, Prnp<sup>0/0</sup> e Tga20 foram colocados sobre membranas de nitrocelulose com poros de 5 µm tratadas com laminina 10 µg/mL ou BSA na mesma concentração, após 4 horas os timócitos que migraram para o poço inferior foram recolhidos e contados em câmara de Neubauer. (A) Números de timócitos totais após subtração das células migradas em BSA. (B) Percentual de células migrantes realizado a partir da subtração das células migradas em BSA, nas subpopulações definidas pelas moléculas CD4/CD8. Dados apresentados como média ± erro padrão, com n=3. \* p<0,05 em relação aos camundongos controle WT, + p<0,05 em relação ao camundongo Prnp<sup>0/0</sup>.

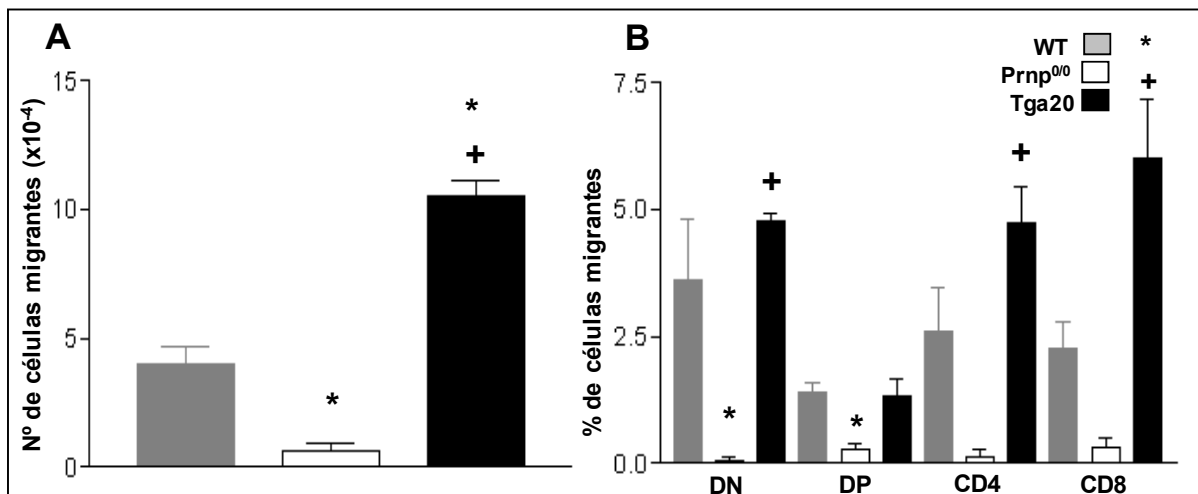


**Figura 4.13: Migração de timócitos com diferentes níveis de expressão de PrP<sup>C</sup> frente à fibronectina.** Timócitos isolados de timos de camundongos WT, Prnp<sup>0/0</sup> e Tga20 foram colocados sobre membranas de nitrocelulose com poros de 5  $\mu$ m tratadas com fibronectina 10  $\mu$ g/mL ou BSA na mesma concentração, após 4 horas os timócitos que migraram para o poço inferior foram recolhidos e contados em câmara de Neubauer. (A) Números de timócitos totais após subtração das células migradas em BSA. (B) Percentual de células migrantes nas subpopulações definidas pelas moléculas CD4/CD8 após subtração das células migradas em BSA. Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão, com 3 a 4 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  em relação aos camundongos selvagens, +  $p < 0,05$  em relação ao camundongo Prnp<sup>0/0</sup>.

No microambiente tímico a quimiocina CXCL12 é encontrada principalmente na região subcapsular e na medula tímica, enquanto seu receptor CXCR4 é encontrado em todas as subpopulações de timócitos (Campbell et al., 1999). Sendo assim avaliamos a migração de timócitos das linhagens de camundongos estudadas também em relação à CXCL12, com o intuito de verificar se os defeitos de migração encontrados se estendem a estímulos quimiotáticos de migração. De fato, vimos que timócitos de camundongos Prnp<sup>0/0</sup> apresentaram menor resposta migratória frente à CXCL12, quando comparados aos timócitos do camundongo controle (Figura 4.14A), podendo ser observadas diferenças significativas em relação ao controle nas

subpopulações DN e DP, e uma clara tendência de diminuição nas células SP CD4 e CD8 (Figura 4.14B). Por outro lado, os camundongos Tga20 apresentaram aumento de migração em relação ao controle na população de timócitos totais (Figura 4.14A), enquanto que dentre as subpopulações, encontramos aumento no percentual de células migrantes em relação ao controle, apenas nas células SP CD8 (Figura 4.14B).

Esses dados mostram que o camundongo  $Prnp^{0/0}$  apesar de não apresentar defeitos na diferenciação de timócitos, possui respostas migratórias deficientes frente aos três estímulos utilizados. Por outro lado, o camundongo Tga20 apresenta diferentes respostas migratórias frente a estímulos diferentes, e que também variam quanto à subpopulação responsiva.

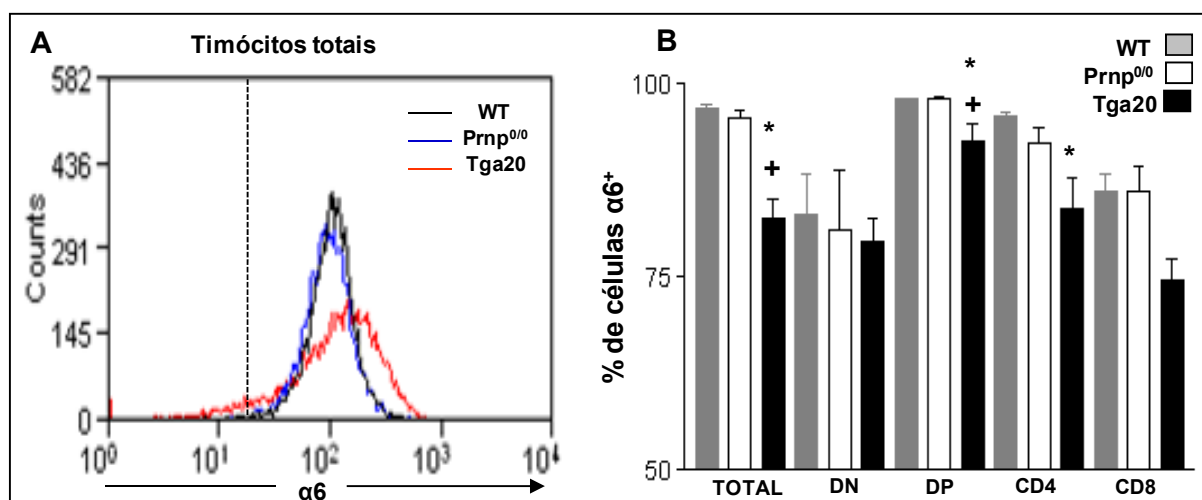


**Figura 4.14: Migração de timócitos com diferentes níveis de expressão de PrP<sup>C</sup> frente a quimiocina CXCL12.** (A) Migração de timócitos totais de camundongos WT,  $Prnp^{0/0}$  e Tga20 em direção a CXCL12 (100 ng/mL). (B) Percentual de células migrantes das subpopulações de timócitos definidas pela expressão das moléculas CD4/CD8 em direção a CXCL12. Resultados obtidos após subtração das células migradas em direção a CXCL12 das células que migraram em direção ao meio em ausência de CXCL12. Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão, com 3 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  em relação aos camundongos controle WT, +  $p < 0,05$  em relação ao camundongo  $Prnp^{0/0}$ .

#### 4.2.2. Expressão de receptores de moléculas de matriz extracelular e de CXCL12 em timócitos expressando níveis variáveis da proteína prion celular

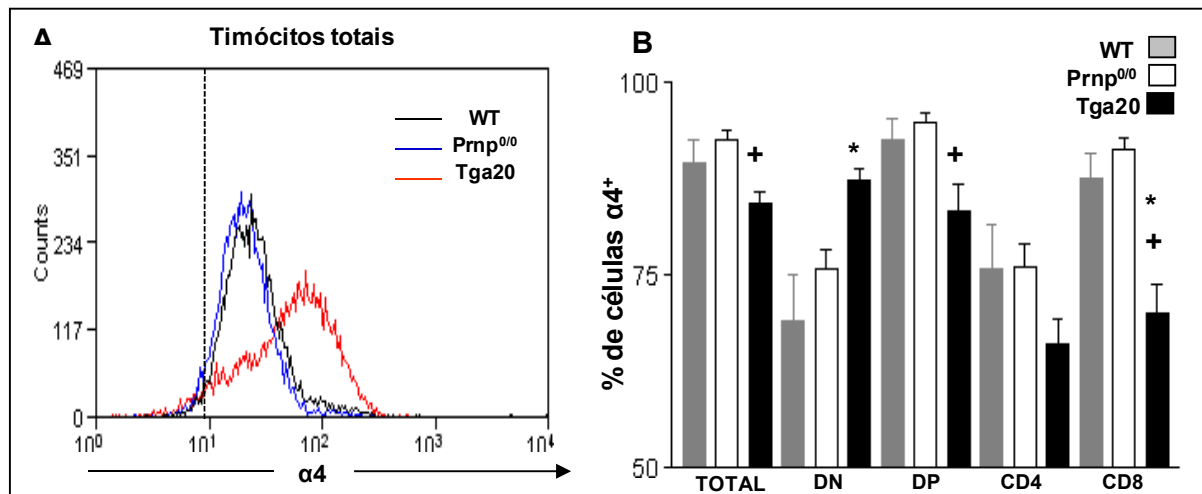
Como observamos respostas migratórias alteradas nos camundongos com diferentes níveis de expressão de PrP<sup>C</sup> frente às moléculas de matriz extracelular laminina e fibronectina, e à quimiocina CXCL12, avaliamos se a expressão dos receptores de tais moléculas poderia estar alterada nestes camundongos.

Inicialmente analisamos a expressão de CD49f (a cadeia  $\alpha 6$  do receptor de laminina VLA-6). Nos camundongos Tga20 verificamos uma pequena diminuição no percentual de timócitos expressando CD49f (Figura 4.15B). Nas diferentes subpopulações definidas por CD4 e CD8, observamos uma pequena, mas significativa diminuição nos timócitos DP e SP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (Figura 4.15B).



**Figura 4.15: Expressão do receptor de laminina em timócitos.** Os histogramas em A mostram a expressão da cadeia  $\alpha 6$  (CD49f) do receptor de laminina VLA-6 na população total de timócitos nos camundongos WT (curva em preto), Prnp<sup>0/0</sup> (curva em azul) e Tga20 (curva em vermelho). Marcação específica observada a partir da linha tracejada. Também é mostrada a expressão da cadeia  $\alpha 6$  na população total de timócitos e nas subpopulações em números relativos (B). Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão, N-3 por grupo. \*  $p < 0,05$  em relação aos camundongos controle WT, +  $p < 0,05$  em relação ao camundongo Prnp<sup>0/0</sup>.

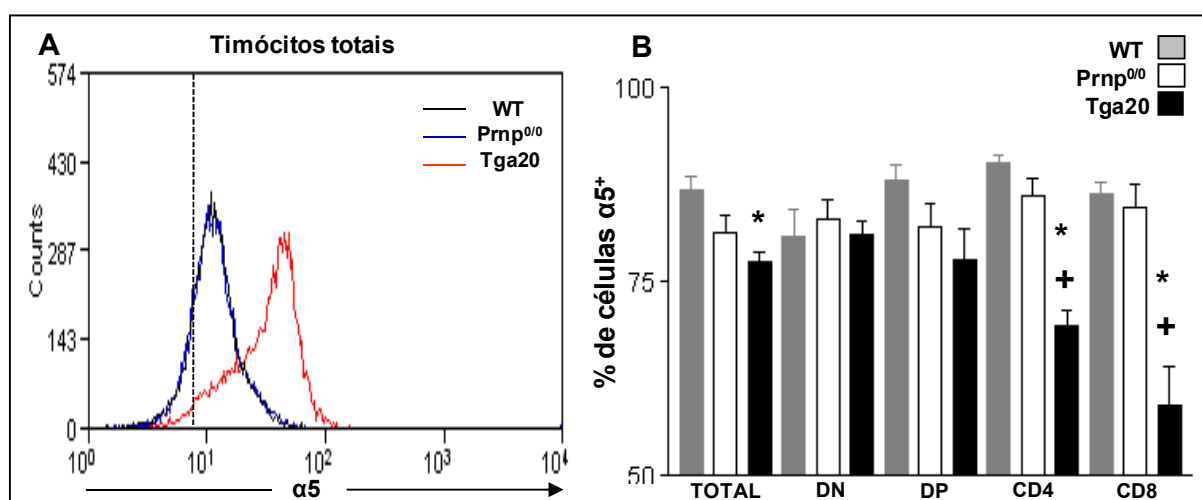
Também avaliamos a expressão das cadeias  $\alpha 4$  (CD49d) e  $\alpha 5$  (CD49e), componentes das integrinas VLA-4 e VLA-5, respectivamente, as quais são receptores de fibronectina. Verificamos, quanto à expressão de CD49d, pequenas alterações no percentual de timócitos positivos nos camundongos Tga20 em relação aos controles. Por outro lado, nesses mesmos animais, observamos nos timócitos DN um pequeno, mas significativo aumento em relação aos camundongos controles, e uma diminuição significativa nas células SP  $CD4^-CD8^+$  (Figura 4.16B). Quanto à expressão da cadeia CD49e, verificamos diminuição no percentual de timócitos SP  $CD4$  e  $CD8$  do camundongo Tga20 em relação aos controles (Figuras 4.17A e 4.17B). Nos animais  $Prnp^{0/0}$  nenhuma alteração na expressão das cadeias  $\alpha$  das integrinas estudadas foi observada em relação aos camundongos controles.



**Figura 4.16: Expressão da cadeia  $\alpha 4$  receptor de fibronectina VLA-4 em timócitos.** Os histogramas em A mostram a expressão da cadeia  $\alpha 4$  (CD49d) do receptor de fibronectina VLA-4 na população total de timócitos nos camundongo WT (curva em preto),  $Prnp^{0/0}$  (curva em azul) e Tga20 (curva em vermelho). Marcação específica observada a partir da linha tracejada. (B) Expressão da cadeia  $\alpha 4$  na população total de timócitos e nas subpopulações em números relativos. Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão, N=3 por grupo. \*  $p < 0,05$  em relação aos camundongos WT, +  $p < 0,05$  em relação ao camundongo  $Prnp^{0/0}$ .

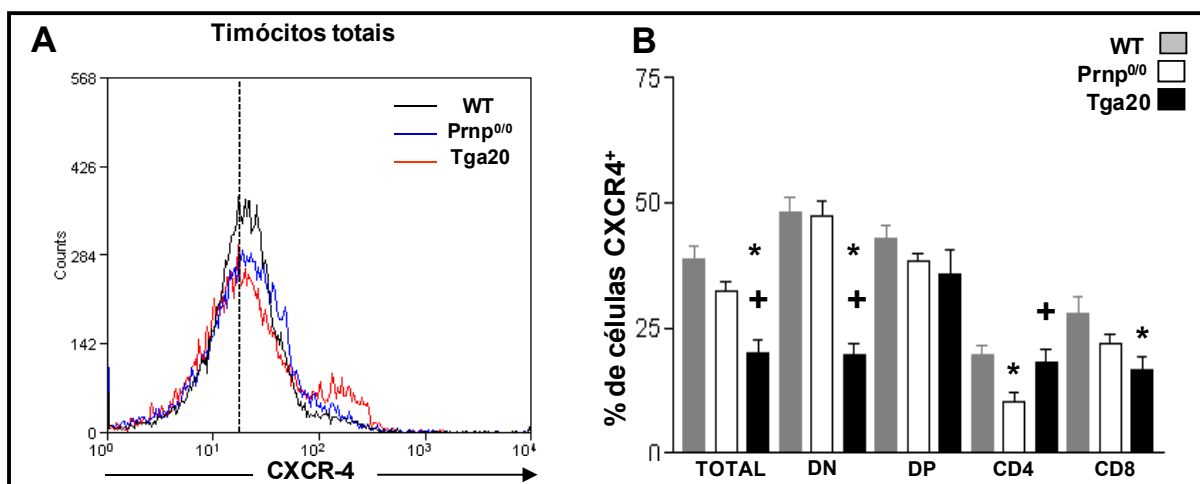
Quanto à expressão de CXCR4, receptor de CXCL12, encontramos uma diminuição significativa entre os timócitos DN e SP CD8 dos camundongos Tga20, e uma diminuição nas células SP CD4 do camundongo Prnp<sup>0/0</sup> (Figura 4.18).

Apesar das pequenas flutuações nos percentuais de timócitos do camundongo Tga20 expressando as cadeias  $\alpha$  das integrinas avaliadas, as mesmas não refletem as respostas migratórias destes timócitos, o que poderia estar relacionado a um estado de ativação modificado nos timócitos deste camundongo. O mesmo pode ser considerado em relação ao camundongo Prnp<sup>0/0</sup>, que, apesar de apresentar resposta migratória diminuída frente a laminina e fibronectina (quando comparados aos animais controles), não apresenta alterações na expressão dos receptores destas moléculas em timócitos.



**Figura 4.17: Expressão da cadeia  $\alpha 5$  do receptor de fibronectina VLA-5 em timócitos.**

Os histogramas em A mostram a expressão da cadeia  $\alpha 5$  (CD49e) na população total de timócitos nos camundongos WT (curva em preto), Prnp<sup>0/0</sup> (curva em azul) e Tga20 (curva em vermelho). Marcação específica observada a partir da linha tracejada. (B) Expressão da cadeia  $\alpha 5$  na população total de timócitos e nas subpopulações em números relativos. Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão, N=3 por grupo. \* p<0,05 em relação aos camundongos do tipo selvagem, + p<0,05 em relação ao camundongo Prnp<sup>0/0</sup>.



