

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FUNCIONAL DA
PROTEÍNA PRION CELULAR COM AS MUTAÇÕES V180I,
T183A E E200K DENTRO OU PRÓXIMAS AO SÍTIO DE
INTERAÇÃO À LAMININA**

ZANITH DA SILVA PRADO COOK

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Vilma Regina Martins

São Paulo

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Cook, Zanith da Silva Prado

Determinação da atividade funcional da proteína prion celular com as mutações V180I, T183A e E200K dentro ou próximas ao sítio de interação à laminina / Zanith da Silva Prado Cook -- São Paulo, 2007.

83p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Vilma Regina Martins

Descritores: 1. PRIONS/patogenecidade. 2. LAMININA. 3. MUTAÇÃO.

“...scientific work must not be considered from the point of view of the direct usefulness of it. It must be done for itself, for the beauty of science, and then there is always the chance that a scientific discovery may become (...) a benefit for humanity.”

Marie Curie (1867 - 1934), primeira cientista a ganhar duas vezes o Prêmio Nobel, a única a ganhar em duas áreas diferentes.

Aos meus pais, pelos valores transmitidos, pela educação que me possibilitou chegar até aqui, pelo amor, carinho e incentivo para seguir meus sonhos e por tornar possível sua concretização.

Ao meu companheiro Alexandre pelo amor, carinho e por estar ao meu lado, sempre.

Eu amo vocês!

Agradecimentos

A **Dra. Vilma Regina Martins**, pela oportunidade de trabalhar no seu grupo e possibilitar meu crescimento profissional.

Ao **Dr. Luiz Fernando L. Reis**, pelo exemplo de trabalho sério e criterioso na condução desta pós-graduação e pela disposição em ajudar sempre que solicitado.

A **Marilene** e **Gláucia**, pela excencial contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de Biologia Celular e Molecular – **Flávio, Tiago, Camila, Cínthia, Michele, Cleiton, Pamela, Evania** e **Eliane** – pela ajuda e por colocar uma pitada de diversão no dia a dia do trabalho.

Aos colegas dos demais laboratórios, **Enrique, Tati, Aline, Lara, Laura, Zé, João, Pat Possik, Pat Sávio** (agora na “Cidade Maravilhosa”...) pelos empréstimos, pela ajuda e pelos ótimos momentos de descontração.

A **Ana Paula Lepique**, um exemplo de talento, generosidade e humildade, por toda a ajuda.

A **Regina Nomizo**, pela valiosa ajuda nos experimentos de citometria de fluxo.

A todos os **funcionários e colegas do Instituto Ludwig**, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À amiga **Carina Victória**, que tem papel crucial na minha vida pessoal e profissional, ao me apresentar a pessoa com quem pretendo passar resto da minha vida e o Instituto onde desenvolvi este trabalho. Obrigada pelo

apoio nos momentos difíceis, por compartilhar os momentos alegres e por ceder computador onde escrevo estas linhas.

Ao **Rodrigo Louro**, *for the fun times* e por me agüentar na sua casa até nos dias ruins.

À **Gaia**, mais do que prima, minha amiga e confidente desde o berço, que sempre está lá quando preciso.

A **Cati** e **Ju**, amigas para a vida.

À minha família, por todo carinho, incentivo e apoio, em especial aos meus avós, **Zana** e **Roberto Prado**, e minha tia-avó **Regina**, pelo exemplo de vida.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** e ao **Howard Hughes Medical Institute**, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Cook, ZSP. **Determinação da atividade funcional da proteína prion celular com as mutações V180I, T183A e E200K dentro ou próximas ao sítio de interação à laminina.** São Paulo; 2007. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Doenças por prions são encefalopatias neurodegenerativas de origem infecciosa, esporádica ou hereditária que atingem tanto animais quanto o homem. Desde a identificação da isoforma celular da proteína prion e seqüenciamento do gene que a codifica, diversas mutações têm sido descritas no gene *PRNP*, sendo que mais de 55 destas segregam com enfermidades. A partir da década de 90 foram relatadas diversas funções fisiológicas de PrP^C e a hipótese de que as doenças de prion estão relacionadas à perda de função da proteína normal, e não apenas à neurotoxicidade da isoforma infecciosa, PrP^{Sc}, vem ganhando força desde então. Com o intuito de verificar a influência destas mutações na função fisiológica de PrP^C, a interação da proteína com seus ligantes e sua distribuição celular, foram geradas moléculas de PrP^C com as mutações V180I, T183A e E200K fusionadas a proteína fluorescente verde (GFP-PrP^C). Optamos por estudar estes mutantes uma vez que se localizam dentro sítio de interação entre PrP^C e um de seus ligantes, a laminina, descrito por nosso grupo. Esta interação é fundamental para vários processos biológicos de células do sistema nervoso, como adesão e diferenciação celular. Dada a influência do polimorfismo no códon 129 no fenótipo de algumas doenças priônicas de origem genética, a alteração de aminoácido neste códon foi associada a cada mutação, gerando haplótipos 129M/180I, 129V/180I, 129M/183A, 129V/183A, 129M/200K e 129V/200K, além do tipo selvagem associado a 129M ou 129V. Através de microscopia confocal, mostramos que a GFP-PrP^{V180I} e GFP-PrP^{E200K}, assim como a proteína do tipo selvagem, estão distribuídas corretamente na célula

(membrana plasmática e região perinuclear). Ao contrário, a mutação T183A afeta a distribuição celular da molécula de PrP^C, independente do aminoácido presente no códon 129, resultando no acúmulo da proteína na região perinuclear, sugerindo retenção no retículo endoplasmático. Ainda, através da indução de internalização da molécula de PrP^C presente na superfície celular por adição de íons cobre ao meio de cultura, mostramos que as construções GFP-PrP^{V180I} e GFP-PrP^{E200K} são funcionais. Ensaios de migração celular utilizando laminina como substrato foram realizados a fim de avaliar funcionalmente os mutantes de PrP^C. Para estes ensaios, as construções foram transfectadas em células N2a, das quais selecionamos clones para obtenção de populações com níveis de expressão homogêneos. Não foi possível detectar diferença significativa na taxa de migração das células mutantes em relação às que expressam a proteína tipo-selvagem. No entanto, apenas com esta observação não podemos afirmar que as mutações não afetam a função normal da proteína. Assim, outras abordagens devem ser realizadas a fim de melhor avaliar o impacto destas mutações na função normal de PrP^C.