**Figura 4.18. Expressão do receptor CXCR4 em timócitos.** Os histogramas em A mostram a expressão do receptor de CXCL12, CXCR4 na população total de timócitos nos camundongo WT (curva em preto), Prnp<sup>0/0</sup> (curva em azul) e Tga20 (curva em vermelho). Marcação específica observada a partir da linha tracejada. (B) Percentual de células expressando CXCR-4 na população total de timócitos e nas subpopulações. Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão, com 4 a 5 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  em relação aos camundongos do tipo selvagem, +  $p < 0,05$  em relação ao camundongo Prnp<sup>0/0</sup>.

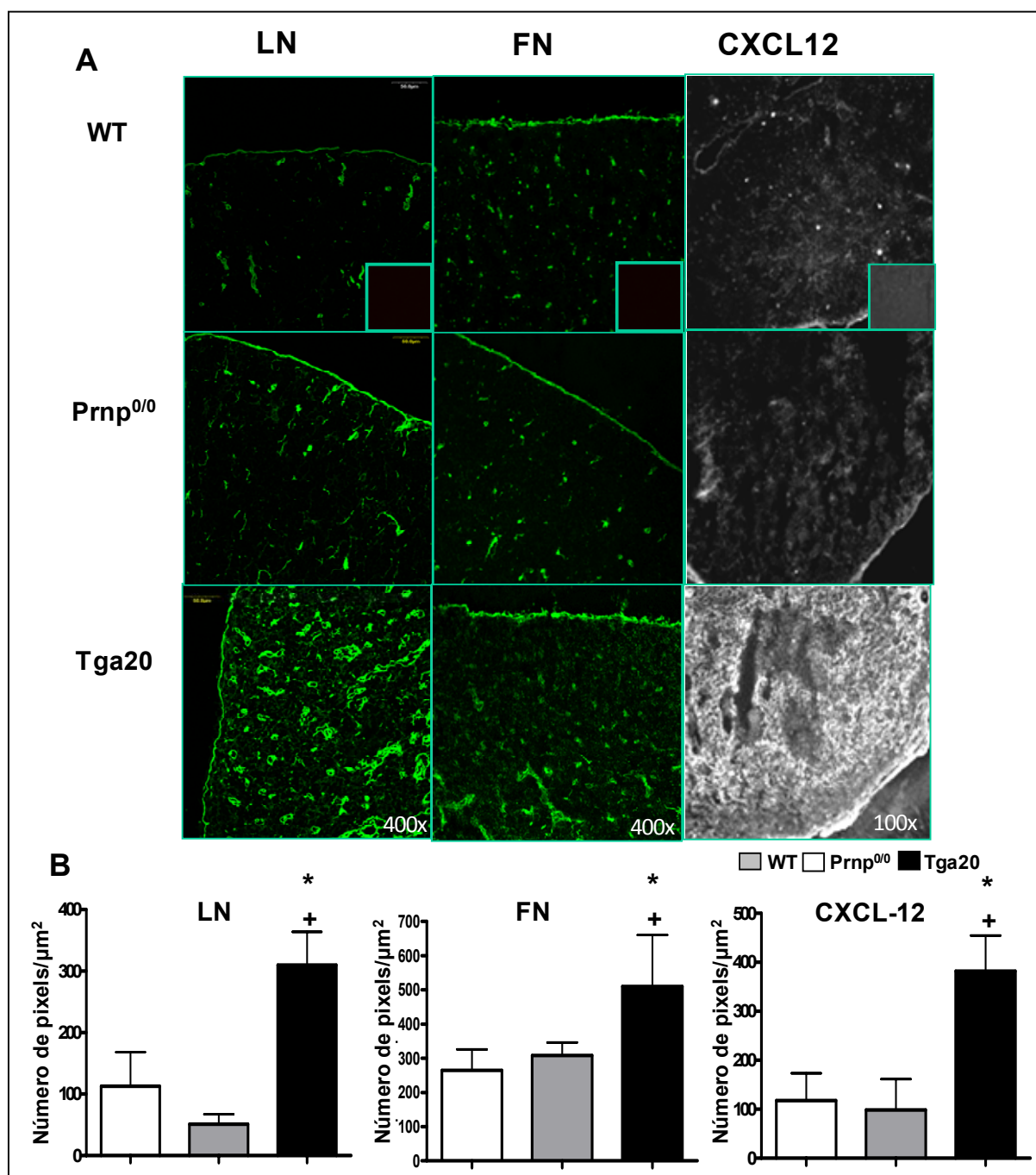
#### 4.2.3. Expressão aumentada de moléculas de matriz extracelular e CXCL12 no timo de camundongos super-expressando PrP<sup>C</sup>

Em função do defeito de diferenciação nos timos de camundongos super-expressando PrP<sup>C</sup>, além das alterações nas respostas migratórias de timócitos que não expressam tal molécula, ou que a super-expressam, julgamos também pertinente avaliar no timo dos animais estudados a expressão das moléculas utilizadas no ensaios de migração *in vitro*, as quais poderiam *in vivo*, alterar respostas migratórias e influenciar a diferenciação de timócitos.

Verificamos que os timos de camundongos Tga20 apresentam aumento da expressão de laminina em toda extensão do órgão, quando comparados aos timos de camundongos controles e nocautes (Figuras 4.19A e B). Por outro lado, os timos de animais Prnp<sup>0/0</sup> apresentaram apenas um discreto aumento de expressão de

laminina na região cortical, quando comparados aos timos de animais controle, o que não reflete um aumento significativo na expressão desta molécula (Figuras 4.19A e B). Vimos ainda um aumento de fibronectina no timo do Tga20, tanto na região cortical quanto na medular. Já no camundongo  $Prnp^{0/0}$ , não observamos aumento desta molécula quando comparado aos controles (Figuras 4.19A e B). Por fim, também detectamos aumento de CXCL12 no timo de camundongos Tga20 em relação aos controles, e nenhuma alteração no timo do camundongo  $Prnp^{0/0}$  (Figuras 4.19A e B).



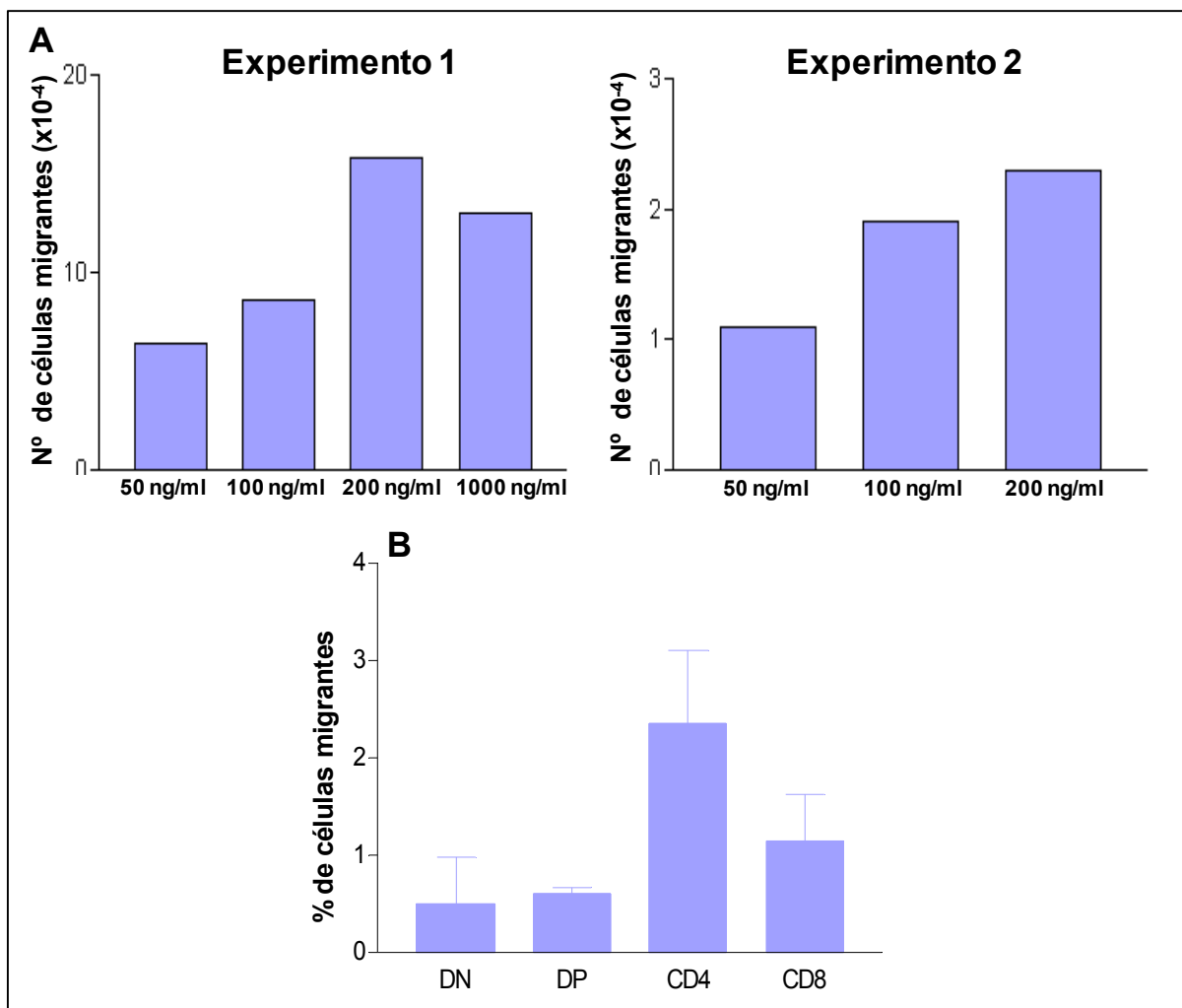


**Figura 4.19. Aumento de ligantes de matriz extracelular e de CXCL12 no microambiente tímico do camundongo Tga20.** (A) Expressão das moléculas laminina (esquerda) e fibronectina (centro) em aumento de 400x, e de CXCL12 (direita) em aumento de 100 vezes em timos de camundongos WT, Prnp<sup>0/0</sup> e Tga20. Os inserts representam o controle de Ig não relacionada. (B) Quantificação da deposição de laminina (esquerda), fibronectina (centro) e CXCL12 (direita) em timos dos camundongos analisados. Em A fotomicrografias representativas de pelo menos 3 animais por grupo. Em B dados

apresentados como média  $\pm$  erro padrão, com 3 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  em relação aos camundongos do tipo selvagem, +  $p < 0,05$  em relação ao camundongo  $Prnp^{0/0}$ .

#### 4.2.4. $PrP^C$ como molécula quimioatraente para timócitos

No presente trabalho, utilizamos camundongos geneticamente modificados para estudar um possível papel de  $PrP^C$  na fisiologia do timo. No entanto, utilizamos também a molécula  $PrP^C$  solúvel como estímulo quimiotático para avaliar se esta molécula pode estar diretamente envolvida na migração de timócitos. Inicialmente, realizamos ensaios de migração utilizando diferentes doses de  $PrP^C$  na câmara inferior do inserto de *transwell*. Na Figura 4.20A são mostrados dois experimentos, onde podemos observar que a resposta migratória de timócitos obtidos de camundongos normais aumenta quando estimulados com doses crescentes de  $PrP^C$ , até a concentração de 200 ng/mL. Entretanto, em concentração de  $PrP^C$  5 vezes maior (isto é, 1000 ng/mL) o número de células que migraram era menor, indicando uma possível saturação de receptores. Na Figura 4.20B, através do percentual de células migrantes nas subpopulações de timócitos migrando em direção a  $PrP^C$  a 200 ng/mL, podemos ver que todas as subpopulações migram em resposta a  $PrP^C$ , com as células SP CD4 e CD8 apresentando maior responsividade.



**Figura 4.20: PrP<sup>C</sup> como molécula quimioatratante.** (A) Dois ensaios independentes cada um feito com pool de timos de 3 animais, referentes a migração de timócitos totais de camundongos WT, em direção a diferentes concentrações de PrP<sup>C</sup> na câmara inferior. (B) Percentual de células migrantes das subpopulações de timócitos definidas pela expressão das moléculas CD4/CD8 em direção a diferentes concentrações de PrP<sup>C</sup>. Dados de 2 ensaios independentes, com n=2. Todos os resultados obtidos após subtração das células migradas em direção ao meio em ausência de PrP<sup>C</sup>.

## 6. Discussão

Diversos trabalhos têm sugerido a participação da proteína prion celular na ativação de linfócitos T maduros, muito embora ainda existam controvérsias quanto aos eventos controlados por PrP<sup>C</sup> (ver revisão Isaac et al, 2006). A demonstração recente de que animais Prnp<sup>0/0</sup> apresentam maior susceptibilidade à encefalomielite autoimune experimental (Tsutsui et al, 2008; Ingram et al, 2009), além de uma resposta alterada na infecção pela bactéria *Streptococcus pyogenes* (Ingram et al, 2009) indicam fortemente sua importância na fisiologia do sistema imune. O possível envolvimento de PrP<sup>C</sup> na apresentação antigênica, sendo expresso em linfócitos T e células dendríticas (Ballerini et al, 2006), sugere ainda uma participação na interação entre timócitos e células do microambiente tímico, essenciais no desenvolvimento de linfócitos T. A expressão de PrP<sup>C</sup> na superfície de timócitos (Liu et al, 2001; Jouvin-Marche et al, 2006) e em células do microambiente tímico, como TECs (Ford et al, 2002) e células dendríticas (Martinez del Hoyo et al, 2006), fortalece esta hipótese. Por outro lado, PrP<sup>C</sup> também é encontrada no meio extracelular, na forma solúvel (Parizek et al, 2001; Harris et al, 1993) e associada a vesículas exossômicas (derivadas da via exocítica) ou em microvesículas de membrana (Liu et al, 2002; Porto-Carreiro et al, 2005; Mattei et al, 2009). Assim, PrP<sup>C</sup> poderia estar envolvida na interação célula-célula ou na ativação de receptores expressos na superfície celular dos timócitos ou de células do microambiente.

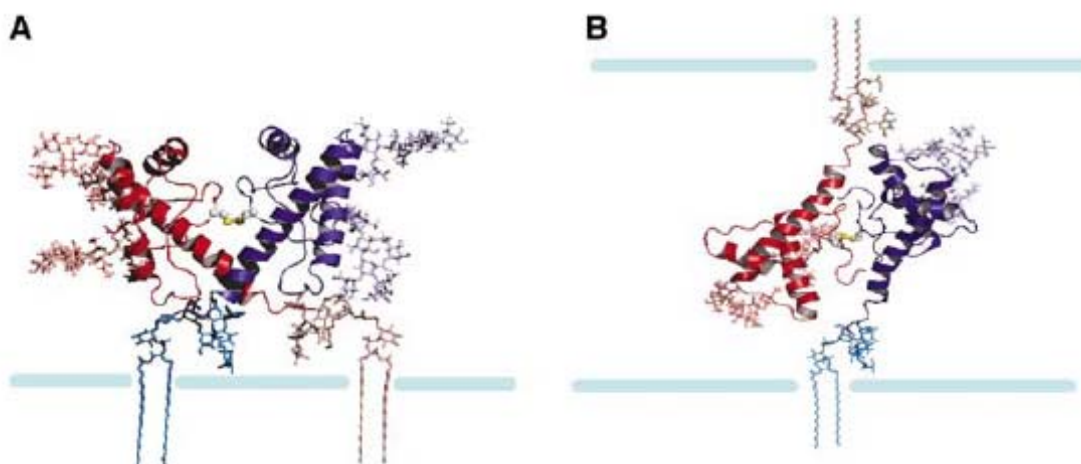
Embora muitos ligantes já tenham sido descritos para PrP<sup>C</sup>, ainda não se sabe se existe um ligante principal, ou se suas funções dependeriam de sua interação com diferentes parceiros. Nesse sentido, foi sugerido que PrP<sup>C</sup> poderia atuar como uma plataforma que serviria de base para a interação de várias proteínas, que se

ligariam diretamente à própria PrP<sup>C</sup> ou a moléculas associadas, formando um complexo multiprotéico. As interações celulares dependentes de PrP<sup>C</sup> dependeriam do nível de expressão da molécula e de seus ligantes e das características do microambiente extracelular. Dessa forma as vias de sinalização deflagradas dependeriam das interações possíveis em determinada célula. Este tipo de complexo multimolecular poderia explicar os diferentes processos biológicos onde a participação de PrP<sup>C</sup> já foi descrita (Linden et al, 2008).

Entre os vários ligantes de PrP<sup>C</sup> já evidenciados, alguns são sabidamente expressos no timo, como heparan sulfato (Werneck et al, 2000; Garner et al, 2008) e laminina (Kutlesa et, 2002; Ocampo et al, 2008), ambos constituintes da matriz extracelular. Outro ligante de PrP<sup>C</sup>, cuja expressão no timo já foi observada em nosso Laboratório, mas que ainda não foi descrita na literatura, é a molécula STI-1. Detectamos sua expressão em linhagens de células epiteliais tímicas, e *in situ* no próprio órgão, sendo observada marcação em regiões de córtex e medula (dados não mostrados).

Outra forma de interação mediada por PrP<sup>C</sup>, seria por ligações homofílicas entre monômeros de PrP<sup>C</sup>. Baseado em dados obtidos por ressonância magnética nuclear sobre a estrutura de PrP<sup>C</sup>, e em resultados sobre a função do domínio hidrofóbico (HD) da molécula (ver Figura 1.1), foram construídos modelos de dímeros de PrP<sup>C</sup> presentes na superfície celular (Rambold et al, 2008). São sugeridas duas formas de interação entre os monômeros: na primeira, ambos estariam presentes na membrana celular da mesma célula; na segunda, os monômeros estariam presentes em células adjacentes (Figura 6,1). Dímeros de PrP<sup>C</sup> já haviam sido sugeridos anteriormente (Priola et al, 1995; Meyer et al, 2000), com o domínio HD como um possível sítio de dimerização (Warwicker, 2000). A interação homofílica entre

moléculas de PrP<sup>C</sup> foi sugerida no endotélio cerebral, favorecendo o contato célula-célula e participando da migração transendotelial de células circulantes, como monócitos (Viegas et al, 2006).