SUMMARY

Cook, ZSP. **[Determination of the functional activity of cellular prion protein containing the mutations V180I, T183A e E200K localized in or next to the laminin binding site]**. São Paulo; 2007. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Prion diseases are neurodegenerative encephalopathies that can have infectious, sporadic or inherited origin and affect both animals and humans. Since the identification of the cellular isoform of the prion protein, followed by the sequencing of its corresponding gene, several mutations have been described on the PRNP gene and more than 55 of those being related to pathologies. Over the years, many physiological functions of PrP^C have been described, and the PrP^C loss-of-function hypothesis, for the prion diseases, is getting more strength. In order to verify the influence of those mutations on the physiological functions of PrP^C, we generated PrP^C molecules containing the mutations V180I, T183A and E200K fused to green fluorescence protein (GFP). Those mutants were chosen because they are localized in the laminin-PrP^C binding site, which was previously described by our group. This interaction is required for various biological processes on the nervous system, including cell adhesion and differentiation. Interestingly, the polymorphism at codon 129 affects the phenotype of some prion diseases when associated with mutations, and need to be considered. Thus, PrP^C molecules presenting a combination of the 129 polymorphism and the described mutations were generated resulting in the haplotypes: 129M/180I, 129V/180I, 129M/183A, 129V/183A, 129M/200K and 129V/200K, as well as wild-type with methionine or valine on codon 129. Using confocal microscopy, we showed that GFP-PrP^{V180I} and GFP-PrP^{E200K}, as well as the wild-type molecules, were correctly localized on the plasma membrane and perinuclear region. On the other hand, the mutation T183A altered the subcellular distribution of PrP^C, independently of the amino acid present at

codon 129, resulting in the protein accumulation at the perinuclear region, which suggests PrP^C retention in the endoplasmatic reticulum. Also, we showed that the GFP-PrP^{V180I} and GFP-PrP^{E200K} molecules are functional since they are internalized after the addition of copper ions to the culture medium. To evaluate the effect of the mutations on the PrP^C function, we next performed migration assays using laminin as the substrate. For that, the constructs were stably transfected in N2a cells, from which clones were selected to obtain homogeneous expression levels. No significant differences were detected on the migration rates of the mutants when comparing with their normal counterparts. However, with these preliminary observations it is not possible to conclude that PrP^C mutations do not affect the normal function of the protein. Further work, with different approaches, should be addressed for a better evaluation of the impact of these mutations on the normal functions of the cellular prion protein.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Estrutura terciária de PrP^C e PrP^{Sc}
- Figura 2** A proteína prion celular ancorada à membrana plasmática
- Figura 3** Principais ligantes de PrP^C
- Figura 4** Principais mutações patogênicas e polimorfismos do gene de PrP^C
- Figura 5** Estrutura dos vetores pEGFP-C1 contendo as construções GFP-PrP^C
- Figura 6** PCR recombinante
- Figura 7** Parâmetros utilizados no FACS
- Figura 8** Posicionamento das seqüências dos sítios de restrição
- Figura 9** Seqüência dos códons tipo selvagem, polimórfico e mutantes nas construções em pEGFP-C1
- Figura 10** Distribuição celular das construções GFP-PrP^C
- Figura 11** Expressão das quimeras GFP-PrP^C nas populações selecionadas
- Figura 12** Expressão das quimeras GFP-PrP^C nos clones selecionados a partir das populações iniciais
- Figura 13** Expressão basal das construções transfectadas nos clones selecionados
- Figura 14** Internalização induzida por Cu²⁺ nos clones expressando as construções de PrP^C
- Figura 15** Expressão de PrP^C exógeno nos clones do grupo 1
- Figura 16** Imagem representativa do ensaio de migração
- Figura 17** Quantificação dos ensaios de migração com os clones de N2a dos grupos 1 e 2
- Figura 18** Expressão de GFP-PrP^C nas populações selecionadas por FACS
- Figura 19** Quantificação dos ensaios de migração com as populações selecionadas por FACS

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Principais funções descritas para PrP^C.
- Tabela 2** Seqüência dos iniciadores utilizados para construção dos mutantes de PrP^C
- Tabela 3** Eficiência dos métodos de transfecção testados em diversas linhagens celulares
- Tabela 4** Comparação entre as médias de intensidades de fluorescência de GFP dos clones do grupo 1 e do grupo 2
- Tabela 5** Médias de intensidade de fluorescência do primeiro grupo de clones (Grupo 1)

LISTA DE ABREVIATURAS

Ala	Alanina
AMPc	Adenosina Monofosfato cíclico
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
BSA	Albumina sérica bovina
BSE	Encefalopatia espongiforme bovina
CJD	Doença de Creutzfeldt-Jakob
Cys	Cisteína
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
FACS	separação celular ativada por fluorescência
FFI	Insônia Familiar Fatal
GFP	Proteína fluorescente verde
GPI	Glicosil-fosfatidil-inositol
GSS	Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker
IPTG	Isopropil-beta-D-tiogalactopranosida
kDa	quiloDalton
LB	Meio Luria-Bertani
Leu	Leucina
LN	Laminina
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógenos
MEC	Matriz extracelular
Met	Metionina
nCAM	“Neural cell adhesion molecule”
NMR	Ressonância Magnética Nuclear
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
ORF	Janela aberta de leitura
PBS	Tampão Salino Fosfatado
PCR	Reação em cadeia da polimerase

PI3K	Fosfatidil-inositol-3 quinase
PKA	Proteína quinase dependente de AMP cíclico
PKC	Proteína Quinase C
PLC	Fosfolipase C
<i>Prnp</i>	Gene que codifica para a proteína prion celular em camundongos
<i>PRNP</i>	Gene que codifica para a proteína prion celular em humanos
PrP^C	Proteína prion celular
PrP^{res}	Proteína prion resistente à proteólise limitada
PrP^{Sc}	Proteína prion <i>scrapie</i>
RE	Retículo endoplasmático
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS–PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SFB	Soro Fetal Bovino
SOD	Superóxido dismutase
STI1	<i>Stress inducible protein 1</i>
TBS/TBST	<i>Tris Buffered Saline/ Tris Buffered Saline-Tween</i>
TE	Tris-EDTA
TSE	Encefalopatia espongiforme transmissível
UV	Ultravioleta
vCJD	Nova variante da doença de Creutzfeldt-Jakob
Vn	Vitronectina
WB	<i>Western Blot</i>
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	5
1.1	Prion <i>scrapie</i> e prion celular	5
1.2	Funções de PrP ^C	5
1.3	PrP ^C e seus ligantes – laminina, STI1 e vitronectina.....	5
1.4	Mutações do gene <i>PRNP</i> e a Doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD)	5
1.4.1	O polimorfismo no códon 129	5
2	OBJETIVOS	5
3	MATERIAL E MÉTODOS	5
3.1	Construção das quimeras GFP-PrP ^C	5
3.2	Transfecção das quimeras GFP-PrP ^C 129M/180I, 129V/180I, 129M/183A, 129V/183A, 129M/200K e 129V/200K, GFP-PrP ^C WT/129M e GFP-PrP ^C WT/129V em linhagens celulares	5
3.3	Imunodeteção (<i>Western Blot</i>)	5
3.4	Citometria de fluxo	5
3.5	Ensaio de migração.....	5
3.6	Ensaio de internalização de PrP ^C induzida por íons cobre.....	5
3.7	Microscopia confocal	5
4	RESULTADOS	5
4.1	Construção e clonagem de <i>PRNP</i> no vetor pEGFP-C1.	5
4.2	Transfecção das construções em linhagens celulares	5
4.3	Análise de distribuição celular das moléculas de PrP ^C mutadas	5
4.4	Avaliação funcional das proteínas mutantes	5
4.4.1	Ensaio de imunodeteção das construções nos clones de N2a	5
4.4.2	Ensaio de internalização induzida por Cu ²⁺	5

4.4.3	Avaliação do nível de expressão das construções de PrP ^C na superfície celular por citometria de fluxo	5
4.4.4	Ensaio de migração celular	5
5	DISCUSSÃO.....	5
5.1	Análise de distribuição celular das moléculas de PrP ^C mutadas	5
5.2	Avaliação funcional das proteínas mutantes	5
6	CONCLUSÕES.....	5
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5

1 INTRODUÇÃO

1.1 PRION *SCRAPIE* E PRION CELULAR

As encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs da sigla em inglês) são um grupo de doenças neurodegenerativas fatais representadas principalmente pela doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), síndrome de Gerstmann-Sträussler-Sheinker (GSS) e insônia familiar fatal (FFI) em humanos, *scrapie* em ovelhas e encefalopatia espongiforme em bovinos (mais conhecida como “doença da vaca louca”). Também chamadas de doenças por prions, as TSEs apresentam propriedade única por terem origem infecciosa, esporádica ou genética (AGUZZI e POLYMENIDOU, 2004; PRUSINER, 1998).

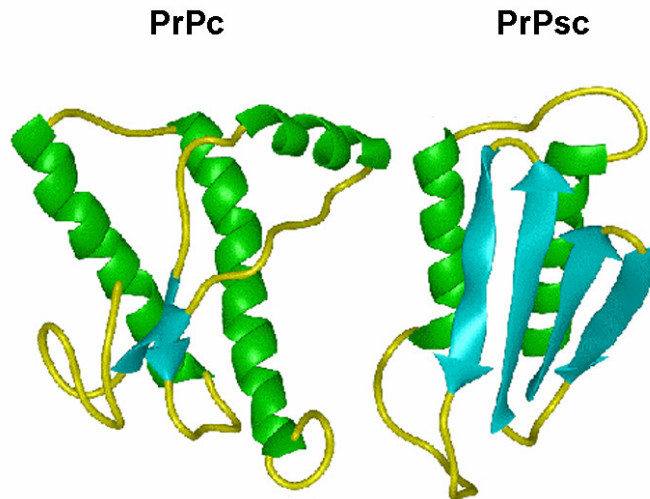
Por muitos anos a natureza físico-química do agente etiológico das TSEs foi discutida. De todas as doenças por prions, o *scrapie* é o que foi mais extensivamente estudado uma vez que foi o primeiro a ser transmitido a roedores (CHANDLER, 1961). A partir dos cérebros de hamsters experimentalmente infectados, foi possível a purificação e caracterização bioquímica da partícula causadora do *scrapie*, um material extremamente insolúvel, com características amilóides. Com as observações de que este agente era resistente a altas temperaturas, tratamento por agentes desnaturantes, radiações ultravioleta e raios-X, Stanley Prusiner, em 1982, propôs que a partícula infecciosa seria composta apenas por proteína, sem

nenhum ácido nucléico, distinguindo-a de todos os agentes patogênicos conhecidos até o momento. Ele então introduziu o termo “prion” para distinguir estas partículas infecciosas proteicas dos vírus e virióides (revisado por MARTINS, 1999).

Com a purificação das partículas infecciosas, foram produzidos anticorpos que reconheceram uma proteína de 33-35kDa, presente tanto no cérebro de animais normais quanto infectados (BARRY e PRUSINER, 1986; OESCH et al., 1985). A observação de que a proteína presente no cérebro de animais normais era totalmente degradada por enzimas proteolíticas, enquanto a molécula infecciosa era bastante resistente à sua ação, levou à conclusão de que havia uma isoforma celular normal da proteína infecciosa. O agente responsável pela transmissão da doença foi designado como PrP^{Sc} (proteína prion *scrapie*) e a proteína normal do hospedeiro foi chamada proteína prion celular, ou PrP^C (PRUSINER, 1989).

Em 1989, Prusiner propôs que PrP^{Sc} (também designado como PrP^{res}, de “resistência a digestão por proteinase K”) seria capaz de converter PrP^C em outras moléculas de PrP^{Sc} em células normais através da formação de dímeros. Assim, novas moléculas de PrP^{Sc} seriam geradas exponencialmente a partir do PrP^C, levando a um acúmulo de PrP^{Sc} insolúvel dentro e fora das células, o que provavelmente seria um dos eventos que levam a morte neuronal (PRUSINER, 1989). A produção de camundongos deficientes para o gene de PrP^C (*Prnp*^{0/0}) pelo grupo de Charles Weissmann (BUELER et al., 1993) e a observação de que estes animais eram completamente resistentes à infecção por prions, sendo esse efeito

reversível após a reintrodução do gene, trouxe mais uma evidência da participação do PrP^C no processo infeccioso.

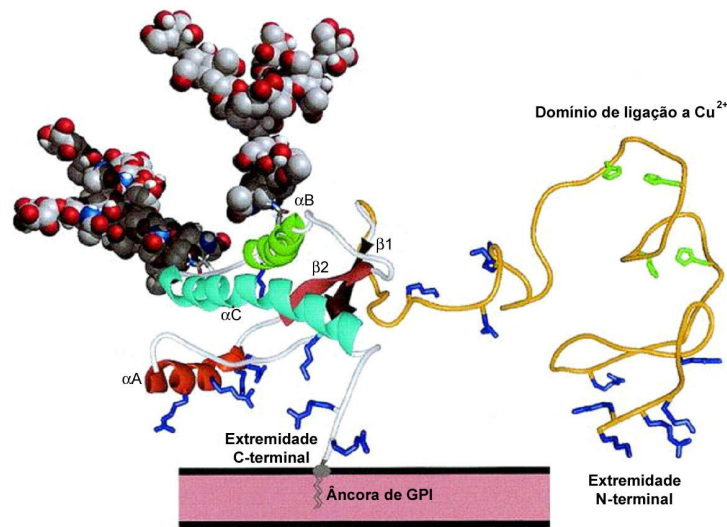


Legenda: PrP^C possui três regiões em α -hélice (espirais verdes) em sua estrutura e duas regiões em folha β -pregueada (setas azuis). PrP^{Sc}, por sua vez, apresenta duas regiões em α -hélice e quatro em folha β -pregueada.

Fonte: <http://www.ceniap.gov.ve/bdigital/congresos/vacaloca/rollomorela.htm>

Figura 1 - Estrutura terciária de PrP^C e PrP^{Sc}.

Embora tenham a mesma sequência de aminoácidos, as proteínas PrP^C e PrP^{Sc} diferem em sua estrutura terciária. Gasset e colaboradores (GASSET et al., 1992) propuseram que a transformação do PrP^C em PrP^{Sc} poderia envolver a conversão de estruturas α -hélice para β -pregueadas. Já no ano seguinte esta proposta foi confirmada em estudos de ressonância nuclear magnética (PAN et al., 1993) que mostraram que PrP^C possui cerca de 40% de sua estrutura arranjada em α -hélice enquanto PrP^{Sc} possui apenas 20% de α -hélice e 50% de estrutura β -pregueada (Figura 1).



Legenda: Resíduos 125-231 provenientes de uma estrutura de RMN (ressonância magnética nuclear) modelados com oligossacarídeos (representação compacta); a porção N-terminal (resíduos 23-124) aparece como *random coil* (em laranja) e a âncora de GPI em cinza. Estrutura secundária: hélice A (αA ; resíduos 144-156; vermelho), hélice B (αB ; resíduos 177-193; verde), hélice C (αC ; resíduos 200-223; azul claro), folhas- β $\beta 1$ (resíduos 128-131; vermelho) e $\beta 2$ (resíduos 160-164; vermelho escuro). Cadeias laterais de histidina envolvidas com a ligação de cobre são mostradas em verde. Resíduos de lisina e arginina representados como palitos em azul.

Fonte: (Adaptado de BENNION e DAGGETT, 2002).

Figura 2 – A proteína prion celular ancorada à membrana plasmática.