**Figura 6.1. Modelo estrutural de um dímero de PrP<sup>C</sup>.** (A) Os dois monômeros ligados, ambos na mesma célula. (B) Dímero em conformação trans: monômeros ligados a células vizinhas (Obtido a partir de Rambold et al, 2008).

A seguir, discutiremos nossos resultados na forma de sub-ítem.

### Expressão de PrP<sup>C</sup> no timo

Nesse trabalho, buscamos identificar um possível papel funcional de PrP<sup>C</sup> no desenvolvimento de linfócitos T. Para tal, utilizamos como ferramentas camundongos com variação na expressão de PrP<sup>C</sup>. Com essa abordagem genética, procuramos avaliar, o processo de maturação intratímica de linfócitos T e a atividade migratória dos timócitos.

A expressão de PrP<sup>C</sup> em timócitos e em células do microambiente tímico é um importante dado na condução deste trabalho. Nesse sentido, confirmamos

inicialmente a ausência de expressão de PrP<sup>C</sup> nos camundongos nocautes e a maior expressão de PrP<sup>C</sup> nos timócitos dos camundongos Tga20. Em trabalhos anteriores, a expressão em células do epitélio foi sugerida por marcação *in situ* de células com aspecto epitelial (Ford et al, 2002), principalmente na medula e, em menor extensão, no córtex. Também *in situ*, foi observada expressão de GFP dirigida pelo promotor de PrP<sup>C</sup> em TECs medulares (Lemaire-Vieille et al, 2000). Em nosso trabalho, detectamos a expressão de PrP<sup>C</sup> em linhagens de TECs com características fenotípicas de córtex e também em linhagens com características fenotípicas de medula tímica. Esse dado sugere que células localizadas em diferentes regiões, poderiam utilizar PrP<sup>C</sup> como via de interação com timócitos, influenciando assim, eventos que ocorrem em diferentes regiões do timo, como os processos de seleção  $\beta$ , seleção positiva e negativa, além da migração dos timócitos nas diferentes regiões dos lóbulos tímicos.

Além disso, nosso trabalho foi o primeiro a demonstrar a expressão de PrP<sup>C</sup> em células do endotélio tímico, através da análise da linhagem endotelial tímica tEnd.1 (Terra-Granado et al, 2007). Esse dado nos leva a pensar em uma participação nos processos de entrada de precursores e/ou saída de timócitos do órgão. Dados mostrando que PrP<sup>C</sup> está envolvida na migração transendotelial de monócitos fortalecem tal hipótese (Viegas et al, 2006). A expressão de PrP<sup>C</sup> foi observada em regiões de contato entre células endoteliais adjacentes do cérebro de camundongos WT. No entanto, em culturas mistas com células endoteliais obtidas de camundongos WT e Prnp<sup>0/0</sup>, a expressão de PrP<sup>C</sup> na região de contato só é observada entre células WT, não entre células WT e Prnp<sup>0/0</sup>. Esse dado sugere a existência de interações homofílicas entre monômeros de PrP<sup>C</sup> localizados na região de contato entre células adjacentes. Além disso, o bloqueio da migração

transendotelial de monócitos por anticorpos anti-PrP<sup>C</sup> indica a participação dessa molécula na passagem de células circulantes pela barreira hemato-encefálica (Viegas et al, 2006).

### PrP<sup>C</sup> na diferenciação intratímica de linfócitos T

As análises morfológicas e das subpopulações de timócitos das linhagens de camundongos estudadas nos mostraram que os camundongos Tga20, com super-expressão de PrP<sup>C</sup>, apresentam uma intensa hipoplasia tímica. Esta é caracterizada por um bloqueio parcial de diferenciação, com acúmulo de células no estágio DN3 e redução nas subpopulações subseqüentes.

Dessa forma, realizamos uma análise do perfil dos timócitos DN do camundongo Tg20, objetivando uma melhor compreensão sobre o que ocorre na transição de DN para DP. A análise dos estágios de diferenciação na subpopulação DN sugere que as alterações no timo de camundongos Tga20 possam estar ocorrendo desde os estágios iniciais de diferenciação, pois o número absoluto de células em DN1 e DN2 é significativamente menor do que nos animais controles. Essa alteração pode estar relacionada a defeitos na entrada de precursores da medula óssea no timo ou mesmo na produção desses precursores. Em DN3, apesar do aumento percentual, não há alteração do número absoluto de células em relação ao controle. A alteração principal se deve ao menor número de células no estágio DN4 ou pré-DP. Fisiologicamente, em DN4 ocorre uma intensa proliferação de timócitos que passaram pela chamada seleção  $\beta$  em DN3. Quando esta proliferação é deficiente, observa-se acúmulo em DN3 à semelhança do que observamos no Tga20.

Já foi demonstrado que várias moléculas estão envolvidas na regulação da diferenciação de DN1 para DN2, como Notch1 e WNT (revisado em Rezzani et al,



2008), assim como a molécula de sinalização intercelular Sonic Hedgehog (Shh), a qual atua durante o desenvolvimento regulando a organogênese. Em camundongos deficientes para a molécula Shh, foi observado um bloqueio na transição entre DN1 e DN2, além de um segundo defeito na transição para DP, com aumento de morte celular em DN4. Esses dados indicam que esta molécula gere sinais necessários para a transição de DN1 para DN2 e esteja envolvida na produção de células  $CD4^+CD8^+$  (Shah et al. 2004). De forma semelhante, PrP<sup>C</sup> poderia atuar em momentos diferentes da diferenciação de timócitos, uma vez que nos camundongos que super-expressam essa molécula, observamos diminuição nos estágios DN1 e DN2, e também uma diminuição em DN4.

Em camundongos deficientes para as enzimas RAG-1 (do Inglês *recombination activating genes 1*) e RAG-2 (Mombaerts et al, 1992; Shinkai et al, 1992) -- que controlam o rearranjo gênico nos seguimentos V, D e J das cadeias do TCR --, e em camundongos com deficiência em quaisquer dos componentes do complexo pré-TCR (Fehling et al, 1995; Malissen et al, 1993; Mombaerts et al, 1992), há um severo bloqueio no desenvolvimento de linfócitos T no estágio DN3. Tal bloqueio se deve ao evento de seleção  $\beta$ , onde timócitos imaturos expressando uma cadeia  $\beta$  do TCR funcional, a qual se associa com uma cadeia invariante substituta pré-TCR $\alpha$  (pT $\alpha$ ) e cadeias da molécula sinalizadora CD3 (formando o complexo pré-TCR) são selecionados para prosseguir a diferenciação na linhagem de timócitos expressando TCR  $\alpha\beta$ . A sinalização pelo complexo pré-TCR está relacionada classicamente a múltiplas respostas celulares que incluem sobrevivência, intensa proliferação (6 a 8 ciclos), parada na recombinação do *locus* TCR $\beta$ , diferenciação em DP e início do rearranjo do locus TCR $\alpha$  (Dudley et al, 1994; Levelt et al, 1995; Koyasu et al, 1997; revisado em Ciofani e Zuniga-Pflucker, 2007). Nossos dados mostram nos

camundongos Tga20 um acúmulo de células em DN3, com diminuição em DN4, além de não haver aumento de morte celular entre as células DN, indicando assim, que a diminuição do número de células em DN4, e conseqüentemente, nas subpopulações subqüentes, ocorra devido a uma menor proliferação nesse estágio. Adicionalmente, a análise da expressão da cadeia  $\beta$  do TCR, demonstra que timócitos do camundongo Tga20 expressam essa molécula em menor densidade do que os timócitos do camundongo controle, indicando um possível retardo de diferenciação nessas células. No curso da diferenciação, na transição entre DN e DP, timócitos diminuem a expressão de CD25 e aumentam CD5 (Bhandoola, et al, 1999). A análise dessas moléculas no timo do camundongo Tga20 demonstrou a presença de CD25 em uma grande proporção de células DP, e ainda em timócitos SP CD4 e CD8 (Jouvin-Marche et al, 2006). Além disso, a maioria das células DP e metade das SP CD4 expressam CD5 em baixos níveis. A molécula CD69 também é utilizada como marcador na diferenciação de timócitos: sua expressão é observada após a seleção positiva em timócitos DP e em SP imaturos (Nakayama, et al, 2002). A análise de sua expressão no camundongo Tga20 revelou uma redução na expressão de CD69 em células SP CD4, sugerindo uma seleção positiva parcialmente prejudicada (Jouvin-Marche et al, 2006). Esses dados, juntamente com uma menor expressão do TCR, favorecem a possibilidade de também estar ocorrendo nos timócitos de animais Tga20 um defeito no processo de maturação. Nossos dados de marcação com anexina V revelaram aumento de morte celular nas subpopulações DP, e SP para CD4 e CD8 de camundongos Tga20, quando comparados aos camundongos do tipo selvagem. Esses dados indicam que além de defeitos relacionados à seleção  $\beta$ , os timócitos dos animais transgênicos para PrP<sup>C</sup> podem também apresentar defeitos nas seleções positiva e/ou negativa que ocorrem

durante esses estágios de desenvolvimento, e que estão relacionados à sinalização deflagrada a partir da interação do TCR $\alpha\beta$  com o complexo peptídeo-MHC (pMHC). Nos camundongos Tga20, a super-expressão de PrP<sup>C</sup> poderia interferir na sinalização via TCR, como demonstrado para outras moléculas (Rowbotham et al, 2007), alterando assim o processo de diferenciação de timócitos, em diferentes estágios. A possível interação de PrP<sup>C</sup> com moléculas do complexo TCR (Stuermer et al, 2004; Mattei et al, 2004; Paar et al, 2007) poderia alterar essa sinalização numa situação de desequilíbrio (super-expressão).

Em outro modelo animal de super-expressão de PrP<sup>C</sup>, o camundongo Tga33, onde a molécula é superexpressa apenas em linfócitos T (devido ao direcionamento da expressão gênica pelo promotor da tirosina-quinase Lck), a diferenciação intratímica de linfócitos também foi avaliada (Jouvin-Marche et al, 2006). Apesar do defeito ser menos acentuado que em camundongos Tga20, os animais Tga33 apresentam hipoplasia tímica com números reduzidos de timócitos, aumento no percentual de timócitos DN e diminuição nos DP, o que reforça a interferência da super-expressão de PrP<sup>C</sup> nos processos de diferenciação de timócitos.

As alterações encontradas na diferenciação intratímica vistas no camundongo Tga20 nos levaram a analisar órgãos periféricos do sistema imune desses animais. Como esperado, encontramos diminuição na população de linfócitos T  $\alpha\beta$  e aumento na população T  $\gamma\delta$  do baço, linfonodos subcutâneos e linfonodos mesentéricos. No entanto, comparando os três compartimentos linfóides, pudemos observar, diferentes padrões na distribuição das populações linfóides. Nos linfonodos subcutâneos do Tga20 ocorre uma redução mais drástica nos linfócitos T  $\alpha\beta$  CD4 e CD8, que nos linfonodos mesentéricos e no baço.

Mais recentemente, foi mostrado que o baço de camundongos Tga20 apresenta menor número de linfócitos T  $\alpha\beta$  e um aumento nos linfócitos T  $\gamma\delta$  comparados ao camundongo controle (Zabel et al, 2009), de acordo com o que encontramos. Nesse trabalho, os autores mostram ainda que camundongos Tga19, os quais também super-expressam PrP<sup>C</sup>, e camundongos resultantes do cruzamento entre camundongos Tga20 e Prnp<sup>0/0</sup> (hemizigotos para o transgene Prnp), não apresentam as alterações encontradas no baço dos Tga20 homozigotos. Através da análise de cromossomas metafásicos foi observada em camundongos Tga20, uma hibridização para o gene Prnp na região central do cromossoma 17, onde são encontrados genes importantes no desenvolvimento de células T, como a cadeia pT $\alpha$ . Devido à menor expressão do RNA mensageiro desta molécula no timo de camundongos Tga20 e ao fenótipo semelhante observado nos camundongos nocautes para a cadeia pT $\alpha$ , os autores sugerem uma inserção do transgene Prnp na referida região. Como não há hibridização no cromossoma 2 (onde se localiza o gene Prnp) em camundongos Tga20, Tga19, nem nos WT, é sugerido que tenha ocorrido uma concatamerização de algumas ou das 60 cópias do transgene Prnp no cromossoma 17 dos animais Tga20, sendo assim possível sua localização (Zabel et al, 2009). No entanto, a observação da expressão da cadeia  $\beta$  do TCR em timócitos DN dos camundongos Tga20, sugere a expressão da cadeia pT $\alpha$  nesses animais. Adicionalmente, o aumento de morte celular encontrado nas subpopulações DP e SP, indica fortemente alterações em processos não relacionados à cadeia pT $\alpha$ , incluindo seleção positiva e seleção negativa. É importante ainda ressaltar que o camundongo Tga33 analisado anteriormente em outro trabalho, e que super-expressa PrP<sup>C</sup>, também apresenta bloqueio parcial de diferenciação (Jouvin-Marche et al, 2006). Para um entendimento mais definitivo sobre esse aspecto, será

necessário um estudo genético mais detalhado sobre a localização exata da inserção do transgene, em paralelo à análise de expressão e funcionalidade da molécula pT $\alpha$  nos camundongos Tga20.

#### Envolvimento de PrP<sup>C</sup> na migração de timócitos

A segunda parte de nossos resultados diz respeito ao envolvimento da molécula PrP<sup>C</sup> na migração de timócitos. A interação desta molécula com laminina causou interesse sobre uma possível função de PrP<sup>C</sup> na migração linfocitária. Funcionalmente, a interação PrP<sup>C</sup>/laminina foi relacionada à adesão neuronal e crescimento de neuritos (Graner et al, 2002a; 2002b), além de consolidação de memória (Coitinho et al, 2006). Como já descrito na introdução dessa tese, a laminina exerce importante papel no desenvolvimento de linfócitos, sendo descrita a participação de diferentes isoformas na sobrevivência, diferenciação e migração de timócitos (Magner et al, 2000; Ocampo et al, 2008).

Além da laminina, utilizamos como estímulos migratórios a molécula de ECM fibronectina a qual não interage com PrP<sup>C</sup> (Hajj et al, 2007), e a quimiocina CXCL12, o que nos permitiu realizar uma avaliação mais ampla das respostas migratórias de camundongos expressando diferentes níveis de PrP<sup>C</sup>.

Nos camundongos Tga20 encontramos respostas migratórias distintas para os diferentes estímulos migratórios utilizados. Uma menor migração de todas as subpopulações do Tga20 frente à laminina, enquanto que frente a fibronectina apenas timócitos DP apresentaram menor migração significativa em relação à subpopulação equivalente nos camundongos controles. Por outro lado, no que concerne à migração induzida por CXCL12, observamos uma maior migração de timócitos CD8 SP, e uma tendência de aumento nas CD4 SP, em relação ao

controle. Esses dados, aliados à maior deposição das moléculas laminina, fibronectina e CXCL12 no timo do camundongo Tga20, sugerem que o resultado final da migração de timócitos neste animal resulte de um balanço entre diferentes estímulos, corroborando a hipótese que a migração de timócitos seja resultante de um sistema multivetorial de estímulos migratórios (Savino, 2007; Mendes-da-Cruz et al, 2008).

No camundongo Prnp<sup>0/0</sup> o perfil é bastante diferente, havendo de uma maneira geral uma menor resposta migratória das subpopulações de timócitos frente aos diferentes estímulos. Apesar de os timócitos desses animais não apresentarem alterações na expressão dos receptores das moléculas analisadas, deve-se considerar as modificações espaciais que podem ser sofridas por integrinas, alterando seu grau de ativação a partir de diferentes estímulos como quimiocinas (Sanz-Rodríguez et al, 2001; Kinashi, 2005) e ativação do complexo TCR (Gomez & Billadeau, 2008). Embora a diferenciação intratímica de linfócitos T nesses animais transcorra de forma aparentemente normal, os experimentos realizados *ex vivo* mostram claramente um defeito migratório nas células do camundongo Prnp<sup>0/0</sup>, que *in vivo* pode estar sendo compensado por outras moléculas.

Por fim, nossos dados indicando que a proteína prion celular exerce efeito quimiotático sobre timócitos fortalece a hipótese de sua participação na fisiologia do timo. Apesar de os dados aqui apresentados ainda serem iniciais, são bastante promissores, pois indicam claramente uma nova função de PrP<sup>C</sup> no sistema imune.

A participação de PrP<sup>C</sup> na adesão celular foi demonstrada em diferentes estudos que sugerem o envolvimento de interações homofílicas entre moléculas de PrP<sup>C</sup> (Mange et al, 2002), além de interações com outras moléculas como laminina (Graner ET AL, 2000a, 2000b) e NCAM (Sunccione et al, 2005). Quanto à migração

leucocitária, existem dados referentes aos efeitos do peptídeo PrP 106-126, similar à seqüência de aminoácidos 105-125 da proteína PrP<sup>C</sup> de camundongos e ratos, e que induz morte celular em cultivos celulares de cérebro dissociado. Esse peptídeo induz alguns eventos envolvendo ativação de células do sistema imune, particularmente a indução de respostas quimiotáticas em células dendríticas imaturas (Kaneider et al, 2003), monócitos, neutrófilos e linfócitos (Diomedea et al, 1996).

Nos estudos que revelaram a importância da interação entre PrP<sup>C</sup> e a molécula STI-1 na proteção contra morte neuronal induzida, o peptídeo PrP 106-126 mostrou-se capaz de bloquear o efeito neuroprotetor do peptídeo que mimetiza a região em STI-1 de interação com PrP<sup>C</sup> (denominado PrR). Tal bloqueio ocorre provavelmente devido à sobreposição da seqüência 106-126 no sítio de interação com STI-1 (ver Figura 1.1), impedindo assim a interação do peptídeo PrR com PrP<sup>C</sup> presente na membrana neuronal. Dessa forma, nos ensaios de migração leucocitária o peptídeo PrP 106-126 poderia estar mimetizando o papel exercido por PrP<sup>C</sup>, interagindo com ligantes presentes na superfície celular. A molécula STI-1 se encaixaria como um possível ligante. Para testar tal hipótese será necessária uma investigação sobre a expressão dessa molécula em células do sistema imune.