PrP^C é uma glicoproteína de superfície celular ligada à face externa da membrana plasmática através de sua porção C-terminal por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI, Figura 2) (PRUSINER, 1991; STAHL et al., 1987). É sintetizado pelos ribossomos concomitantemente ao seu transporte para o retículo endoplasmático (KIM e HEGDE, 2002), onde sofre modificações pós-traducionais, como clivagem do peptídeo sinal N-terminal

(resíduos 1-22) e do segmento hidrofóbico C-terminal (resíduos 231-253), além da adição de uma âncora de GPI (STAHL et al., 1987) e duas cadeias de oligossacarídeos nos resíduos Asn181 e Asn197. Ainda no retículo endoplasmático é formada uma ponte dissulfeto entre os resíduos Cys179 e Cys214 (CAUGHEY et al., 1989; RUDD et al., 2002).

A maior parte da molécula de PrP^C madura encontra-se exposta na superfície celular e ligada a outras proteínas de membrana (CAUGHEY et al., 1989). Lá está localizado em domínios de membrana ricos em colesterol denominados *lipid-rafts*, ou microdomínios de membrana, e passa por um ciclo que inclui sua internalização e reciclagem para a membrana (SUNYACH et al., 2003). O mecanismo de internalização ainda é controverso. Alguns autores defendem um processo mediado por vesículas revestidas externamente por clatrina (SHYNG et al., 1993; SUNYACH et al., 2003) e outros um processo mediado por domínios de membrana semelhantes a cavéolas (KANEKO et al., 1997; PETERS et al., 2003; VEY et al., 1996). A internalização de PrP^C também pode ser estimulada pela adição de íons cobre ao meio de cultura celular (PAULY e HARRIS, 1998). As moléculas que não estão na superfície celular concentram-se no retículo endoplasmático, complexo de Golgi e em organelas semelhantes a endossomos no citoplasma (LAINE et al., 2001; LEE et al., 2001; MAGALHAES et al., 2002).

1.2 FUNÇÕES DE PRP^C

Tabela 1 – Principais funções descritas para PrP^C

Tipo celular	Processo	Função	Mecanismos, ligantes e vias
Neurônio	Neuritogênese	Adesão, sinalização	Recruta NCAM nos “rafts” para permitir a ativação de Fyn-quinase, que medeia vias de sinalização intracelulares Ligação de STI1 induz a ativação de MAPK Liga a LRP/LP e HSPG em sítios distintos Liga a laminina
	Sinaptogênese, polarização	Sinalização	Age como fator de crescimento, ativando múltiplas vias
	Sobrevivência, efeitos tróficos	Anti-apoptótico	Interage com BAX, STI1 e NCAM
		Pro-apoptótico	Liga ao fator anti-apoptótico Bcl-2 Ligação cruzada com anticorpo anti-PrPc Aumenta níveis de p53
	Ligação a Cobre	Endocitose mediada por cobre	Induz agregamento de PrPc, sua saída dos “rafts” e endocitose dependente de clatrina
		Homeostase de cobre	Mantém níveis apropriados de cobre na membrana pré-sináptica e durante condições de estresse oxidativo
	Homeostase redox	Atividade SOD Sinalização	PrPc ligado a cobre tem atividade SOD Induz NADPH-oxidase dependente de ROS através da ativação de Fyn
Progenitores neurais	Neurogênese	Desconhecido	Aumenta proliferação celular em regiões neurogênicas
	Diferenciação	Desconhecido	Níveis de PrPc influenciam positivamente a diferenciação celular
Células-tronco hematopoiéticas	Renovação a longo prazo	Anti-apoptótica? Endereçamento?	Possíveis mecanismos: transduz sinais de sobrevivência celular; atividade de adesão celular direciona as células para o ambiente apropriado; ou funciona como co-receptor para hormônios, afetando a atividade das CTH
Células T	Ativação	Sinalização?	Regulação positiva de PrPc com ativação induzida por mitógenos
	Desenvolvimento	Antioxidante	Ligação a cobre no timo
Leucócitos	Diferenciação	Desconhecido	Expressão de PrPc em linhagens de linfócitos/monócitos
	Fagocitose	Desconhecido	PrPc modula fagocitose
	Resposta inflamatória	Endereçamento	PrPc altera o recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório
Astrócito	Diferenciação	Sinalização	Modulação de expressão de nestina e GFAP
	Sobrevivência	Sinalização	Interação com STI1 induz ativação de PKA

Fonte: Modificado de CAUGHEY e BARON, 2006

Apesar da crença de que o processo neurodegenerativo nas TSEs ocorra devido a neurotoxicidade de PrP^{Sc}, muitos autores já admitem a possibilidade de que estas doenças possam estar relacionadas à perda de função de PrP^C (HETZ et al., 2003; MARTINS et al., 2002). Por um lado, o acúmulo de placas amilóides causa danos no sistema nervoso central, como ocorre na doença de Alzheimer (AGUZZI e HAASS, 2003) e na amiloidose vascular cerebral (REVESZ et al., 2002). Por outro, apenas a deposição de PrP^{Sc} proveniente de enxertos de cérebros *Prnp*^{+/+} não é capaz de danificar cérebros de animais *Prnp*^{0/0} (BRANDNER et al., 1996) e depleção de PrP^C em neurônios de camundongos infectados previne a doença (MALLUCCI et al., 2003). Além disso, algumas variantes da doença não apresentam depósito amilóide. Assim, o acúmulo de PrP^{Sc} não deve ser o único responsável pela morte neuronal em doenças priônicas.

O PrP^C é uma proteína extremamente conservada evolutivamente, sendo encontrada não só em mamíferos como em aves, répteis, anfíbios e peixes (GABRIEL et al., 1992; HARRIS et al., 1991; OIDTMANN et al., 2003; SIMONIC et al., 2000; STRUMBO et al., 2001), o que sugere que ela tenha função celular importante.

A proteína prion celular é abundantemente expressa no sistema nervoso central, estando presente também em linfócitos, células gastroepiteliais, coração, rim e músculo (Tabela 1) (FOURNIER et al., 1998; HORIUCHI et al., 1995; SALES et al., 2002). No tecido nervoso, está localizado na membrana sináptica, mais provavelmente no domínio pré-sináptico, sugerindo uma função na transmissão sináptica e excitabilidade

neuronal (revisado por VASSALLO e HERMS, 2003). Foi também localizado em axônios em crescimento (SALES et al., 2002) e no citoplasma de alguns tipos neuronais (MIRONOV et al., 2003).

Camundongos *Prnp*^{0/0} aparentemente não possuem nenhum defeito anatômico ou no desenvolvimento (BUELER et al., 1993). A maior parte das alterações encontradas em camundongos *Prnp*^{0/0} são muito sutis, talvez porque os efeitos estejam sendo parcialmente compensados. Porém, alguns estudos demonstraram anormalidades eletrofisiológicas e estruturais no hipocampo (COLLING et al., 1996; COLLING et al., 1997; COLLINGE et al., 1994; MANSON et al., 1992), alterações no ritmo circadiano e padrão de sono (TOBLER et al., 1996) e aumento de sensibilidade a convulsões induzidas por agentes convulsivantes (WALZ et al., 1999). Porém, a relação destes fenótipos com a função normal de PrP^C não é clara. Alterações nas fibras de Mossy vistas no lobo temporal de pacientes epiléticos foram também descritas em animais deficientes para PrP^C, o que sugere envolvimento da proteína em processos epiléticos (COLLING et al., 1997).

PrP^C se liga a Cu²⁺ através da região de octapeptídeos na porção N-terminal (Figura 2) (BROWN et al., 1997; HORNSHAW et al., 1995), e esta interação parece induzir a internação da molécula, sugerindo um papel no metabolismo de cobre (BROWN et al., 1997; PAULY e HARRIS, 1998). Brown e colaboradores sugerem que PrP^C possa atuar como um depósito de íons Cu²⁺, que se ligariam a enzimas que previnem o estresse oxidativo, a partir da observação de que células de cérebro de camundongos *Prnp*^{0/0} são mais sensíveis a esta forma de estresse (BROWN, 2001; BROWN et al.,

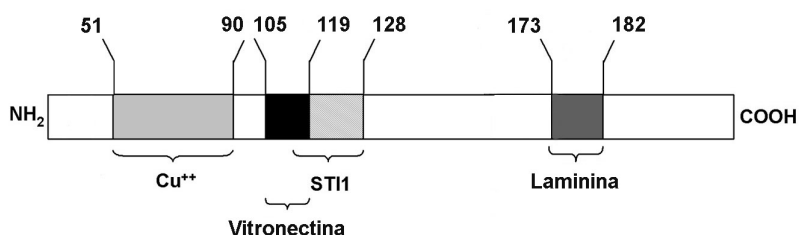
1999). Também nestes camundongos foi observada diminuição da atividade da enzima SOD-1 (superóxido dismutase –1) dependente de $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ e da catalase, além de um aumento na lipoperoxidação, oxidação protéica e modulação da enzima ornitina decarboxilase (KLAMT et al., 2001). Tanto camundongos *Prnp*^{0/0} quanto infectados com *scrapie* apresentaram mudanças na localização membranar da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) (KESHET et al., 1999; OVADIA et al., 1996). Camundongos que tiveram o gene *Prnp* removido após o nascimento apresentaram redução dos potenciais de pós-hiperpolarização em células do hipocampo, sugerindo uma função de PrP^C na modulação da excitabilidade neuronal (MALLUCCI et al., 2002). Aumento na excitabilidade neuronal, função alterada de nNOS e maior vulnerabilidade ao estresse oxidativo estão relacionados a danos e morte neuronal. Assim, estes fatos apoiam a hipótese de que a perda de função de PrP^C em doenças por prions possa contribuir para o processo neurodegenerativo.

Uma forte evidência de função neuroprotetora de PrP^C vem da descrição de um suposto ligante de PrP^C (MARTINS et al., 1997), que mais tarde foi identificado como a proteína STI1 (*Stress Inducible protein 1*) (ZANATA et al., 2002). A interação PrP^C-STI1 foi capaz de prevenir a morte celular programada de células não-diferenciadas da retina e neurônios hipocámpais (CHIARINI et al., 2002; LOPES et al., 2005).

A localização de PrP^C na membrana plasmática sugere papéis em eventos de sinalização (HERMS et al., 2000; MOUILLET-RICHARD et al.,

2000; SHMERLING et al., 1998) e em interações célula-matriz extracelular (GRANER et al., 2000a; GRANER et al., 2000b).

1.3 PrP^C E SEUS LIGANTES – LAMININA, STI1 E VITRONECTINA



Legenda: Esquema ilustrando os sítios de ligação de laminina, STI-1, vitronectina e cobre na molécula de PrP^C.

Fonte: Modificado de HAJJ et al. submetido.

Figura 3 - Principais ligantes de PrP^C.

Nos últimos anos, diversos ligantes de PrP^C têm sido descritos (Figura 3). A maior parte deles está envolvida no processo de adesão celular e são moléculas conhecidas por apresentarem diversas isoformas. Assim, acredita-se que PrP^C funcione como parte de complexos envolvendo diversas proteínas e subdomínios de membrana que são modulados pelo tipo celular, estágio de desenvolvimento, etapa de diferenciação e fatores intra- e extracelulares. Este controle da expressão dos diferentes ligantes de PrP^C permite que a interação destes com PrP^C seja altamente dependente do contexto celular e tenha diversas conseqüências funcionais (MARTINS et al., 2002).

Laminina (LN) é uma glicoproteína de 900kDa constituída de três cadeias polipeptídicas, α , β e γ , arranjadas em forma de cruz, com os braços mais longos formando uma hélice (BECK et al., 1990). É o principal componente não colagênico da matriz extracelular e regula processos biológicos como adesão, crescimento, morfologia e migração celular (OLIVEIRA et al., 2002). As respostas celulares ativadas por LN são mediadas por receptores de membrana celular, sendo os mais conhecidos as integrinas. No sistema nervoso central LN está relacionada com crescimento de neuritos, direcionamento do cone de crescimento e formação de sinapses (LUCKENBILL-EDDS, 1997; VENSTROM e REICHARDT, 1993). No braço longo da cadeia $\gamma 1$ encontra-se um domínio que participa na indução de crescimento neurítico, na migração neuronal e na regeneração do sistema nervoso (LIEBKIND et al., 2003; LIESI et al., 2001; WIKSTEN et al., 2003).

Trabalhos realizados por nosso grupo descrevem a ligação de alta afinidade e especificidade entre PrP^C e LN tanto *in vitro* como *ex vivo*. PrP^C se liga à cadeia $\gamma 1$ da LN (GRANER et al., 2000), que é a mais conservada em todos os tipos de laminina (LUCKENBILL-EDDS, 1997), sugerindo que a interação PrP^C-LN pode ser importante numa variedade de tecidos onde ambos são expressos. Esta interação se mostrou importante no processo de neuritogênese em linhagens celulares e culturas primárias de neurônios hipocampais (GRANER et al., 2000; GRANER et al., 2000) e no mecanismo de consolidação da memória em ratos (COITINHO et al., 2006).

Vitronectina (Vn) é uma glicoproteína abundante em diversos tecidos e está envolvida em vários processos metabólicos, como adesão celular, mecanismo de defesa humoral e invasão celular. A interação de PrP^C com Vn, observada previamente em trabalhos do nosso grupo, possui um papel importante na extensão axonal de neurônios da raiz dorsal (HAJJ, 2004).

Com o intuito de caracterizar ligantes para PrP^C, nosso grupo identificou STI1, uma fosfoproteína induzida por estresse, primeiramente descrita em *Saccharomyces cerevisiae* (NICOLET e CRAIG, 1989). Ensaios de ligação e de competição *in vitro* permitiram ainda identificar os sítios de ligação tanto em PrP^C quanto em STI1 (ZANATA et al., 2002). Nossos dados demonstraram ainda que STI1 é capaz de induzir efeito neuroprotetor contra apoptose através da via de PKA (proteína quinase dependente de AMP_c) (CHIARINI et al., 2002). Além disso, a interação entre PrP^C e STI1 está envolvida na diferenciação de neurônios hipocâmpais através da via de MAPK (*mitogen-activated protein kinase*, ou proteína quinase ativada por mitógeno) (LOPES et al., 2005).

Foram também descritas interações de PrP^C com NCAM (*neural cell adhesion molecule*, ou molécula de adesão de célula neural), recrutando NCAM para as balsas lipídicas e regulando a atividade de FYN-quinase (SANTUCCIONE ET AL., 2005), além do receptor de laminina e seu precursor (HUNDT ET AL., 2001), que pode ter papel importante na formação de PrP^{res}.