Por fim, outro candidato interessante seria a própria molécula PrP<sup>C</sup>, já que a seqüência 106-126 também se sobrepõe à seqüência do domínio HD, sugerido como uma região de contato entre monômeros de PrP<sup>C</sup> (Rambold et al, 2008). A molécula PrP<sup>C</sup> recombinante utilizada em nossos ensaios de quimiotaxia poderia induzir a migração de timócitos através de interações homofílicas. Tais interações poderiam ter implicações funcionais no desenvolvimento de timócitos, assim como na fisiologia de células do microambiente tímico.

## 6- CONCLUSÕES

Considerando os dados discutidos nesta tese de doutorado podemos concluir os seguintes pontos:

- ❖ PrP<sup>C</sup> é expresso constitutivamente em timócitos e células do microambiente tímico.
- ❖ Camundongos Tga20, com super-expressão de PrP<sup>C</sup>, apresentam hipoplasia tímica, com bloqueio parcial de diferenciação de timócitos, com acúmulo de células no estágio DN3.
- ❖ Timócitos dos camundongos Tga20 são mais sensíveis à apoptose quando comparados a timócitos dos animais controles (o que explicaria em parte o pequeno número de timócitos no timo dos camundongos Tga20).
- ❖ Os órgãos linfóides periféricos de camundongos com super-expressão de PrP<sup>C</sup> apresentam desequilíbrio nos números de linfócitos T expressando  $\alpha\beta$  e T  $\gamma\delta$ .
- ❖ O desequilíbrio na expressão intratímica de PrP<sup>C</sup> correlaciona-se com alterações nas respostas migratórias frente a diferentes estímulos, incluindo pelo menos as moléculas de matriz extracelular laminina e fibronectina, e a quimiocina CXCL12.
- ❖ A molécula PrP<sup>C</sup> parece apresentar efeito quimioatraente sobre timócitos.
- ❖ Tomados em conjunto, os dados aqui apresentados mostram a participação de PrP<sup>C</sup> na fisiologia do timo.



## REFERÊNCIAS

- Adolfsson J, Borge OJ, Bryder D, Theilgaard-Monch K, Astrand-Grundstrom I, Sitnicka E, Sasaki Y & Jacobsen SE. (2001). *Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. Immunity, 15*, 659-69.
- Aguzzi A, Baumann F & Bremer J. (2008). *The prion's elusive reason for being. Annu Rev Neurosci, 31*, 439-77.
- Aguzzi A & Glatzel M. (2006). *Prion infections, blood and transfusions. Nat Clin Pract Neurol, 2*, 321-9.
- Aguzzi A & Heikenwalder M. (2005). *Prions, cytokines, and chemokines: a meeting in lymphoid organs. Immunity, 22*, 145-54.
- Aguzzi A & Polymenidou M. (2004). *Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. Cell, 116*, 313-27.
- Allende ML, Dreier JL, Mandala S & Proia RL. (2004). *Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration. J Biol Chem, 279*, 15396-401.
- Allman D, Sambandam A, Kim S, Miller JP, Pagan A, Well D, Meraz A & Bhandoola A. (2003). *Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. Nat Immunol, 4*, 168-74.
- Alper T, Cramp WA, Haig DA & Clarke MC. (1967). *Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? Nature, 214*, 764-6.
- Anderson G, Hare KJ, Platt N & Jenkinson EJ. (1997). *Discrimination between maintenance- and differentiation-inducing signals during initial and intermediate stages of positive selection. Eur J Immunol, 27*, 1838-42.
- Anderson G & Jenkinson EJ. (2001). *Lymphostromal interactions in thymic development and function. Nat Rev Immunol, 1*, 31-40.
- Anderson G, Jenkinson WE, Jones T, Parnell SM, Kinsella FA, White AJ, Pongracz JE, Rossi SW & Jenkinson EJ. (2006). *Establishment and functioning of intrathymic microenvironments. Immunol Rev, 209*, 10-27.
- Anderson G, Lane PJ & Jenkinson EJ. (2007). *Generating intrathymic microenvironments to establish T-cell tolerance. Nat Rev Immunol, 7*, 954-63.
- Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, von Boehmer H, Bronson R, Dierich A, Benoist C & Mathis D. (2002). *Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. Science, 298*, 1395-401.
- Andrews NJ, Farrington CP, Ward HJ, Cousens SN, Smith PG, Molesworth AM, Knight RS, Ironside JW & Will RG. (2003). *Deaths from variant Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. Lancet, 361*, 751-2.
- Aucouturier P & Carnaud C. (2002). *The immune system and prion diseases: a relationship of complicity and blindness. J Leukoc Biol, 72*, 1075-83.
- Balciunaite G, Ceredig R, Massa S & Rolink AG. (2005). *A B220+ CD117+ CD19- hematopoietic progenitor with potent lymphoid and myeloid developmental potential. Eur J Immunol, 35*, 2019-30.

- Ballerini C, Gourdain P, Bachy V, Blanchard N, Levavasseur E, Gregoire S, Fontes P, Aucouturier P, Hivroz C & Carnaud C. (2006). *Functional implication of cellular prion protein in antigen-driven interactions between T cells and dendritic cells. J Immunol*, **176**, 7254-62.
- Barclay AN & Mayrhofer G. (1981). *Bone marrow origin of Ia-positive cells in the medulla rat thymus. J Exp Med*, **153**, 1666-71.
- Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB & Weissmann C. (1986). *Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. Cell*, **46**, 417-28.
- Bell JJ & Bhandoola A. (2008). *The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential. Nature*, **452**, 764-7.
- Bellinger-Kawahara C, Diener TO, McKinley MP, Groth DF, Smith DR & Prusiner SB. (1987). *Purified scrapie prions resist inactivation by procedures that hydrolyze, modify, or shear nucleic acids. Virology*, **160**, 271-4.
- Bendheim PE, Brown HR, Rudelli RD, Scala LJ, Goller NL, Wen GY, Kascsak RJ, Cashman NR & Bolton DC. (1992). *Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. Neurology*, **42**, 149-56.
- Benz C & Bleul CC. (2005). *A multipotent precursor in the thymus maps to the branching point of the T versus B lineage decision. J Exp Med*, **202**, 21-31.
- Benz C, Heinzl K & Bleul CC. (2004). *Homing of immature thymocytes to the subcapsular microenvironment within the thymus is not an absolute requirement for T cell development. Eur J Immunol*, **34**, 3652-63.
- Benz C, Martins VC, Radtke F & Bleul CC. (2008). *The stream of precursors that colonizes the thymus proceeds selectively through the early T lineage precursor stage of T cell development. J Exp Med*, **205**, 1187-99.
- Berlett BS & Stadtman ER. (1997). *Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J Biol Chem*, **272**, 20313-6.
- Berrih S, Savino W & Cohen S. (1985). *Extracellular matrix of the human thymus: immunofluorescence studies on frozen sections and cultured epithelial cells. J Histochem Cytochem*, **33**, 655-64.
- Bhandoola A, Cibotti R, Punt JA, Granger L, Adams AJ, Sharrow SO & Singer A. (1999). *Positive selection as a developmental progression initiated by TCR signals that fix TCR specificity prior to lineage commitment. Immunity*, **10**, 301-311.
- Bhandoola A & Sambandam A. (2006). *From stem cell to T cell: one route or many? Nat Rev Immunol*, **6**, 117-26.
- Bhandoola A, von Boehmer H, Petrie HT & Zuniga-Pflucker JC. (2007). *Commitment and developmental potential of extrathymic and intrathymic T cell precursors: plenty to choose from. Immunity*, **26**, 678-89.
- Borchelt DR, Rogers M, Stahl N, Telling G & Prusiner SB. (1993). *Release of the cellular prion protein from cultured cells after loss of its glycoinositol phospholipid anchor. Glycobiology*, **3**, 319-29.
- Brown DR. (1999). *Prion protein expression aids cellular uptake and veratridine-induced release of copper. J Neurosci Res*, **58**, 717-25.
- Brown DR. (2001). *Copper and prion disease. Brain Res Bull*, **55**, 165-73.

- Brown DR & Besinger A. (1998). *Prion protein expression and superoxide dismutase activity. Biochem J*, **334** ( Pt 2), 423-9.
- Brown DR & Sassoon J. (2002). *Copper-dependent functions for the prion protein. Mol Biotechnol*, **22**, 165-78.
- Brugnera E, Bhandoola A, Cibotti R, Yu Q, Guinter TI, Yamashita Y, Sharrow SO & Singer A. (2000). *Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells. Immunity*, **13**, 59-71.
- Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M & Weissmann C. (1993). *Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. Cell*, **73**, 1339-47.
- Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M & Weissmann C. (1992). *Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. Nature*, **356**, 577-82.
- Burthem J, Urban B, Pain A & Roberts DJ. (2001). *The normal cellular prion protein is strongly expressed by myeloid dendritic cells. Blood*, **98**, 3733-8.
- Campbell JJ, Pan J & Butcher EC. (1999). *Cutting edge: developmental switches in chemokine responses during T cell maturation. J Immunol*, **163**, 2353-7.
- Cashman NR, Loertscher R, Nalbantoglu J, Shaw I, Kascsak RJ, Bolton DC & Bendheim PE. (1990). *Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. Cell*, **61**, 185-92.
- Castilla J, Saa P, Hetz C & Soto C. (2005). *In vitro generation of infectious scrapie prions. Cell*, **121**, 195-206.
- Caughey B, Baron GS, Chesebro B & Jeffrey M. (2009). *Getting a grip on prions: oligomers, amyloids, and pathological membrane interactions. Annu Rev Biochem*, **78**, 177-204.
- Cereghetti GM, Schweiger A, Glockshuber R & Van Doorslaer S. (2001). *Electron paramagnetic resonance evidence for binding of Cu(2+) to the C-terminal domain of the murine prion protein. Biophys J*, **81**, 516-25.
- Chesebro B, Race R, Wehrly K, Nishio J, Bloom M, Lechner D, Bergstrom S, Robbins K, Mayer L, Keith JM & et al. (1985). *Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. Nature*, **315**, 331-3.
- Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR & Linden R. (2002). *Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. Embo J*, **21**, 3317-26.
- Christensen JL & Weissman IL. (2001). *Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 14541-6.
- Ciofani M & Zuniga-Pflucker JC. (2007). *The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. Annu Rev Cell Dev Biol*, **23**, 463-93.
- Coitinho AS, Freitas AR, Lopes MH, Hajj GN, Roesler R, Walz R, Rossato JI, Cammarota M, Izquierdo I, Martins VR & Brentani RR. (2006). *The interaction between prion protein and laminin modulates memory consolidation. Eur J Neurosci*, **24**, 3255-64.
- Collinge J. (2008). *Review. Lessons of kuru research: background to recent studies with some personal reflections. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **363**, 3689-96.

- Collinge J, Whitfield J, McKintosh E, Beck J, Mead S, Thomas DJ & Alpers MP. (2006). *Kuru in the 21st century--an acquired human prion disease with very long incubation periods. Lancet*, **367**, 2068-74.
- Colombo MC, Vandevondele J, Van Doorslaer S, Laio A, Guidoni L & Rothlisberger U. (2008). *Copper binding sites in the C-terminal domain of mouse prion protein: A hybrid (QM/MM) molecular dynamics study. Proteins*, **70**, 1084-98.
- Contreiras EC, Lenzi HL, Meirelles MN, Caputo LF, Calado TJ, Villa-Verde DM & Savino W. (2004). *The equine thymus microenvironment: a morphological and immunohistochemical analysis. Dev Comp Immunol*, **28**, 251-64.
- Cordeiro Y, Machado F, Juliano L, Juliano MA, Brentani RR, Foguel D & Silva JL. (2001). *DNA converts cellular prion protein into the beta-sheet conformation and inhibits prion peptide aggregation. J Biol Chem*, **276**, 49400-9.
- Cordier-Dirikoc S, Zsürger N, Cazareth J, Menard B & Chabry J. (2008). *Expression profiles of prion and doppel proteins and of their receptors in mouse splenocytes. Eur J Immunol*, **38**, 2131-41.
- Crisa L, Cirulli V, Ellisman MH, Ishii JK, Elices MJ & Salomon DR. (1996). *Cell adhesion and migration are regulated at distinct stages of thymic T cell development: the roles of fibronectin, VLA4, and VLA5. J Exp Med*, **184**, 215-28.
- Dalmau SR, Freitas CS & Savino W. (1999). *Upregulated expression of fibronectin receptors underlines the adhesive capability of thymocytes to thymic epithelial cells during the early stages of differentiation: lessons from sublethally irradiated mice. Blood*, **93**, 974-90.
- Davalos-Miszlitz AC, Worbs T, Willenzon S, Bernhardt G & Forster R. (2007). *Impaired responsiveness to T-cell receptor stimulation and defective negative selection of thymocytes in CCR7-deficient mice. Blood*, **110**, 4351-9.
- Davies P & Brown DR. (2008). *The chemistry of copper binding to PrP: is there sufficient evidence to elucidate a role for copper in protein function? Biochem J*, **410**, 237-44.
- de Almeida CJ, Chiarini LB, da Silva JP, Silva PR, Martins MA & Linden R. (2005). *The cellular prion protein modulates phagocytosis and inflammatory response. J Leukoc Biol*, **77**, 238-46.
- De Souza LR, Trajano V & Savino W. (1993). *Is there an interspecific diversity of the thymic microenvironment? Dev Immunol*, **3**, 123-35.
- Deleault NR, Harris BT, Rees JR & Supattapone S. (2007). *Formation of native prions from minimal components in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 9741-6.
- Derbinski J, Gabler J, Brors B, Tierling S, Jonnakuty S, Hergenahn M, Peltonen L, Walter J & Kyewski B. (2005). *Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. J Exp Med*, **202**, 33-45.
- Derbinski J, Schulte A, Kyewski B & Klein L. (2001). *Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. Nat Immunol*, **2**, 1032-9.
- Diomede L, Sozzani S, Luini W, Algeri M, De Gioia L, Chiesa R, Lievens PM, Bugiani O, Forloni G, Tagliavini F & Salmona M. (1996) *Activation effects of a prion protein fragment [PrP-(106-126)] on human leucocytes. Biochem J*. **320**, 563-70.
- Dodelet VC & Cashman NR. (1998). *Prion protein expression in human leukocyte differentiation. Blood*, **91**, 1556-61.
- Dudley EC, Petrie HT, Shah LM, Owen MJ & Hayday AC. (1994). *T cell receptor beta chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice. Immunity*, **1**, 83-93.

- Durig J, Giese A, Schulz-Schaeffer W, Rosenthal C, Schmucker U, Bieschke J, Duhrsen U & Kretzschmar HA. (2000). *Differential constitutive and activation-dependent expression of prion protein in human peripheral blood leucocytes*. *Br J Haematol*, **108**, 488-95.
- Ermonval M, Mouillet-Richard S, Codogno P, Kellermann O & Botti J. (2003). *Evolving views in prion glycosylation: functional and pathological implications*. *Biochimie*, **85**, 33-45.
- Fehling HJ, Krotkova A, Saint-Ruf C & von Boehmer H. (1995). *Crucial role of the pre-T-cell receptor alpha gene in development of alpha beta but not gamma delta T cells*. *Nature*, **375**, 795-8.
- Fischer M, Rulicke T, Raeber A, Sailer A, Moser M, Oesch B, Brandner S, Aguzzi A & Weissmann C. (1996). *Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie*. *Embo J*, **15**, 1255-64.
- Flechsig E & Weissmann C. (2004). *The role of PrP in health and disease*. *Curr Mol Med*, **4**, 337-53.
- Ford MJ, Burton LJ, Morris RJ & Hall SM. (2002). *Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse*. *Neuroscience*, **113**, 177-92.
- Foss DL, Donskoy E & Goldschneider I. (2001). *The importation of hematogenous precursors by the thymus is a gated phenomenon in normal adult mice*. *J Exp Med*, **193**, 365-74.
- Garner OB, Yamaguchi Y, Esko JD & Videm V. (2008). *Small changes in lymphocyte development and activation in mice through tissue-specific alteration of heparan sulphate*. *Immunology*, **125**, 420-9.
- Gauczynski S, Peyrin JM, Haik S, Leucht C, Hundt C, Rieger R, Krasemann S, Deslys JP, Dormont D, Lasmezas CI & Weiss S. (2001). *The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein*. *Embo J*, **20**, 5863-75.
- Godfrey DI, Kennedy J, Mombaerts P, Tonegawa S & Zlotnik A. (1994). *Onset of TCR-beta gene rearrangement and role of TCR-beta expression during CD3-CD4-CD8- thymocyte differentiation*. *J Immunol*, **152**, 4783-92.
- Godfrey DI, Kennedy J, Suda T & Zlotnik A. (1993). *A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression*. *J Immunol*, **150**, 4244-52.
- Gomez TS & Billadeau DD. (2008). *T cell activation and the cytoskeleton: you can't have one without the other*. *Adv Immunol*, **97**, 1-64.
- Gossens K, Naus S, Corbel SY, Lin S, Rossi FM, Kast J & Ziltener HJ. (2009). *Thymic progenitor homing and lymphocyte homeostasis are linked via S1P-controlled expression of thymic P-selectin/CCL25*. *J Exp Med*, **206**, 761-78.
- Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Forlenza OV, Cabral AL, Veiga SS, Juliano MA, Roesler R, Walz R, Minetti A, Izquierdo I, Martins VR & Brentani RR. (2000a). *Cellular prion protein binds laminin and mediates neuriteogenesis*. *Brain Res Mol Brain Res*, **76**, 85-92.
- Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Martins VR, Jay DG & Brentani RR. (2000b). *Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein*. *FEBS Lett*, **482**, 257-60.
- Gray D, Abramson J, Benoist C & Mathis D. (2007). *Proliferative arrest and rapid turnover of thymic epithelial cells expressing Aire*. *J Exp Med*, **204**, 2521-8.
- Griffith JS. (1967). *Self-replication and scrapie*. *Nature*, **215**, 1043-4.

- Hajj GN, Lopes MH, Mercadante AF, Veiga SS, da Silveira RB, Santos TG, Ribeiro KC, Juliano MA, Jacchieri SG, Zanata SM & Martins VR. (2007). *Cellular prion protein interaction with vitronectin supports axonal growth and is compensated by integrins. J Cell Sci*, **120**, 1915-26.
- Hare KJ, Pongracz J, Jenkinson EJ & Anderson G. (2003). *Modeling TCR signaling complex formation in positive selection. J Immunol*, **171**, 2825-31.
- Harris DA, Huber MT, van Dijken P, Shyng SL, Chait BT & Wang R. (1993). *Processing of a cellular prion protein: identification of N- and C-terminal cleavage sites. Biochemistry*, **32**, 1009-16.
- Hewitt PE, Llewelyn CA, Mackenzie J & Will RG. (2006). *Three reported cases of variant Creutzfeldt-Jakob disease transmission following transfusion of labile blood components. Vox Sang*, **91**, 348.
- Hogquist KA, Baldwin TA & Jameson SC. (2005). *Central tolerance: learning self-control in the thymus. Nat Rev Immunol*, **5**, 772-82.
- Hollander GA & Peterson P. (2009). *Learning to be tolerant: how T cells keep out of trouble. J Intern Med*, **265**, 541-61.
- Hornemann S, Korth C, Oesch B, Riek R, Wider G, Wuthrich K & Glockshuber R. (1997). *Recombinant full-length murine prion protein, mPrP(23-231): purification and spectroscopic characterization. FEBS Lett*, **413**, 277-81.
- Horiuchi M, Yamazaki N, Ikeda T, Ishiguro N & Shinagawa M. (1995). *A cellular form of prion protein (PrPC) exists in many non-neuronal tissues of sheep. J Gen Virol*, **76 ( Pt 10)**, 2583-7.
- Horonchik L, Tzaban S, Ben-Zaken O, Yedidia Y, Rouvinski A, Papy-Garcia D, Barritault D, Vlodaysky I, Taraboulos A. (2005) *Heparan sulfate is a cellular receptor for purified infectious prions. J Biol Chem*. **280**,17062-7.
- Hundt C, Peyrin JM, Haik S, Gauczynski S, Leucht C, Rieger R, Riley ML, Deslys JP, Dormont D, Lasmezas CI & Weiss S. (2001). *Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor. Embo J*, **20**, 5876-86.
- Hutter G, Heppner FL & Aguzzi A. (2003). *No superoxide dismutase activity of cellular prion protein in vivo. Biol Chem*, **384**, 1279-85.
- Ingram RJ, Isaacs JD, Kaur G, Lowther DE, Reynolds CJ, Boyton RJ, Collinge J, Jackson GS & Altmann DM. (2009). *A role of cellular prion protein in programming T-cell cytokine responses in disease. Faseb J*, **23**, 1672-84.
- Isaacs JD, Jackson GS & Altmann DM. (2006). *The role of the cellular prion protein in the immune system. Clin Exp Immunol*, **146**, 1-8.
- Iwao M, Fukada S, Harada T, Tsujikawa K, Yagita H, Hiramane C, Miyagoe Y, Takeda S & Yamamoto H. (2000). *Interaction of merosin (laminin 2) with very late activation antigen-6 is necessary for the survival of CD4+ CD8+ immature thymocytes. Immunology*, **99**, 481-8.
- Jackson GS & Collinge J. (2001). *The molecular pathology of CJD: old and new variants. Mol Pathol*, **54**, 393-9.
- Jackson GS, Murray I, Hosszu LL, Gibbs N, Waltho JP, Clarke AR & Collinge J. (2001). *Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 8531-5.
- Jenkinson WE, Jenkinson EJ & Anderson G. (2003). *Differential requirement for mesenchyme in the proliferation and maturation of thymic epithelial progenitors. J Exp Med*, **198**, 325-32.

- Jones S, Batchelor M, Bhelt D, Clarke AR, Collinge J & Jackson GS. (2005). *Recombinant prion protein does not possess SOD-1 activity*. *Biochem J*, **392**, 309-12.
- Jouvin-Marche E, Attuil-Audenis V, Aude-Garcia C, Rachidi W, Zabel M, Podevin-Dimster V, Siret C, Huber C, Martinic M, Riondel J, Villiers CL, Favier A, Naquet P, Cesbron JY & Marche PN. (2006). *Overexpression of cellular prion protein induces an antioxidant environment altering T cell development in the thymus*. *J Immunol*, **176**, 3490-7.
- Kaneider NC, Kaser A, Dunzendorfer S, Tilg H, Wiedermann CJ. (2003) *Sphingosine kinase-dependent migration of immature dendritic cells in response to neurotoxic prion protein fragment*. *J Virol*. **77**, 5535-9.
- Karsunky H, Inlay MA, Serwold T, Bhattacharya D & Weissman IL. (2008). *Flk2+ common lymphoid progenitors possess equivalent differentiation potential for the B and T lineages*. *Blood*, **111**, 5562-70.
- Kinashi T. (2005). *Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes*. *Nat Rev Immunol*, **5**, 546-59.
- Klein L, Roettinger B & Kyewski B. (2001). *Sampling of complementing self-antigen pools by thymic stromal cells maximizes the scope of central T cell tolerance*. *Eur J Immunol*, **31**, 2476-86.
- Knaus KJ, Morillas M, Swietnicki W, Malone M, Surewicz WK & Yee VC. (2001). *Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization*. *Nat Struct Biol*, **8**, 770-4.
- Kondo M, Weissman IL & Akashi K. (1997). *Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow*. *Cell*, **91**, 661-72.
- Koyasu S, Clayton LK, Lerner A, Heiken H, Parkes A & Reinherz EL. (1997). *Pre-TCR signaling components trigger transcriptional activation of a rearranged TCR alpha gene locus and silencing of the pre-TCR alpha locus: implications for intrathymic differentiation*. *Int Immunol*, **9**, 1475-80.
- Kubosaki A, Yusa S, Nasu Y, Nishimura T, Nakamura Y, Saeki K, Matsumoto Y, Itohara S & Onodera T. (2001). *Distribution of cellular isoform of prion protein in T lymphocytes and bone marrow, analyzed by wild-type and prion protein gene-deficient mice*. *Biochem Biophys Res Commun*, **282**, 103-7.
- Kurobe H, Liu C, Ueno T, Saito F, Ohigashi I, Seach N, Arakaki R, Hayashi Y, Kitagawa T, Lipp M, Boyd RL & Takahama Y. (2006). *CCR7-dependent cortex-to-medulla migration of positively selected thymocytes is essential for establishing central tolerance*. *Immunity*, **24**, 165-77.
- Kutlesa S, Siler U, Speiser A, Wessels JT, Virtanen I, Rousselle P, Sorokin LM, Muller CA & Klein G. (2002). *Developmentally regulated interactions of human thymocytes with different laminin isoforms*. *Immunology*, **105**, 407-18.
- Ladogana A, Puopolo M, Croes EA, Budka H, Jarius C, Collins S, Klug GM, Sutcliffe T, Giulivi A, Alperovitch A, Delasnerie-Laupretre N, Brandel JP, Poser S, Kretzschmar H, Rietveld I, Mitrova E, Cuesta Jde P, Martinez-Martin P, Glatzel M, Aguzzi A, Knight R, Ward H, Pocchiari M, van Duijn CM, Will RG & Zerr I. (2005a). *Mortality from Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders in Europe, Australia, and Canada*. *Neurology*, **64**, 1586-91.
- Ladogana A, Puopolo M, Poggi A, Almonti S, Mellina V, Equestre M & Pocchiari M. (2005b). *High incidence of genetic human transmissible spongiform encephalopathies in Italy*. *Neurology*, **64**, 1592-7.
- Laine J, Marc ME, Sy MS & Axelrad H. (2001). *Cellular and subcellular morphological localization of normal prion protein in rodent cerebellum*. *Eur J Neurosci*, **14**, 47-56.

- Lannes-Vieira J, Dardenne M & Savino W. (1991). *Extracellular matrix components of the mouse thymus microenvironment: ontogenetic studies and modulation by glucocorticoid hormones*. *J Histochem Cytochem*, **39**, 1539-46.
- Laufer TM, DeKoning J, Markowitz JS, Lo D & Glimcher LH. (1996). *Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex*. *Nature*, **383**, 81-5.
- Lemaire-Vieille C, Schulze T, Podevin-Dimster V, Follet J, Bailly Y, Blanquet-Grossard F, Decavel JP, Heinen E & Cesbron JY. (2000). *Epithelial and endothelial expression of the green fluorescent protein reporter gene under the control of bovine prion protein (PrP) gene regulatory sequences in transgenic mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5422-7.
- Levelt CN, Carsetti R & Eichmann K. (1993). *Regulation of thymocyte development through CD3. II. Expression of T cell receptor beta CD3 epsilon and maturation to the CD4+8+ stage are highly correlated in individual thymocytes*. *J Exp Med*, **178**, 1867-75.
- Levelt CN, Wang B, Ehrfeld A, Terhorst C & Eichmann K. (1995). *Regulation of T cell receptor (TCR)-beta locus allelic exclusion and initiation of TCR-alpha locus rearrangement in immature thymocytes by signaling through the CD3 complex*. *Eur J Immunol*, **25**, 1257-61.
- Li R, Liu D, Zanusso G, Liu T, Fayen JD, Huang JH, Petersen RB, Gambetti P & Sy MS. (2001). *The expression and potential function of cellular prion protein in human lymphocytes*. *Cell Immunol*, **207**, 49-58.
- Lima FR, Arantes CP, Muras AG, Nomizo R, Brentani RR & Martins VR. (2007). *Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation*. *J Neurochem*, **103**, 2164-76.
- Lind EF, Prockop SE, Porritt HE & Petrie HT. (2001). *Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development*. *J Exp Med*, **194**, 127-34.
- Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I & Brentani RR. (2008). *Physiology of the prion protein*. *Physiol Rev*, **88**, 673-728.
- Liston A, Lesage S, Wilson J, Peltonen L & Goodnow CC. (2003). *Aire regulates negative selection of organ-specific T cells*. *Nat Immunol*, **4**, 350-4.
- Liu T, Li R, Pan T, Liu D, Petersen RB, Wong BS, Gambetti P & Sy MS. (2002). *Intercellular transfer of the cellular prion protein*. *J Biol Chem*, **277**, 47671-8.
- Liu T, Li R, Wong BS, Liu D, Pan T, Petersen RB, Gambetti P & Sy MS. (2001). *Normal cellular prion protein is preferentially expressed on subpopulations of murine hemopoietic cells*. *J Immunol*, **166**, 3733-42.
- Livak F, Tourigny M, Schatz DG & Petrie HT. (1999). *Characterization of TCR gene rearrangements during adult murine T cell development*. *J Immunol*, **162**, 2575-80.
- Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S, Mackenzie J & Will RG. (2004). *Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion*. *Lancet*, **363**, 417-21.
- Lopes MH, Hajj GN, Muras AG, Mancini GL, Castro RM, Ribeiro KC, Brentani RR, Linden R & Martins VR. (2005). *Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways*. *J Neurosci*, **25**, 11330-9.
- Mabbott NA, Brown KL, Manson J & Bruce ME. (1997). *T-lymphocyte activation and the cellular form of the prion protein*. *Immunology*, **92**, 161-5.



- Magner WJ, Chang AC, Owens J, Hong MJ, Brooks A & Coligan JE. (2000). *Aberrant development of thymocytes in mice lacking laminin-2*. *Dev Immunol*, **7**, 179-93.
- Malissen M, Gillet A, Rocha B, Trucy J, Vivier E, Boyer C, Kontgen F, Brun N, Mazza G, Spanopoulou E & et al. (1993). *T cell development in mice lacking the CD3-zeta/eta gene*. *Embo J*, **12**, 4347-55.
- Malone F, Carper K, Reyes J & Li W. (2009). *gammadeltaT cells are involved in liver transplant tolerance*. *Transplant Proc*, **41**, 233-5.
- Mange A, Milhavel O, Umlauf D, Harris D & Lehmann S. (2002). *PrP-dependent cell adhesion in N2a neuroblastoma cells*. *FEBS Lett*, **514**, 159-62.
- Martin CH, Aifantis I, Scimone ML, von Andrian UH, Reizis B, von Boehmer H & Gounari F. (2003). *Efficient thymic immigration of B220+ lymphoid-restricted bone marrow cells with T precursor potential*. *Nat Immunol*, **4**, 866-73.
- Martinez del Hoyo G, Lopez-Bravo M, Metharom P, Ardavin C & Aucouturier P. (2006). *Prion protein expression by mouse dendritic cells is restricted to the nonplasmacytoid subsets and correlates with the maturation state*. *J Immunol*, **177**, 6137-42.
- Martins VR, Graner E, Garcia-Abreu J, de Souza SJ, Mercadante AF, Veiga SS, Zanata SM, Neto VM & Brentani RR. (1997). *Complementary hydropathy identifies a cellular prion protein receptor*. *Nat Med*, **3**, 1376-82.
- Martins VR, Linden R, Prado MA, Walz R, Sakamoto AC, Izquierdo I & Brentani RR. (2002). *Cellular prion protein: on the road for functions*. *FEBS Lett*, **512**, 25-8.
- Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL & Cyster JG. (2004). *Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1*. *Nature*, **427**, 355-60.
- Mattei V, Barenco MG, Tasciotti V, Garofalo T, Longo A, Boller K, Lower J, Misasi R, Montrasio F & Sorice M. (2009). *Paracrine diffusion of PrP(C) and propagation of prion infectivity by plasma membrane-derived microvesicles*. *PLoS One*, **4**, e5057.
- Mattei V, Garofalo T, Misasi R, Circella A, Manganelli V, Lucania G, Pavan A & Sorice M. (2004). *Prion protein is a component of the multimolecular signaling complex involved in T cell activation*. *FEBS Lett*, **560**, 14-8.
- Mazzoni IE, Ledebur HC, Jr., Paramithiotis E & Cashman N. (2005). *Lymphoid signal transduction mechanisms linked to cellular prion protein*. *Biochem Cell Biol*, **83**, 644-53.
- Mendes-da-Cruz DA, Smaniotto S, Keller AC, Dardenne M & Savino W. (2008). *Multivectorial abnormal cell migration in the NOD mouse thymus*. *J Immunol*, **180**, 4639-47.
- Meyer RK, Lustig A, Oesch B, Fatzer R, Zurbriggen A & Vandevelde M. (2000). *A monomer-dimer equilibrium of a cellular prion protein (PrPC) not observed with recombinant PrP*. *J Biol Chem*, **275**, 38081-7.
- Meyer RK, McKinley MP, Bowman KA, Braunfeld MB, Barry RA & Prusiner SB. (1986). *Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 2310-4.
- Mick VE, Starr TK, McCaughtry TM, McNeil LK & Hogquist KA. (2004). *The regulated expression of a diverse set of genes during thymocyte positive selection in vivo*. *J Immunol*, **173**, 5434-44.
- Milićević NM & Milićević Z. (2004) *Thymus cell-cell interactions*. *Int Rev Cytol*. **235**, 1-52.

- Misslitz A, Pabst O, Hintzen G, Ohl L, Kremmer E, Petrie HT & Forster R. (2004). *Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7*. *J Exp Med*, **200**, 481-91.
- Mojcik CF, Salomon DR, Chang AC & Shevach EM. (1995). *Differential expression of integrins on human thymocyte subpopulations*. *Blood*, **86**, 4206-17.
- Mombaerts P, Clarke AR, Rudnicki MA, Iacomini J, Itohara S, Lafaille JJ, Wang L, Ichikawa Y, Jaenisch R, Hooper ML & et al. (1992). *Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages*. *Nature*, **360**, 225-31.
- Mori K, Itoi M, Tsukamoto N, Kubo H & Amagai T. (2007). *The perivascular space as a path of hematopoietic progenitor cells and mature T cells between the blood circulation and the thymic parenchyma*. *Int Immunol*, **19**, 745-53.
- Morris RJ, Parkyn CJ & Jen A. (2006). *Traffic of prion protein between different compartments on the neuronal surface, and the propagation of prion disease*. *FEBS Lett*, **580**, 5565-71.
- Morrison SJ, Hemmati HD, Wandycz AM & Weissman IL. (1995). *The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 10302-6.
- Nakayama T, Kasrowicz DJ, Yamashita M, Schubert LA, Gillard G, Kimura M, Didierlaurent A, Koseki H & Ziegler SF. (2002). *The generation of mature, single-positive thymocytes in vivo is dysregulated by CD69 blockade or overexpression*. *J. Immunol*, **168**, 87-94.
- Naquet P, Naspetti M & Boyd R. (1999). *Development, organization and function of the thymic medulla in normal, immunodeficient or autoimmune mice*. *Semin Immunol*, **11**, 47-55.
- Nedjic J, Aichinger M & Klein L. (2008). *Autophagy and T cell education in the thymus: eat yourself to know yourself*. *Cell Cycle*, **7**, 3625-8.
- Nikles D, Vana K, Gauczynski S, Knetsch H, Ludewigs H & Weiss S. (2008). *Subcellular localization of prion proteins and the 37 kDa/67 kDa laminin receptor fused to fluorescent proteins*. *Biochim Biophys Acta*, **1782**, 335-40.
- Nitta T, Murata S, Ueno T, Tanaka K & Takahama Y. (2008). *Thymic microenvironments for T-cell repertoire formation*. *Adv Immunol*, **99**, 59-94.
- Norment AM, Bogatzki LY, Gantner BN & Bevan MJ. (2000). *Murine CCR9, a chemokine receptor for thymus-expressed chemokine that is up-regulated following pre-TCR signaling*. *J Immunol*, **164**, 639-48.
- Nuvolone M, Aguzzi A & Heikenwalder M. (2009). *Cells and prions: A license to replicate*. *FEBS Lett*.
- Ocampo JS, de Brito JM, Correa-de-Santana E, Borojevic R, Villa-Verde DM & Savino W. (2008). *Laminin-211 controls thymocyte--thymic epithelial cell interactions*. *Cell Immunol*, **254**, 1-9.
- Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE & et al. (1985). *A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein*. *Cell*, **40**, 735-46.
- Paar C, Wurm S, Pfarr W, Sonnleitner A & Wechselberger C. (2007). *Prion protein resides in membrane microclusters of the immunological synapse during lymphocyte activation*. *Eur J Cell Biol*, **86**, 253-64.
- Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE & et al. (1993). *Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10962-6.