1.4 MUTAÇÕES DO GENE *PRNP* E A DOENÇA DE CREUTZFELDT-JAKOB (CJD)

A Doença de Creutzfeldt-Jakob é a mais freqüente entre as TSEs. A maior parte dos casos (85%) tem origem esporádica ou não definida (MASTERS et al., 1981). Formas adquiridas, incluindo a iatrogênica (transmissão ou infecção durante tratamento médico ou cirúrgico) ou nova variante (infecção através do consumo de carne bovina contaminada) são menos freqüentes. A freqüência de casos familiares varia de 6% dos casos de TSEs na França até 53% na Eslováquia, sendo a média mundial de 15% (revisado por KOVACS et al., 2005).

CJD afeta aproximadamente 1,6 vezes mais mulheres do que homens, com idade média de 60 anos (KOVACS et al., 2005). Os sintomas mais comuns são desordens visuais, perda de memória e movimentos mioclônicos. Uma em cada milhão de pessoas por ano é diagnosticada com CJD, sendo que 80% dos pacientes morrem dentro de 12 meses após o aparecimento dos primeiros sintomas (RICHARDSON e MASTERS, 1995). Microscopicamente, CJD caracteriza-se por morte neuronal, gliose e alterações espongiformes (MASTERS e RICHARDSON, 1978).

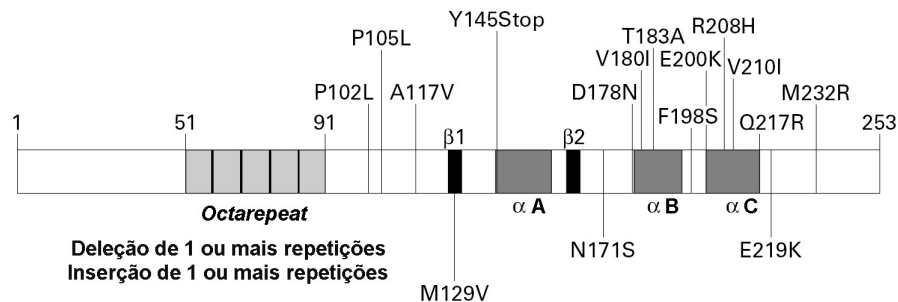
O primeiro caso autêntico de CJD foi descrito em 1924 por Kirschbaum (1924 apud KONG et al., 2004, p. 674). Curiosamente, acredita-se que o caso descrito por Creutzfeldt em 1920 provavelmente não seja a doença que atualmente conhecemos como CJD. No entanto, foi só em 1930

que Meggendorfer mostrou que o caso descrito por Kirschbaum fazia parte de uma família afetada pela forma hereditária de CJD (KONG et al., 2004) (MEGGENDORFER, 1930; STENDER, 1930; JAKOB et al., 1950, *apud* KONG et al., 2004, p. 674). A transmissão experimental de doenças por prions hereditárias com fenótipo semelhante à CJD a primatas não-humanos mostrou que elas eram transmitidas por um agente infeccioso (ROOS et al., 1973), o que representou um marco na história da medicina, demonstrando o primeiro exemplo de uma doença que era ao mesmo tempo hereditária e infecciosa. No início, acreditava-se que os indivíduos afetados possuíam uma susceptibilidade genética a uma infecção adquirida na infância (MASTERS et al., 1981). No entanto, quando na década de 80 Prusiner e colaboradores demonstraram a existência das isoformas normal e infecciosa da proteína prion (BARRY e PRUSINER, 1986; OESCH et al., 1985), foi possível então a clonagem e o seqüenciamento do gene de PrP^C humano (*PRNP*) e a descoberta de mutações patogênicas de *PRNP* nas formas hereditárias das doenças priônicas (HSIAO et al., 1989; OWEN et al., 1989).

Atualmente são conhecidas 55 mutações patogênicas e 16 polimorfismos no gene *PRNP* (Figura 4)(revisado por KONG et al., 2004). Destas mutações, 15 estão relacionadas à CJD hereditária.

Dentre as mutações encontradas em pacientes com a forma hereditária de CJD, a mais freqüente é a E200K (ácido aspártico para lisina no resíduo 200 de PrP^C), sendo encontrada em cerca de 70% deles. Análises genéticas sugerem que esta originou-se de um único evento mutacional na Espanha, disperso através da expulsão dos judeus Sefárdicos

para outras partes do mundo no final do século XV (COLOMBO, 2000; GOLDFARB et al., 1991; LEE et al., 1999). No entanto, existem outros haplótipos na Europa e no Japão, indicando também a ocorrência de eventos mutacionais independentes. A penetrância desta mutação varia consideravelmente de acordo com a localização geográfica. Enquanto que em portadores israelenses a penetrância chega a 89%, nos eslovacos e italianos não passa de 59% (CHAPMAN et al., 1994; D'ALESSANDRO et al., 1998; GOLDFARB et al., 1990; MITROVA e BELAY, 2002).



Legenda: Na parte superior da figura estão ilustradas as principais mutações patogênicas e, na inferior, os principais sítios polimórficos. Exceção feita à *octarepeat*, onde apenas 1 deleção é polimorfismo, enquanto 2 ou mais deleções ou inserções estão relacionadas a doenças.

Fonte: (Adaptado de JACKSON e COLLINGE, 2001).

Figura 4 - Principais mutações patogênicas e polimorfismos do gene de PrP^C.

Apesar desta mutação causar poucas variações nas estruturas secundária e terciária de PrP^C, ela altera a distribuição do potencial eletrostático da superfície (ZHANG et al., 2000), o que pode afetar a habilidade de PrP^C de se ligar a outras proteínas.

Dentre as mutações patogênicas descritas para *PRNP*, apenas no caso da mutação E200K foram encontrados pacientes homozigotos, tornando-se possível examinar se a proteína mutante é formada como uma proteína solúvel, não-patogênica que é convertida em PrP^{Sc} durante o longo período de incubação, ou se já é formada inicialmente como PrP^{Sc} mutante. Uma evidência indireta da primeira hipótese é a similaridade na idade de aparecimento da doença hereditária e esporádica. Uma evidência mais direta é a ausência de PrP^{Sc} na biópsia do cérebro de um indivíduo pré-sintomático portador da mutação E200K em homozigose (revisado por KONG et al., 2004). Esta evidência também reforça a hipótese de perda de função da proteína normal nas doenças por prions.

Kitamoto e colaboradores encontraram uma mutação no códon 180 em um paciente com CJD que resultou numa mudança de valina para isoleucina (V180I) e tinha curso clínico similar ao da mutação no códon 178 (KITAMOTO et al., 1993). Um estudo mais recente mostrou que pacientes com CJD causado pela mutação V180I, quando comparados com aqueles que apresentam a forma esporádica da doença, apresentaram idade mais avançada no começo da doença e progressão mais lenta. Os principais aspectos clínicos descritos são espasmos mioclônicos, problemas de coordenação motora típicos de doença de Parkinson, aquinesia e mutismo. Além disso, apresentaram disfunções corticais mais severas, que se mostraram desproporcionais aos sintomas observados. Curiosamente, foi observado também que estes pacientes freqüentemente não apresentam histórico familiar da doença (JIN et al., 2004).