- Pardoll DM, Fowlkes BJ, Lew AM, Maloy WL, Weston MA, Bluestone JA, Schwartz RH, Coligan JE & Kruisbeek AM. (1988). *Thymus-dependent and thymus-independent developmental pathways for peripheral T cell receptor-gamma delta-bearing lymphocytes*. *J Immunol*, **140**, 4091-6.
- Parizek P, Roeckl C, Weber J, Flechsig E, Aguzzi A & Raeber AJ. (2001). *Similar turnover and shedding of the cellular prion protein in primary lymphoid and neuronal cells*. *J Biol Chem*, **276**, 44627-32.
- Petrie HT, Tourigny M, Burtrum DB & Livak F. (2000). *Precursor thymocyte proliferation and differentiation are controlled by signals unrelated to the pre-TCR*. *J Immunol*. **165**, 3094-8.
- Petrie HT & Zuniga-Pflucker JC. (2007). *Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus*. *Annu Rev Immunol*, **25**, 649-79.
- Plotkin J, Prockop SE, Lepique A & Petrie HT. (2003). *Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus*. *J Immunol*, **171**, 4521-7.
- Pocchiari M, Poleggi A, Principe S, Graziano S & Cardone F. (2009). *Genomic and post-genomic analyses of human prion diseases*. *Genome Med*, **1**, 63.
- Politopoulou G, Seebach JD, Schmutz M, Schwarz HP & Aguzzi A. (2000). *Age-related expression of the cellular prion protein in human peripheral blood leukocytes*. *Haematologica*, **85**, 580-7.
- Porritt HE, Rumpf LL, Tabrizifard S, Schmitt TM, Zuniga-Pflucker JC & Petrie HT. (2004). *Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages*. *Immunity*, **20**, 735-45.
- Porto-Carreiro I, Fevrier B, Paquet S, Vilette D & Raposo G. (2005). *Prions and exosomes: from PrPc trafficking to PrPsc propagation*. *Blood Cells Mol Dis*, **35**, 143-8.
- Priola SA, Caughey B, Wehrly K & Chesebro B. (1995). *A 60-kDa prion protein (PrP) with properties of both the normal and scrapie-associated forms of PrP*. *J Biol Chem*, **270**, 3299-305.
- Priola SA & Vorberg I. (2006). *Molecular aspects of disease pathogenesis in the transmissible spongiform encephalopathies*. *Mol Biotechnol*, **33**, 71-88.
- Prusiner SB. (1982). *Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie*. *Science*, **216**, 136-44.
- Rachidi W, Vilette D, Guiraud P, Arlotto M, Riondel J, Laude H, Lehmann S & Favier A. (2003). *Expression of prion protein increases cellular copper binding and antioxidant enzyme activities but not copper delivery*. *J Biol Chem*, **278**, 9064-72.
- Rambold AS, Muller V, Ron U, Ben-Tal N, Winklhofer KF & Tatzelt J. (2008). *Stress-protective signalling of prion protein is corrupted by scrapie prions*. *Embo J*, **27**, 1974-84.
- Rezzani R, Bonomini F & Rodella LF. (2008). *Histochemical and molecular overview of the thymus as site for T-cells development*. *Prog Histochem Cytochem*, **43**, 73-120.
- Riek R, Hornemann S, Wider G, Glockshuber R & Wuthrich K. (1997). *NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231)*. *FEBS Lett*, **413**, 282-8.
- Rongyan Z, Xianglong L, Lanhui L, Xiangyun L & Fujun F. (2008). *Evolution and differentiation of the prion protein gene (PRNP) among species*. *J Hered*, **99**, 647-52.
- Rossi FM, Corbel SY, Merzaban JS, Carlow DA, Gossens K, Duenas J, So L, Yi L & Ziltener HJ. (2005). *Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1*. *Nat Immunol*, **6**, 626-34.

- Rowbotham NJ, Hager-Theodorides AL, Furmanski AL, Crompton T. (2007). *A novel role for Hedgehog in T-cell receptor signaling: implications for development and immunity. Cell Cycle*, **6**, 2138-42.
- Sakudo A, Hamaishi M, Hosokawa-Kanai T, Tuchiya K, Nishimura T, Saeki K, Matsumoto Y, Ueda S & Onodera T. (2003). *Absence of superoxide dismutase activity in a soluble cellular isoform of prion protein produced by baculovirus expression system. Biochem Biophys Res Commun*, **307**, 678-83.
- Salomon DR, Mojciak CF, Chang AC, Wadsworth S, Adams DH, Coligan JE & Shevach EM. (1994). *Constitutive activation of integrin alpha 4 beta 1 defines a unique stage of human thymocyte development. J Exp Med*, **179**, 1573-84.
- Santuccione A, Sytnyk V, Leshchyns'ka I & Schachner M. (2005). *Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. J Cell Biol*, **169**, 341-54.
- Sanz-Rodriguez F, Hidalgo A & Teixido J. (2001). *Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. Blood*, **97**, 346-51.
- Savino W. (2007). *Neuroendocrine control of T cell development in mammals: role of growth hormone in modulating thymocyte migration. Exp Physiol*, **92**, 813-7.
- Savino W, Ayres Martins S, Neves-dos-Santos S, Smaniotto S, Ocampo JS, Mendes-da-Cruz DA, Terra-Granado E, Kusmenok O & Villa-Verde DM. (2003). *Thymocyte migration: an affair of multiple cellular interactions? Braz J Med Biol Res*, **36**, 1015-25.
- Savino W, Carnaud C, Luan JJ, Bach JF & Dardenne M. (1993). *Characterization of the extracellular matrix-containing giant perivascular spaces in the NOD mouse thymus. Diabetes*, **42**, 134-40.
- Savino W & Dardenne M. (1995). *Immune-neuroendocrine interactions. Immunol Today*, **16**, 318-22.
- Savino W & Dardenne M. (2000). *Neuroendocrine control of thymus physiology. Endocr Rev*, **21**, 412-43.
- Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Silva JS, Dardenne M & Cotta-de-Almeida V. (2002). *Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? Trends Immunol*, **23**, 305-13.
- Savino W, Mendes-Da-Cruz DA, Smaniotto S, Silva-Monteiro E & Villa-Verde DM. (2004). *Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. J Leukoc Biol*, **75**, 951-61.
- Scheufler C, Brinker A, Bourenkov G, Pegoraro S, Moroder L, Bartunik H, Hartl FU & Moarefi I. (2000). *Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. Cell*, **101**, 199-210.
- Schmitt-Ulms G, Legname G, Baldwin MA, Ball HL, Bradon N, Bosque PJ, Crossin KL, Edelman GM, DeArmond SJ, Cohen FE & Prusiner SB. (2001). *Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. J Mol Biol*, **314**, 1209-25.
- Schwarz BA, Sambandam A, Maillard I, Harman BC, Love PE & Bhandoola A. (2007). *Selective thymus settling regulated by cytokine and chemokine receptors. J Immunol*, **178**, 2008-17.
- Scimone ML, Aifantis I, Apostolou I, von Boehmer H & von Andrian UH. (2006). *A multistep adhesion cascade for lymphoid progenitor cell homing to the thymus. Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 7006-11.

- Scollay R, Wilson A, D'Amico A, Kelly K, Egerton M, Pearse M, Wu L & Shortman K. (1988). *Developmental status and reconstitution potential of subpopulations of murine thymocytes. Immunol Rev*, **104**, 81-120.
- Shah DK, Hager-Theodorides AL, Outram SV, Ross SE, Varas A & Crompton T. (2004). *Reduced thymocyte development in sonic hedgehog knockout embryos. J Immunol*, **172**, 2296-306.
- Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F, Stall AM & et al. (1992). *RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. Cell*, **68**, 855-67.
- Shores EW, Sharrow SO, Uppenkamp I & Singer A. (1990). *T cell receptor-negative thymocytes from SCID mice can be induced to enter the CD4/CD8 differentiation pathway. Eur J Immunol*, **20**, 69-77.
- Shortman K, Egerton M, Spangrude GJ & Scollay R. (1990). *The generation and fate of thymocytes. Semin Immunol*, **2**, 3-12.
- Singer A, Adoro S & Park JH. (2008). *Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. Nat Rev Immunol*, **8**, 788-801.
- Sinkora M, Sinkorova J, Cimburek Z & Holtmeier W. (2007). *Two groups of porcine TCRgammadelta-thymocytes behave and diverge differently. J Immunol*, **178**, 711-9.
- Spraker TR, Balachandran A, Zhuang D & O'Rourke KI. (2004). *Variable patterns of distribution of PrP(CWD) in the obex and cranial lymphoid tissues of Rocky Mountain elk (Cervus elaphus nelsoni) with subclinical chronic wasting disease. Vet Rec*, **155**, 295-302.
- Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K & Prusiner SB. (1987). *Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. Cell*, **51**, 229-40.
- Stockel J, Safar J, Wallace AC, Cohen FE & Prusiner SB. (1998). *Prion protein selectively binds copper(II) ions. Biochemistry*, **37**, 7185-93.
- Stuermer CA, Langhorst MF, Wiechers MF, Legler DF, Von Hanwehr SH, Guse AH & Plattner H. (2004). *PrPc capping in T cells promotes its association with the lipid raft proteins reggie-1 and reggie-2 and leads to signal transduction. Faseb J*, **18**, 1731-3.
- Suda T & Zlotnik A. (1993). *Origin, differentiation, and repertoire selection of CD3+CD4-CD8-thymocytes bearing either alpha beta or gamma delta T cell receptors. J Immunol*, **150**, 447-55.
- Suniara RK, Jenkinson EJ & Owen JJ. (2000). *An essential role for thymic mesenchyme in early T cell development. J Exp Med*, **191**, 1051-6.
- Sunyach C, Jen A, Deng J, Fitzgerald KT, Frobert Y, Grassi J, McCaffrey MW & Morris R. (2003). *The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. Embo J*, **22**, 3591-601.
- Suzuki G, Nakata Y, Dan Y, Uzawa A, Nakagawa K, Saito T, Mita K & Shirasawa T. (1998). *Loss of SDF-1 receptor expression during positive selection in the thymus. Int Immunol*, **10**, 1049-56.
- Svensson M, Marsal J, Uronen-Hansson H, Cheng M, Jenkinson W, Cilio C, Jacobsen SE, Sitnicka E, Anderson G & Agace WW. (2008). *Involvement of CCR9 at multiple stages of adult T lymphopoiesis. J Leukoc Biol*, **83**, 156-64.
- Takahama Y. (2006). *Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. Nat Rev Immunol*, **6**, 127-35.

- Taraboulos A, Jendroska K, Serban D, Yang SL, DeArmond SJ & Prusiner SB. (1992). *Regional mapping of prion proteins in brain. Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 7620-4.
- Taylor DR & Hooper NM. (2006). *The prion protein and lipid rafts. Mol Membr Biol*, **23**, 89-99.
- Terra-Granado E, Berbert LR, de Meis J, Nomizo R, Martins VR, Savino W & Silva-Barbosa SD. (2007). *Is there a role for cellular prion protein in intrathymic T cell differentiation and migration? Neuroimmunomodulation*, **14**, 213-9.
- Tsutsui S, Hahn JN, Johnson TA, Ali Z & Jirik FR. (2008). *Absence of the cellular prion protein exacerbates and prolongs neuroinflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis. Am J Pathol*, **173**, 1029-41.
- Ueno T, Saito F, Gray DH, Kuse S, Hieshima K, Nakano H, Kakiuchi T, Lipp M, Boyd RL & Takahama Y. (2004). *CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. J Exp Med*, **200**, 493-505.
- Utsumi K, Sawada M, Narumiya S, Nagamine J, Sakata T, Iwagami S, Kita Y, Teraoka H, Hirano H, Ogata M & et al. (1991). *Adhesion of immature thymocytes to thymic stromal cells through fibronectin molecules and its significance for the induction of thymocyte differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 5685-9.
- van Ewijk W. (1988). *Cell surface topography of thymic microenvironments. Lab Invest*, **59**, 579-90.
- Varela-Nallar L, Gonzalez A & Inestrosa NC. (2006). *Role of copper in prion diseases: deleterious or beneficial? Curr Pharm Des*, **12**, 2587-95.
- Vassallo N & Herms J. (2003). *Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. J Neurochem*, **86**, 538-44.
- Viegas P, Chaverot N, Enslin H, Perriere N, Couraud PO & Cazaubon S. (2006). *Junctional expression of the prion protein PrPC by brain endothelial cells: a role in trans-endothelial migration of human monocytes. J Cell Sci*, **119**, 4634-43.
- Villa-Verde DM, Mello-Coelho V, Lagrota-Candido JM, Chammas R & Savino W. (1995). *The thymic nurse cell complex: an in vitro model for extracellular matrix-mediated intrathymic T cell migration. Braz J Med Biol Res*, **28**, 907-12.
- Vivinus-Nebot M, Tichioni M, Mary F, Hofman P, Quaranta V, Rousselle P & Bernard A. (1999). *Laminin 5 in the human thymus: control of T cell proliferation via alpha6beta4 integrins. J Cell Biol*, **144**, 563-74.
- Volkel D, Zimmermann K, Zerr I, Bodemer M, Lindner T, Turecek PL, Poser S & Schwarz HP. (2001). *Immunochemical determination of cellular prion protein in plasma from healthy subjects and patients with sporadic CJD or other neurologic diseases. Transfusion*, **41**, 441-8.
- Wack A, Coles M, Norton T, Hostert A & Kioussis D. (2000). *Early onset of CD8 transgene expression inhibits the transition from DN3 to DP thymocytes. J Immunol*, **165**, 1236-42.
- Wada H, Masuda K, Satoh R, Kakugawa K, Ikawa T, Katsura Y & Kawamoto H. (2008). *Adult T-cell progenitors retain myeloid potential. Nature*, **452**, 768-72.
- Waggoner DJ, Drisaldi B, Bartnikas TB, Casareno RL, Prohaska JR, Gitlin JD & Harris DA. (2000). *Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level. J Biol Chem*, **275**, 7455-8.
- Ward HJ, Mackenzie JM, Llewelyn CA, Knight RS, Hewitt PE, Connor N, Molesworth A & Will RG. (2009). *Variant Creutzfeldt-Jakob disease and exposure to fractionated plasma products. Vox Sang*.

- Warner RG, Hundt C, Weiss S & Turnbull JE. (2002). *Identification of the heparan sulfate binding sites in the cellular prion protein. J Biol Chem*, **277**, 18421-30.
- Warwicker J. (2000). *Modeling a prion protein dimer: predictions for fibril formation. Biochem Biophys Res Commun*, **278**, 646-52.
- Werlen G, Hausmann B, Naeher D & Palmer E. (2003). *Signaling life and death in the thymus: timing is everything. Science*, **299**, 1859-63.
- Werneck CC, Cruz MS, Silva LC, Villa-Verde DM, Savino W & Mourao PA. (2000). *Is there a glycosaminoglycan-related heterogeneity of the thymic epithelium? J Cell Physiol*, **185**, 68-79.
- White AR, Collins SJ, Maher F, Jobling MF, Stewart LR, Thyer JM, Beyreuther K, Masters CL & Cappai R. (1999). *Prion protein-deficient neurons reveal lower glutathione reductase activity and increased susceptibility to hydrogen peroxide toxicity. Am J Pathol*, **155**, 1723-30.
- Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A & Smith PG. (1996). *A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. Lancet*, **347**, 921-5.
- Wopfner F, Weidenhofer G, Schneider R, von Brunn A, Gilch S, Schwarz TF, Werner T & Schatzl HM. (1999). *Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. J Mol Biol*, **289**, 1163-78.
- Wu L & Shortman K. (2005). *Heterogeneity of thymic dendritic cells. Semin Immunol*, **17**, 304-12.
- Wurch A, Biro J, Falk I, Mossmann H & Eichmann K. (1999). *Reduced generation but efficient TCR beta-chain selection of CD4+8+ double-positive thymocytes in mice with compromised CD3 complex signaling. J Immunol*, **162**, 2741-7.
- Yin X, Chtanova T, Ladi E & Robey EA. (2006). *Thymocyte motility: mutants, movies and migration patterns. Curr Opin Immunol*, **18**, 191-7.
- Yu XZ, Martin PJ & Anasetti C. (2003). *CD28 signal enhances apoptosis of CD8 T cells after strong TCR ligation. J Immunol*, **170**, 3002-6.
- Zabel M, Greenwood C, Thackray AM, Pulford B, Rens W & Bujdosó R. (2009). *Perturbation of T-cell development by insertional mutation of a PrP transgene. Immunology*, **127**, 226-36.
- Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, Hajj GN, Chiarini LB, Nomizo R, Freitas AR, Cabral AL, Lee KS, Juliano MA, de Oliveira E, Jachieri SG, Burlingame A, Huang L, Linden R, Brentani RR & Martins VR. (2002). *Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. Embo J*, **21**, 3307-16.
- Zhang CC, Steele AD, Lindquist S & Lodish HF. (2006). *Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal. Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 2184-9.
- Zúñiga-Pflücker JC. (2004). *T-cell development made simple. Nat Rev Immunol*. **4**, 67-72.

ANEXO – Publicação sob a forma de artigo científico de parte dos dados presentes nesta tese.

## Is There a Role for Cellular Prion Protein in Intrathymic T Cell Differentiation and Migration?

Eugênia Terra-Granado<sup>a,b</sup> Luiz Ricardo Berbert<sup>a</sup> Juliana de Meis<sup>a</sup>  
Regina Nomizo<sup>d</sup> Vilma Regina Martins<sup>d</sup> Wilson Savino<sup>a</sup>  
Suse Dayse Silva-Barbosa<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, <sup>b</sup>Biophysics and Physiology PhD Program, Federal University of Rio de Janeiro and <sup>c</sup>Center for Bone Marrow Transplantation, National Cancer Institute, Rio de Janeiro, and <sup>d</sup>Ludwig Institute for Cancer Research, Hospital Alemão Oswaldo Cruz, São Paulo, Brazil

### Key Words

Thymocyte differentiation · Cellular prion protein · Thymic hypoplasia · Laminin · Cell migration

### Abstract

The cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) is expressed in the nervous and immune systems. Functionally, PrP<sup>C</sup> has been suggested to participate in neuron survival, neuritogenesis and T lymphocyte activation. Moreover, PrP<sup>C</sup> interaction with laminin influences neuronal adhesion and neurite extension. Nevertheless, so far the physiological role of PrP<sup>C</sup> has not been completely elucidated, particularly in the immune system. The aim of the study was to evaluate the possible participation of PrP<sup>C</sup> in intrathymic T cell development. We evaluated T cell differentiation markers in thymocytes and peripheral lymphocytes, as well as thymocyte death in PrP<sup>C</sup>-null or PrP<sup>C</sup>-overexpressing (Tga20) mice, compared to wild-type controls. In these same animals, we ascertained laminin-driven thymocyte migration. Compared to controls, only marginal differences were found in PrP<sup>C</sup>-null animals. However, Tga20 mice exhibited a severe thymic hypoplasia, with 10–20% lymphocytes compared to wild-type counterparts. In particular, the frequency of CD4+CD8+ cells was largely

reduced, and this was accompanied by a dramatic increase in the frequency of CD4–CD8– thymocytes, which could be as high as 60–65% of the whole-cell suspensions. Moreover, Tga20 mice exhibited an increase in thymocyte death, comprising the CD4+CD8+, as well as CD4+ and CD8+ single-positive cells. Additionally, laminin-driven migration was largely impaired in Tga20 mice, in which we also found a significant decrease in total T lymphocytes in the spleen and lymph nodes. Our results show that PrP<sup>C</sup> overexpression alters intrathymic T cell development, a defect that likely has a negative impact in the formation of the T cell peripheral pool.

Copyright © 2007 S. Karger AG, Basel

### Introduction

The cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein concentrated in lipid raft microdomains, expressed on a wide range of tissues, including tissues in the nervous and immune systems [1]. Although it is well defined that the pathogenesis of prion diseases occurs through the direct interaction between the constitutively expressed isoform PrP<sup>C</sup> and the scrapie

### KARGER

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail [karger@karger.ch](mailto:karger@karger.ch)  
[www.karger.com](http://www.karger.com)

© 2007 S. Karger AG, Basel  
1021-7401/07/0144-0213\$23.50/0

Accessible online at:  
[www.karger.com/nim](http://www.karger.com/nim)

Wilson Savino  
Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation  
Ave. Brasil 4365, Manguinhos  
21045-900 Rio de Janeiro (Brazil)  
Tel./Fax +55 21 3865 8101, E-Mail [savino@fiocruz.br](mailto:savino@fiocruz.br)



protease-resistant isoform prion (PrP<sup>Sc</sup>), with conversion of PrP<sup>C</sup> to PrP<sup>Sc</sup> [2], the precise physiological role of PrP<sup>C</sup> remains unclear.

The ability of PrP<sup>C</sup> to bind a variety of molecules has been used as a tool to understand PrP<sup>C</sup> functions. The PrP<sup>C</sup> binding to laminin was suggested to be involved in neuronal adhesion, as well as neurite extension and maintenance. In addition, other adhesion molecules like laminin receptor, heparan sulfate and neural cell adhesion molecule have been described as PrP<sup>C</sup>-binding proteins. Moreover, PrP<sup>C</sup> interactions with Bcl-2 family members and stress-inducible protein-1 have been suggested to protect neurons from apoptosis. Accordingly, PrP<sup>C</sup> capacity to bind and chelate copper seems important in neuronal resistance to oxidative stress [for reviews, see 3, 4].

Although the nervous system is the main site for PrP<sup>C</sup> expression, this molecule is also widely expressed in the immune system [1]. Importantly, PrP<sup>C</sup> expression is increased upon T lymphocyte activation [5], PrP<sup>C</sup> engagement induces the recruitment of signaling cascade molecules [6], and PrP<sup>C</sup> is involved in MHC-peptide-driven T lymphocyte-dendritic cell interactions [7]. Additionally, it seems to modulate phagocytosis, likely being involved in inflammatory responses [8].

In situations of PrP<sup>C</sup> overexpression, deviations of physiological functions were observed, including delivery of proapoptotic messages when PrP<sup>C</sup>-mediated signaling exceeds a certain threshold [9, 10], as well as PrP<sup>C</sup> overexpression in brain endothelial cells in a rat model of cerebral ischemia [11].

In the thymus, PrP<sup>C</sup> is expressed by thymocytes [12], thymic epithelial cells (TEC) and dendritic cells [1]. More recently, it has been reported that PrP<sup>C</sup> transgenic mice exhibit an intense thymic hypoplasia with depletion in the CD4+CD8+ thymocyte subpopulation, paralleled by accumulation of CD44-CD25+CD4-CD8- cells, possibly arrested in the DN3 stage of differentiation, differentially impacting on  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cell lineages [10].

The thymus is a primary lymphoid organ in which bone marrow-derived cell precursors undergo T lymphocyte differentiation. Such a process involves sequential expression of various proteins and rearrangements of T cell receptor (TCR) genes, as the developing thymocytes migrate in the thymic lobules. This migration allows thymocytes to encounter cortical and medullary nonlymphoid microenvironments through distinct cell-cell and cell-matrix interactions, which interfere with the differentiation process. Finally, positively selected mature T lymphocytes leave the thymus, migrating to the T cell-

dependent areas of secondary lymphoid organs [for reviews, see 13, 14]. Although the understating of this migration process is improving [15, 16], many gaps are still present, particularly if we consider that thymocyte migration is a result of multivectorial stimuli [17], whose complete ligand-receptor pair chart has not been completed so far.

In any case, considering that (1) PrP<sup>C</sup> binds laminin [18, 19], which is a relevant extracellular matrix in thymus physiology [15], (2) PrP<sup>C</sup> is involved in peripheral T cell activation [6, 20] and (3) it is constitutively expressed in the thymus [1], it appeared plausible that PrP<sup>C</sup> plays a role in thymus physiology. Herein, we evaluated thymocyte differentiation and migration parameters in animals expressing distinct levels of PrP<sup>C</sup>. Moreover, changes seen in the thymus of PrP<sup>C</sup>-overexpressing Tga20 mice were correlated with the diminished amounts of T cells seen in peripheral lymphoid organs.

## Materials and Methods

### Animals

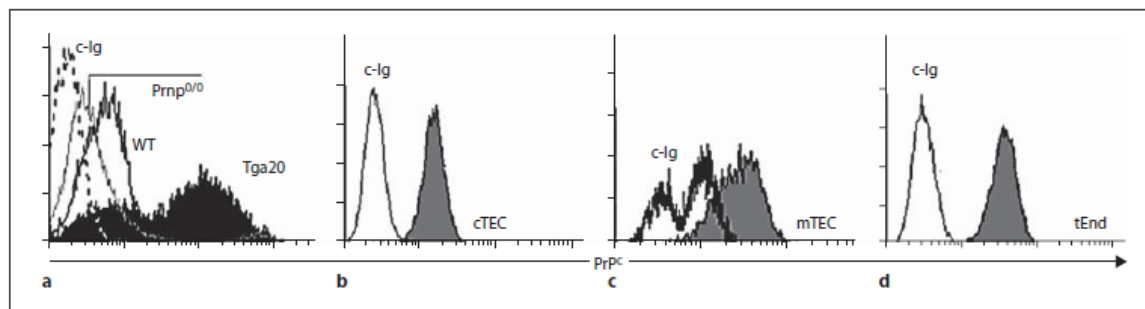
Wild-type control mice from inbred C57BL/6J  $\times$  Sv129 mixed lineage, PrP<sup>C</sup>-null (Prnp<sup>0/0</sup>) [21] mice from an inbred colony and PrP<sup>C</sup> transgenic mice overexpressing PrP<sup>C</sup> (Tga20), kindly provided by Dr. Charles Weissmann (Scripps Florida, USA) [22], were used in these experiments. Prnp<sup>0/0</sup> mice and Tga20 animals have the same genetic background of the wild-type mice. Most experiments were done using 4- to 6-week-old females. Some experiments were performed in newborn as well as middle-aged (36–40 weeks) females, whereas in others we used young adult males. In all cases, at least 5 animals were evaluated per group. Mice were handled according to procedures approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Oswaldo Cruz Foundation (Rio de Janeiro, Brazil).

### Thymic Microenvironmental Cell Lines

The expression of PrP<sup>C</sup> was also evaluated in the TEC lines named 1.4C18, 1C6 and 2BH4, representatives of cortical, medullary and mixed phenotypes, respectively [23–25]. Additionally, we searched for PrP<sup>C</sup> in the thymic endothelial cell line tEnd.1 [26]. All these cell lines have a C57BL/6 mouse genetic background. They were grown in RPMI 1640, supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 U/ml streptomycin (Gibco, UK).

### Antibodies

For flow cytometry analyses, the following fluorochrome-labeled monoclonal antibodies (mAb) were used: anti-CD3-FITC, anti-TCR $\beta$ -PE, anti-CD4-PE and anti-CD4-PerCP, anti-CD8-APC and anti-CD8-PerCP, anti-CD44-PE, anti-CD25-FITC and anti-CD25-APC, anti-CD90-FITC, as well as isotype-matched negative controls for each fluorochrome applied as specific antibodies (Becton Dickinson, San Diego, Calif., USA). We also used the mouse mAb anti-PrP<sup>C</sup> SAF-32 (SPI-bio), the corresponding Ig



**Fig. 1.** Thymocytes and thymic microenvironmental cells constitutively express cellular prion protein. **a** PrP<sup>C</sup> expression in total thymocytes from wild-type (WT), PrP-null (Prnp<sup>0/0</sup>) and PrP<sup>C</sup> transgenic (Tga20) mice. For comparison, the negative control using an unrelated antibody (c-Ig) is also shown (dotted line).

**b, c** PrP<sup>C</sup> expression in cortical (cTEC) and medullary (mTEC) thymic epithelial cell line. **d** PrP<sup>C</sup> labeling in a thymic endothelial cell line (tEnd). PrP<sup>C</sup> expression is shown in gray, whereas unrelated Ig (c-Ig) is represented by the open histograms.

negative control (Sigma Co., St. Louis, Mo., USA) and the secondary antibody Alexa-488-labeled goat anti-mouse (GAM-488) Ig serum (Amersham Biosciences, Piscataway, N.J., USA).

#### Flow Cytometry

Cells were isolated from thymus and subcutaneous lymph nodes, after organ maceration. The thymic epithelial and endothelial cell lines were detached from the culture flasks by using 10 mM EDTA. Once counted in a Neubauer chamber they were submitted to cytofluorometry for PrP<sup>C</sup> detection.

Fluorochrome-labeled mAb staining was performed by incubating cells with murine normal serum for 15 min and subsequently with primary antibodies for 20 min. PrP<sup>C</sup> staining was performed as follows: cells were first incubated with PBS/BSA 0.5%/sodium azide 0.05% during 15 min, and then subjected to the anti-PrP<sup>C</sup> antibody for 20 min. After washing in PBS, PrP<sup>C</sup> labeling was revealed with GAM-488 during 20 min. Cell suspensions were washed again in PBS, and fixed in 1% formaldehyde.

Annexin V staining was carried out using the appropriate buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>), in which cells were incubated with annexin V-FITC (Caltag/Invitrogen, USA) during 20 min at room temperature. Flow cytometry analyses were carried out on a FACSCalibur<sup>®</sup> device (Becton Dickinson) equipped with CellQuest software.

#### Cell Migration Assay

Thymocyte migratory activity was assessed in a transwell system, as previously described [27]. Briefly, 5- $\mu$ m pore size transwell plates (Corning Costar, Cambridge, Mass., USA) were coated with 10 mg/ml of murine laminin (Sigma) for 1 h at 37°C, and later blocked with BSA 10  $\mu$ g/ml. Thymocytes from pools of at least 3 animals ( $2.5 \times 10^6$  cells in 100  $\mu$ l of BSA 1%/RPMI) were added in the upper chambers. After 4 h of incubation at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere, laminin-driven migration was defined by subtracting the numbers of cells that migrated to the lower chambers containing only the migration medium (BSA 1%/RPMI).

#### Statistical Analysis

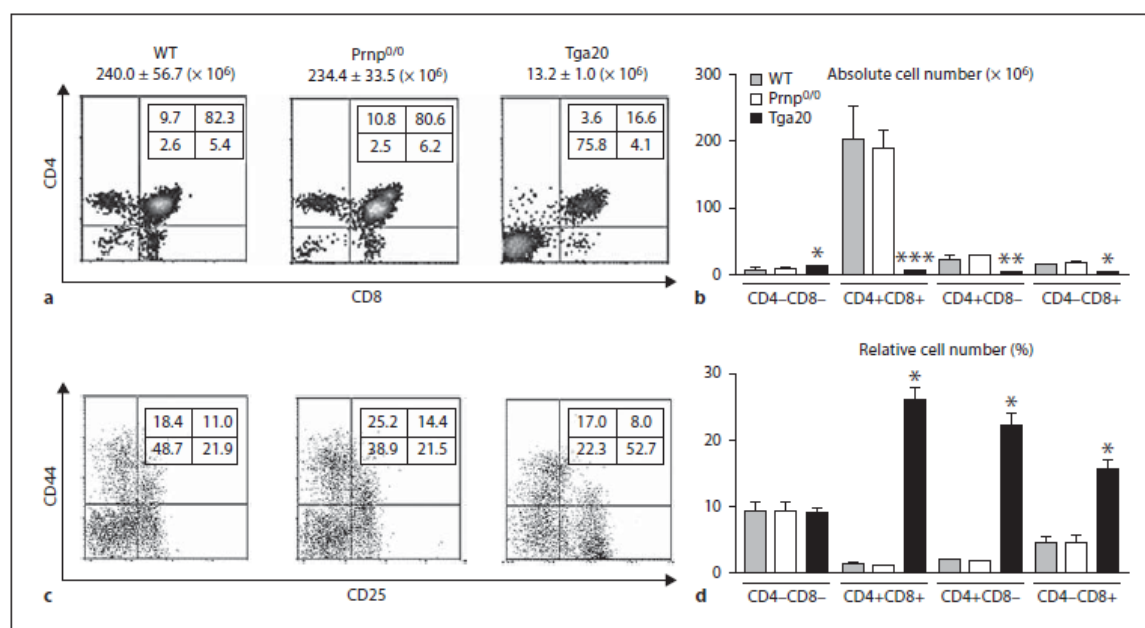
Unless stated otherwise, data were shown as means  $\pm$  standard error. Results were statistically analyzed by one-way analysis of variance and subsequently by the Tukey post hoc test. Differences were considered statistically significant when the p values were <0.05.

## Results

### PrP<sup>C</sup> Expression in Thymocytes and in Thymic Microenvironmental Cells

In normal mice, constitutive PrP<sup>C</sup> expression was seen in thymocytes, comprising all CD4/CD8-defined subpopulations (fig. 1a). Interestingly, large densities of PrP<sup>C</sup> were seen in all TEC lines analyzed, as well as in thymic endothelial cells (fig. 1b). As expected, we found increased PrP<sup>C</sup> expression in thymocytes from Tga20 mice, compared to age-/sex-matched wild-type animals, whereas no significant PrP<sup>C</sup> labeling was seen in thymocytes from Prnp<sup>0/0</sup> mice. Most importantly, overexpression of PrP<sup>C</sup> correlated with a dramatic defect in intrathymic T cell development, comprising a significantly lower number of thymocytes in the organ, and accumulation of CD4-/CD8-cells, in parallel with very low numbers of the CD4+/CD8+ subset. Interestingly, this profile was already seen in newborn animals and remained in middle-aged mice (data not shown).

By contrast, the relative numbers of CD4/CD8-defined cell subsets in the thymus of Prnp<sup>0/0</sup> mice were similar to those seen in the wild-type animals, although a



**Fig. 2.** Hypoplasia and partial arrest of thymocyte development in PrP<sup>C</sup> transgenic mice. **a** Cellularity and CD4/CD8-defined thymocyte subsets in wild-type (WT), PrP<sup>C</sup>-deficient (Prnp<sup>0/0</sup>) and PrP<sup>C</sup> transgenic (Tga20) mice. Total cell numbers, shown in the upper part of the flow cytometry profiles of each group, clearly demonstrated the severe decrease in thymic lymphocytes from Tga20, compared to WT or Prnp<sup>0/0</sup> mice ( $p < 0.001$ ). Moreover, the cytofluorometric profiles show that PrP<sup>C</sup> transgenic animals exhibit a large reduction of CD4+CD8+ cells, with a relative enhancement in CD4-CD8- thymocytes. Relative cell numbers for each CD4/CD8-defined thymocyte subset are shown inside the flow cytometry profile of each group. **b** In terms of absolute cells

numbers, not only double-positive, but also CD4 as well as CD8 single-positive cells were largely reduced. **c** Differential expression of CD25 and CD44 cell markers within the CD4/CD8 double-negative compartment. In the Tga20 group, there is a clear reduction of the relative cell numbers of DN3 (CD4-CD25+ and CD44-CD25-, respectively). **d** Part of the reduced thymocyte numbers seen in Tga20 mice is due to a significantly increased apoptosis (revealed by annexin V labeling), observed in CD4/CD8 double-positive and single-positive cells. Data are represented as means  $\pm$  standard error of at least 6 animals. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  compared to WT mice.

slight decrease in the total thymocyte numbers was consistently seen in the absence of PrP<sup>C</sup>.