Em uma família brasileira onde 9 membros haviam demonstrado clinicamente doença priônica caracterizada por demência pré-senil autossômica dominante com curso de progressão rápida, foi identificada uma mutação no códon 183 causando alteração de treonina para alanina (NITRINI et al., 1997). A doença aparecia em média aos 44 anos de idade com duração aproximada de 4 anos. A demência era caracterizada clinicamente com aspectos frontotemporais, incluindo mudanças precoces de personalidade. Outros sintomas descritos foram: perda de memória, agressividade, hiperoralidade, estereotipia verbal e sintomas parkinsonianos. A avaliação patológica de 3 pacientes mostrou alteração espongiforme, perda neuronal e gliose mínima nas áreas mais afetadas (NITRINI et al., 1997).

1.4.1 O polimorfismo no códon 129

Apenas 4 dos 16 polimorfismos relatados para o gene *PRNP* causam alteração no aminoácido, sendo o mais freqüente a mudança de metionina (M) para valina (V) no códon 129. Em caucasianos, a freqüência de homozigotos M/M, V/V e de heterozigotos é de 43%, 8% e 49%, respectivamente (ZIMMERMANN et al., 1999). Nas populações japonesa e chinesa, por sua vez, a freqüência de homozigotos V/V é nula, enquanto homozigotos M/M e heterozigotos apresentam os valores de 92-97% e 3-8%, respectivamente (DOH-URA et al., 1991; TSAI et al., 2001).

Estudando, em uma família francesa, a relação entre a síndrome de Gerstmann-Straussler e mutações em *PRNP* Doh-ura e colaboradores identificaram esta alteração, que primeiramente acreditaram ser uma mutação, no códon 129. Porém, essa também foi observada em indivíduos que não apresentavam a doença, levando à conclusão de que este era na verdade um polimorfismo com alta frequência entre caucasianos (DOH-URA et al., 1989). Mais tarde, este polimorfismo foi relacionado à CJD (COLLINGE et al., 1991; PALMER et al., 1991). O polimorfismo no códon 129 no alelo normal pode influenciar o início e a duração de doenças por prions de origem genética (IRONSIDE et al., 2005). Além disso, o fenótipo de algumas doenças de prion pode ser alterado, dependendo do aminoácido polimórfico presente no alelo mutante. Por exemplo, foi observado que a mutação D178N associada ao 129V resultou em fenótipo de CJD, ao passo que a mesma mutação associada a 129M resultou em insônia familiar fatal (GOLDFARB et al., 1992).

Uma importante observação foi que polimorfismo com o alelo valina no códon 129 não era encontrado em pacientes portadores da nova variante de CJD (vCJD), sugerindo que este levava a uma menor susceptibilidade ao desenvolvimento da doença.

Entre camundongos transgênicos expressando PrP^C humano e infectados com prion de BSE, só desenvolveram vCJD aqueles que possuíam o genótipo 129MM, enquanto que não ocorreu transmissão da doença para animais que eram 129VV (WADSWORTH et al., 2004), sugerindo que a metionina no códon 129 é necessária para o

desenvolvimento da doença. Tentando explicar a relação entre a proteína prion celular com diferentes alelos no códon 129 e os diferentes fenótipos patológicos relacionados, Petchanikow e colaboradores mostraram que um pequeno peptídeo da proteína prion humana contendo metionina na posição 129 possuía maior propensão a adotar a conformação de folha- β e formar agregados, características da isoforma patogênica da proteína (PETCHANIKOW et al., 2001).

Tanto a mutação T183A, que impossibilita a adição da cadeia de carboidrato no resíduo 181, como a mutação V180I, causam alterações nas propriedades físicas da molécula de PrP^C (LIEMANN e GLOCKSHUBER, 1999), o que poderia influenciar sua interação com outras moléculas.

Como o sítio de interação à LN encontra-se entre os aminoácidos 173 a 182 da molécula de PrP^C de camundongo (GRANER et al., 2000) e algumas mutações que segregam com enfermidades foram mapeadas dentro desta região, sugerimos que a perda de função na interação PrP^C-LN possa estar relacionada aos fenótipos patológicos.

Apesar das formas hereditárias representarem apenas uma fração das doenças priônicas, PrP^C mutadas parecem modelos ideais para o estudo da perda de função desta proteína. Dentro deste contexto, este trabalho pretende avaliar funcionalmente a interação de PrP^C contendo as mutações V180I, T183A e E200K com a molécula de laminina.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Determinação da distribuição celular e avaliação da atividade funcional da proteína prion celular contendo as mutações V180I, T183A ou E200K associadas ao polimorfismo no códon 129 M ou V e sua interação com a molécula de laminina através de ensaios de migração celular.

2.2 ESPECÍFICOS

2.2.1 Construção das quimeras GFP-PrP^C 129M/180I, 129V/180I, 129M/183A, 129V/183A, 129M/200K e 129V/200K, GFP-PrP^C WT/129M e GFP-PrP^C WT/129V;

2.2.2 Análise de distribuição celular das moléculas de PrP^C mutadas;

2.2.3 Avaliação da migração celular mediada por LN em células que expressam os mutantes de PrP^C V180I, T183A e E200K e sua comparação com células que expressam a molécula de PrP^C normal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONSTRUÇÃO DAS QUIMERAS GFP-PRP^C

3.1.1 Desenho dos iniciadores

Tabela 2 – Sequência dos iniciadores utilizados para construção dos mutantes de PrP^C.

Iniciador	Sequência (5'-3')
F1	ATG CTG GTT CTC TTT GTG
R1	CTC CCT CAA GCT GGA AAA AGA
F2	CAT <u>GAA TTC</u> T AAG AAG CGC CCG AAG CCT GGA
R2	ACT <u>GGA TCC</u> TCA ACC TAC TAT CAG AAA GAT
FPS	CCA CCG GTA GCA GTC ATT ATG GCG AAC CT
RPS	TGT GAT ATT GAT TCA GTC GTG CAC
Fw129V	GGC GGC TAC <u>GTG</u> CTG GGA AGT GCC
Rv129V	ACT TCC CAG <u>CAC</u> GTA GCC GCC AAG
Fw180I	CAC GAC TGC <u>ATC</u> AAT ATC ACA ATC
Rv180I	TGT GAT ATT <u>GAT</u> TCA GTC GTG CAC

Todos os iniciadores aqui descritos (Tabela 2) foram desenhados com base na sequência de *PRNP* depositada no *GeneBank* sob número de acesso AY008282 (NCBI - National Center Biothecnology Information) e sintetizados pela IDT-*Integrated DNA Technologies*. Os iniciadores foram

analisados quanto a possíveis associações entre eles ("*hairpin*" e dímeros) no *software Oligotech*, disponível na rede (<http://www.oligoset.com/analysis.php>).

Os iniciadores Fw180I, Rv180I, Fw129V e Rv129V, utilizados para mutagênese sítio-dirigida, foram desenhados contendo uma base alterada de modo a gerar a mutação de interesse (V→I) ou substituição do aminoácido metionina para valina no caso do códon 129 (bases sublinhadas na Tabela 2).

Para que as construções pudessem ser inseridas no sítio múltiplo de clonagem do vetor pEGFP-C1 utilizamos iniciadores externos com sítio para enzimas de restrição. O iniciador F2 hibrida nos nucleotídeos 110 a 129 e possui, a montante, uma seqüência alvo para a enzima *EcoRI* (sublinhado, Tabela 2). Já o iniciador R2 hibrida nos nucleotídeos 794 a 805, possuindo após esta seqüência o sítio de restrição para a enzima *BamHI* (sublinhado, Tabela 2).