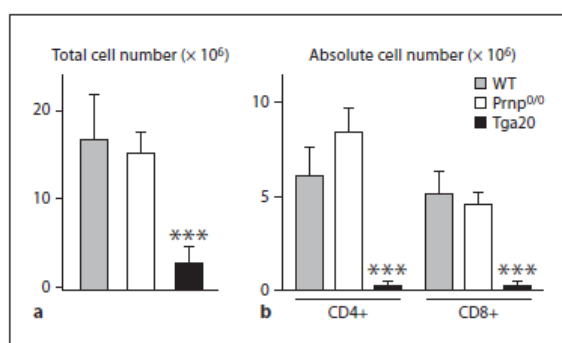
#### *Partial Arrest of Thymocyte Differentiation in Mice Overexpressing PrP<sup>C</sup>: Relationship with Cell Death*

Considering the high relative numbers of CD4-/CD8- in the thymus of Tga20 mice, we first evaluated whether these cells actually belonged to the T cell lineages. Using anti-CD90 as a pan-T cell marker, we could see that CD90 staining was similar in thymocytes from wild-type, Prnp<sup>0/0</sup> and Tga20 animals (data not shown).

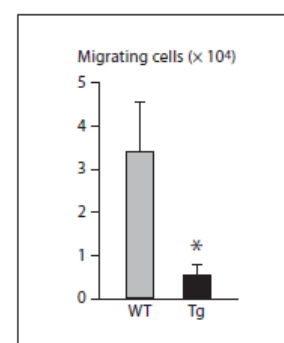
We further analyzed the abnormal thymocyte development seen in Tga20 mice by studying the sequential stages of differentiation in the CD4-/CD8- compart-

ment, as ascertained by CD44 and CD25 labeling. Such an evaluation clearly revealed that cells accumulate in the DN3 (CD25+CD44-) stage of differentiation, with significant decrease in the absolute numbers of downstream differentiation subsets, namely DN4 (CD25-CD44-), CD4+CD8+, as well as mature thymocytes, and CD4 and CD8 single-positive cells (fig. 2a-c).

Accumulation of DN3 thymocytes in PrP<sup>C</sup> transgenic mice could be due to a deviation favoring the expansion of discrete CD4-CD8- thymocyte lineages, bearing the CD3/TCR $\alpha\beta$  or the CD3/TCR $\gamma\delta$  phenotype. Overall, we found an increase in the percentages of CD3+TCR $\gamma\delta$ +CD4-CD8- cells in the thymuses from Tga20 animals. Nevertheless, the absolute numbers of these



**Fig. 3.** Decrease in T cell numbers in subcutaneous lymph nodes from PrP<sup>C</sup> transgenic mice. Total (a) and absolute (b) cell numbers of TCRβ+CD4+ and TCRβ+CD8+ lymphocytes in subcutaneous lymph nodes. Tga20 animals exhibit a highly significant decrease in T cells, compared to wild-type (WT) controls or PrP<sup>C</sup>-deficient (Prnp<sup>0/0</sup>) mice. Note that data are represented as means ± standard error in each mouse strain (n = 5). \*\*\* p < 0.001.



**Fig. 4.** Impaired laminin-driven cell migration in thymocytes from PrP<sup>C</sup> transgenic mice. Thymocyte migration induced by laminin was largely impaired in PrP<sup>C</sup> transgenic mice (Tg) compared to wild-type controls (WT). The numbers of laminin-driven migrating thymocytes were defined by subtracting the numbers of cells that migrated in the presence of the migration medium (BSA 1%/RPMI) alone. The figure represents the average of 3 independent experiments, each performed with a pool of 3 animals. \* p < 0.05.

cells did not change, when compared to the wild-type or Prnp<sup>0/0</sup> counterparts (data not shown). These findings argue against a preferential expansion of the TCRγδ lineage, but rather point to a defect in the differentiation of CD3/TCRαβ cells.

One reason for such a defect could be an enhancement of cell death. We evaluated the levels of annexin V in freshly isolated thymocytes. The percentages of annexin V-positive cells were actually increased in Tga20 thymocytes, compared to wild-type controls. Such an increase was seen in immature CD4+CD8+ as well as mature CD4 and CD8 single-positive subsets (fig. 2d). This finding indicates that thymocytes from Tga20 mice are much more sensitive to in vivo proapoptotic signals. This is further supported by the fact that the relative numbers of apoptotic cells, after treatment with hydrocortisone, were higher in Tga20 mice than in controls (data not shown).

#### *Decreased Numbers of Peripheral T Cells in PrP<sup>C</sup> Transgenic Mice*

Given the altered thymocyte differentiation seen in Tga20 mice, with very low numbers of thymocytes, increased cell death and accumulation of very immature cell subsets, we investigated if these animals also exhibited abnormal numbers of T cells in their peripheral lymphoid organs. In fact, we found a significant decrease in

the relative and absolute numbers of both TCRαβ+CD4+ and TCRαβ+CD8+ T lymphocytes, as ascertained in subcutaneous lymph nodes (fig. 3). Interestingly, such a defect was again specific to the PrP<sup>C</sup> overexpression condition, since Prnp<sup>0/0</sup> mice did not exhibit significant alterations in lymph nodes when compared to their wild-type counterparts (fig. 3). Of note, we observed an increase in TCRγδ T lymphocytes in spleen and mesenteric lymph nodes (data not shown).

#### *Abnormal Laminin-Driven Thymocyte Migration in PrP<sup>C</sup> Transgenic Mice*

Considering the low numbers of T cells seen in peripheral compartments of PrP<sup>C</sup>-Tg mice, together with the fact that PrP<sup>C</sup> is a laminin-binding protein and that laminin is involved in thymocyte migration [3, 15, 27], it seemed plausible to raise the hypothesis that laminin-driven migration could also be altered in Tga20 mice. Ex vivo experiments in transwell chambers revealed that the migratory response of Tga20 thymocytes to laminin was absent or largely impaired, compared to the well-known haptotactic response seen with thymocytes from wild-type controls (fig. 4), revealing that, in addition to abnormal differentiation, thymocyte migration is altered in conditions of PrP<sup>C</sup> overexpression.

## Discussion

The precise role of PrP<sup>C</sup> in the immune system is to be determined. Yet, the fact that PrP<sup>C</sup> is constitutively expressed in primary and secondary lymphoid organs [1, 7–10] leads to the hypothesis of a relevant physiological role of this protein. Herein, we confirmed that PrP<sup>C</sup> is expressed by the majority of thymocytes, comprising all CD4/CD8-defined subsets. Interestingly, PrP<sup>C</sup> is also expressed by thymic microenvironmental cells. We showed that TEC lines representing cortical and medullary epithelial cells spontaneously express large amounts of PrP<sup>C</sup>, and so does a thymic endothelial cell line. Interestingly, thymic dendritic cells also express PrP<sup>C</sup> [29]. Taken together, these data indicate that PrP<sup>C</sup> is expressed, not only by developing thymocytes, but also by key microenvironmental elements, responsible for positive and negative selection of the T cell repertoire, as well as transmigration across blood vessel walls. This is in keeping with the role proposed for PrP<sup>C</sup> in transendothelial monocyte migration [28], which is likely linked to the recently reported binding of PrP<sup>C</sup> to E-selectin [30].

We demonstrated herein that overexpression of PrP<sup>C</sup> results in a severe disturbance in the thymus, with likely consequences for the generation and/or maintenance of the peripheral T cell pool. This concept was raised from studies performed in mice with distinct levels of PrP<sup>C</sup> expression. Compared to wild-type age-matched controls, lack of PrP<sup>C</sup> generated a discrete reduction in the total thymocyte numbers, whereas a severe decrease in thymus cellularity was seen in PrP<sup>C</sup> transgenic mice. In this respect, our data confirm the findings recently reported by Jouvin-Marche et al. [9].

The thymic hypoplasia seen in Tga20 mice was mainly due to a severe decrease in the numbers of CD4+CD8+ thymocytes, with simultaneous accumulation of cells in the CD25+CD44<sup>-</sup> DN3 stage of thymocyte differentiation, when the primary event of  $\beta$ -selection of developing thymocytes occurs. This is in keeping with the findings showing that PrP<sup>C</sup> influences the signaling efficiency of the TCR complex [5, 20, 31].

One might argue that the accumulation of double-negative cells could be partially due to increase in non-T cell lineage(s). However, this is not the case, since these cells were labeled by the pan-T cell marker CD90.

Several mechanisms may be involved in the thymic hypoplasia seen in Tga20 mouse thymus. Herein, we investigated whether thymocytes from these animals were more sensitive to apoptosis. This was actually the case, as we found an increase in thymocyte death, in the CD4/

CD8 double-positive as well as single-positive subpopulations. Such increase could be explained by a more sensitized state to apoptosis, as it was demonstrated for the PrP<sup>C</sup>-overexpressing HEK293 human kidney cell line, in which activation of caspase-3 has been seen [11]. Nevertheless, data from our group show that PrP<sup>C</sup> exerts an antiapoptotic role in neurons [32], suggesting that the involvement of PrP<sup>C</sup> in induction versus protection from programmed cell death may vary according to the tissue, or the cell type in a given tissue. In this respect, it is conceivable that the interaction of PrP<sup>C</sup> with a given extracellular matrix component may define which signal (pro- or antiapoptotic) will be triggered. This issue is presently being investigated.

Another relevant aspect possibly linked to the thymic hypoplasia seen in Tga20 mice is related to peripheral T cell pool. Compared to age-matched controls, we found a decrease in both CD4+ and CD8+ T lymphocyte relative numbers in subcutaneous lymph nodes of Tga20 animals. This may be due to a defect in the homing of recent thymic emigrants to these lymph nodes. In this respect, we found a dramatic impairment in the laminin-induced migration of Tga20-derived thymocytes. Since laminin is known to be involved in thymocyte migration [16], it is likely that, in addition to the higher sensitivity to death signals, thymocytes from transgenic mice exhibit defects related to cell migration, thus raising the general concept that overexpression of PrP<sup>C</sup> generates a multifaceted disturbance in the thymus. Whether or not other thymocyte migration-related molecules are modulated in transgenic animals is presently under investigation.

In any case, at least one of the consequences of such multifaceted intrathymic disturbance is the reduced numbers of T cells seen in the peripheral lymphoid organs of these animals. Experiments are now in progress to evaluate the ability of Tga20 peripheral T lymphocytes to mount an immune response. In this respect, the data discussed above indicate that PrP<sup>C</sup> should be placed among those molecules that contribute to the shaping of the T cell repertoire as well as the population dynamics of T lymphocytes.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from Fiocruz, FAPERJ, FAPESP, CNPq and Capes (Brazil).

## References

- ▶1 Ford MJ, Burton LJ, Morris RJ, Hall SM: Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. *Neuroscience* 2002;113:177–192.
- ▶2 Baskakov IV: The reconstitution of mammalian prion infectivity de novo. *FEBS J* 2007;274:191–195.
- ▶3 Martins VR, Linden R, Prado MA, Walz R, Sakamoto AC, Izquierdo I, Brentani RR: Cellular prion protein: on the road for functions. *FEBS Lett* 2002;512:25.
- ▶4 Caughey B, Baron GS: Prions and their partners in crime. *Nature* 443:803–810.
- ▶5 Mabbott NA, Brown KL, Manson J, Bruce ME: T-lymphocyte activation and the cellular form of the prion protein. *Immunology* 1997;92:161–165.
- ▶6 Stuermer CA, Langhorst MF, Wiechers MF, Legler DF, von Hanwehr SH, Guse AH, Plattner H: PrP<sup>C</sup> capping in T cells promotes its association with the lipid raft proteins reggie-1 and reggie-2 and leads to signal transduction. *FASEB J* 2004;18:1731–1743.
- ▶7 Ballerini C, Gourdain P, Bachy V, Blanchard N, Levavasseur E, Gregoire S, Fontes P, Aucouturier P, HIVroz C, Carnaud C: Functional implication of cellular prion protein in antigen-driven interactions between T cells and dendritic cells. *J Immunol* 2006;176:7254–7262.
- ▶8 de Almeida CJ, Chiarini LB, da Silva JP, E Silva PM, Martins MA, Linden R: The cellular prion protein modulates phagocytosis and inflammatory response. *J Leukoc Biol* 2005;77:238–246.
- ▶9 Jouvin-Marche E, Attuil-Audenis V, Aude-Garcia C, Rachidi W, Zabel M, Podevin-Dimster V, Siret C, Huber C, Martinic M, Riondel J, Villiers CL, Favier A, Naquet P, Cesbron JY, Marche PN: Overexpression of cellular prion protein induces an antioxidant environment altering T cell development in the thymus. *J Immunol* 2006;176:3490–3497.
- ▶10 Paitel E, Alves da Costa C, Vilette D, Grassi J, Checler F: Overexpression of PrP<sup>C</sup> triggers caspase-3 activation: potentiation by proteasome inhibitors and blockade by anti-PrP antibodies. *J Neurochem* 2002;83:1208–1214.
- ▶11 Solforosi L, Criado JR, McGavern DB, Wirz S, Sanchez-Alavez M, Sugama S, DeGiorgio LA, Volpe BT, Wiseman E, Abalos G, Masliah E, Gilden D, Oldstone MB, Conti B, Williamson RA: Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo. *Science* 2004;303:1514–1516.
- ▶12 Kubosaki A, Yusa S, Nasu Y, Nishimura T, Nakamura Y, Saeki K, Matsumoto Y, Itohara S, Onodera T: Distribution of cellular isoform of prion protein in T lymphocytes and bone marrow, analyzed by wild-type and prion protein gene-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282:103–107.
- ▶13 Shyu WC, Lin SZ, Chiang MF, Ding DC, Li KW, Chen SF, Yang HI, Li H: Overexpression of PrP<sup>C</sup> by adenovirus-mediated gene targeting reduces ischemic injury in a stroke rat model. *J Neurosci* 2005;25:8967–8977.
- ▶14 Ladi E, Yin X, Chtanova T, Robey EA: Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection. *Nat Immunol* 2006;7:338–343.
- ▶15 Savino W, Mendes-Da-Cruz DA, Smaniotta S, Silva-Monteiro E, Villa-Verde DM: Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. *J Leukoc Biol* 2004;75:951–961.
- ▶16 Petrie HT: Cell migration and the control of post-natal T-cell lymphopoiesis in the thymus. *Nat Rev Immunol* 2003;3:859–866.
- ▶17 Savino W: Neuroendocrine control of T cell development: role of growth hormone in modulating thymocyte migration. *Exp Physiol* 2007;92:813–817.
- ▶18 Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Forlenza OV, Cabral ABL, Veiga SS, Juliano MA, Roesler R, Walz R, Minetti A, Izquierdo I, Martins VR, Brentani RR: Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Mol Brain Res* 2000;76:85–92.
- ▶19 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* 2000;482:257–260.
- ▶20 Mattei V, Garofalo T, Misasi R, Circella A, Manganelli V, Lucania G, Pavan A, Sorice M: Prion protein is a component of the multimolecular signaling complex involved in T cell activation. *FEBS Lett* 2004;560:14–18.
- ▶21 Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C: Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 1992;356:577–582.
- ▶22 Fischer M, Rulicke T, Raeber A, Sailer A, Moser M, Oesch B, Brandner S, Aguzzi A, Weissmann C: Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J* 1996;15:1255–1264.
- ▶23 Mizuochi T, Kasai M, Kokuho T, Kakiuchi T, Hirokawa K: Medullary but not cortical thymic epithelial cells present soluble antigens to helper T cells. *J Exp Med* 1992;175:1601–1605.
- ▶24 Werneck CC, Cruz MS, Silva LC, Villa-Verde DM, Savino W, Mourao PA: Is there a glycosaminoglycan-related heterogeneity of the thymic epithelium? *J Cell Physiol* 2000;185:68–79.
- ▶25 Amarante-Mendes JG, Chammass R, Abrahamsohn P, Patel PC, Potworowski EF, Macedo MS: Cloning of a thymic stromal cell capable of protecting thymocytes from apoptosis. *Cell Immunol* 1995;161:173–180.
- ▶26 Bussolino F, De Rossi M, Sica A, Colotta F, Wang JM, Bocchietto E, Padura IM, Bosia A, Dejana E, Mantovani A: Murine endotheloma cell lines transformed by polyoma middle T oncogene as target for and producers of cytokines. *J Immunol* 1991;147:2122–2129.
- ▶27 Smaniotta S, Mello-Coelho V, Villa-Verde DMS, Pléau JM, Postel-Vinay MC, Dardenne M, Savino W: Growth hormone modulates thymocyte development in vivo through a combined action of laminin and CXCL12. *Endocrinology* 2005;146:3005–3017.
- ▶28 Viegas P, Chaverot N, Enslin H, Perriere N, Couraud PO, Cazaubon S: Junctional expression of the prion protein PrP<sup>C</sup> by brain endothelial cells: a role in trans-endothelial migration of human monocytes. *J Cell Sci* 2006;119:4634–4643.
- ▶29 Martínez del Hoyo G, López-Bravo M, Metharom P, Ardavin C, Aucouturier P: Prion protein expression by mouse dendritic cells is restricted to the nonplasmacytoid subsets and correlates with the maturation state. *J Immunol* 2006;177:6137–6142.
- ▶30 Li C, Wong P, Pan T, Xiao F, Yin S, Chang B, Kang SC, Ironside J, Sy MS: Normal cellular prion protein is a ligand of selectins: binding requires Le<sup>x</sup> but is inhibited by sLe<sup>x</sup>. *Biochem J* 2007;406:333–341.
- ▶31 Bainbridge J, Walker KB: The normal cellular form of prion protein modulates T cell responses. *Immunol Lett* 2005;96:147–150.
- ▶32 Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R: Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J* 2002;21:3317–3326.

# 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](#)