3.1.2 Extração de DNA

As amostras de DNA foram obtidas de leucócitos de sangue periférico de pacientes portadores de doenças priônicas hereditárias, que fazem parte de um estudo conduzido por outra aluna do grupo, que evidenciou as mutações nos códons 183 e 200 de PrP^C em alguns deles. Além disso, foram obtidas amostras de indivíduos controle, sem mutação em *PRNP*. O uso do material desses pacientes foi aprovado pelo Comitê de Ética em

Pesquisa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (processo 6949/99) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital do Câncer (processo 700/05).

Para a extração de DNA, foi usado o sistema Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), seguindo o protocolo do fabricante. A precipitação de DNA foi feita com a adição de 3mL de isopropanol. Esta solução foi centrifugada, o sobrenadante desprezado e o precipitado lavado com 3mL de etanol 70%. O DNA precipitado e seco por 15 minutos foi ressuspendido em 100 µL de Líquido de Hidratação (Tris/EDTA).

Após a extração, o DNA foi dosado em espectrofotômetro pela absorbância em comprimento de onda de 260nm e estocado a - 20°C.

3.1.3 Amplificação do gene *PRNP*

O gene *PRNP* foi amplificado a partir das amostras de DNA genômico através da reação em cadeia da polimerase (PCR), realizada com o “kit” *Taq DNA Polimerase in Storage Buffer B* (Promega). A ciclagem consiste de desnaturação a 95°C por 10 minutos, 30 ciclos que incluíam desnaturação a 95°C por 1 minuto, hibridação por 1 minuto, com temperatura que diminuía a cada 10 ciclos (63°C, 61°C e 59°C) e extensão a 72°C por 1 minuto, e finalmente uma extensão final por 5 minutos também a 72°C. Foram utilizados iniciadores F1 e R1.

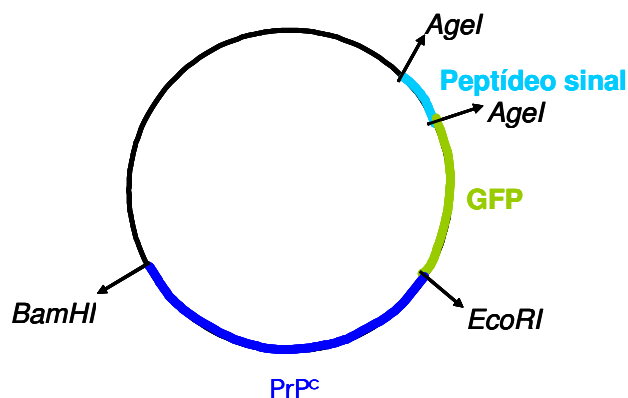
3.1.4 Purificação dos produtos de PCR e de reação de digestão

Os produtos de todas as reações de amplificação e de digestão foram purificados com o “kit” *Wizard® PCR Clean-Up System* (Promega) conforme o protocolo do fabricante.

3.1.5 Construção do vetor *pEGFP-C1* com a seqüência do peptídeo sinal de PrP^C

Para a análise da distribuição celular, era necessário que PrP^C fosse ligada a uma proteína repórter. A proteína repórter GFP (*Green Fluorescent Protein*, ou proteína fluorescente verde) é capaz de emitir fluorescência verde por si só quando excitada sob determinados comprimentos de onda sem a necessidade de cofatores especiais ou um substrato, permitindo seu uso como um fluoróforo funcional (CHALFIE et al., 1994). Além disso, a expressão de GFP parece ser inerte para as células. Assim, optamos por clonar o DNA contendo a seqüência aberta de leitura (ORF) de *PRNP* no vetor pEGFP-C1 (BD Biosciences Clontech). No entanto, foi necessário primeiro inserir a seqüência que codifica o peptídeo sinal humano de PrP^C no vetor, a montante da seqüência de EGFP, uma vez que a proteína GFP deveria ser transportada para a membrana fusionada à molécula de PrP^C (figura 5). Assim, foram utilizados iniciadores que flanqueiam apenas a região codificadora do peptídeo sinal, iniciando 10 bases a montante da ORF de PrP^C (FPS) e possuem em sua seqüência sítio para a enzima de restrição *AgeI*, que também cliva o vetor pEGFP-C1 a montante da seqüência de

EGFP. A sequência do peptídeo sinal foi então amplificada por PCR a partir de DNA genômico humano e este fragmento foi clonado no vetor pEGFP-C1.



Legenda: Esquema do vetor de expressão contendo GFP-PrP^C do tipo selvagem ou os mutantes de interesse. Na figura são mostrados os locais de inserção das seqüências que codificam o peptídeo sinal e PrP^C no vetor pEGFP. As setas indicam sítios para enzimas de restrição.

Figura 5 - Estrutura dos vetores pEGFP-C1 contendo as construções GFP-PrP^C.

3.1.5.1 Amplificação da seqüência do peptídeo sinal a partir de DNA genômico

A seqüência que codifica o peptídeo sinal de PrP^C foi amplificada a partir de DNA genômico humano através de PCR utilizando iniciadores FPS e RPS. Para as reações foi utilizado o “kit” *Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Promega), seguindo instruções sugeridas pelo fabricante. A ciclagem da reação consistiu de um passo inicial de desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguidos por 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 1 minuto, hibridação a 60°C por 1 minuto e extensão a 68°C por 1 minuto e uma extensão final a 68°C por 5 minutos.

3.1.5.2 Digestão com enzima de restrição e desfosforilação do plasmídeo

Após a purificação da amostra, a mesma foi submetida a uma reação de digestão com a enzima de restrição *AgeI* (New England Biolabs™) utilizando tampão apropriado por 3 horas a 37°C.

O vetor pEGFP-C1 foi também digerido com a enzima *AgeI*. Para evitar a recircularização do vetor, foi realizada uma reação de desfosforilação utilizando 10 unidades da enzima CIP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, New England Biolabs™) em tampão apropriado (NEB 4) por 1 hora a 37°C. A reação foi inativada a 72°C por 10 minutos e passou por um novo processo de purificação. O fragmento digerido e purificado foi então inserido no vetor através de reação de ligação.

3.1.6 Reação de ligação e transformação em bactérias termocompetentes

As reações de ligação de produtos de PCR nos plasmídeos foram realizadas em um volume total de 20µL utilizando 100 unidades da enzima T4 ligase (New England Biolabs™) por 16 horas a 4°C.

Metade (10µL) do volume de cada reação de ligação foi usada para transformação em bactérias termocompetentes *E. coli* cepa DH5α. Após o choque térmico, as bactérias foram incubadas por 1 hora em 1mL de meio LB (1% de triptona; 0,5% de extrato de levedura; 1% de NaCl; pH 7,5), a 37°C. Em seguida foram sedimentadas através de centrifugação a 1700xg por 1

minuto, ressuspendidas em 200µL de meio LB e semeadas em placas de LB-ágar (1,5% de ágar), contendo 50µg/mL de antibiótico (ampicilina no caso do vetor pGEM-T, ou kanamicina no caso de pEGFP-C1) contendo 0,5mM IPTG e 80µg/mL de x-gal no caso da clonagem no vetor pGEM-T. As colônias positivas (brancas) foram então inoculadas em 5mL de LB mais 50µg/mL de antibiótico, por 16 horas a 37° C, para posterior purificação de DNA plasmidial em pequena escala. Os plasmídeos foram purificados através do “kit” *Wizard® Minipreps DNA Purification System* (Promega), seguindo protocolo do fabricante.

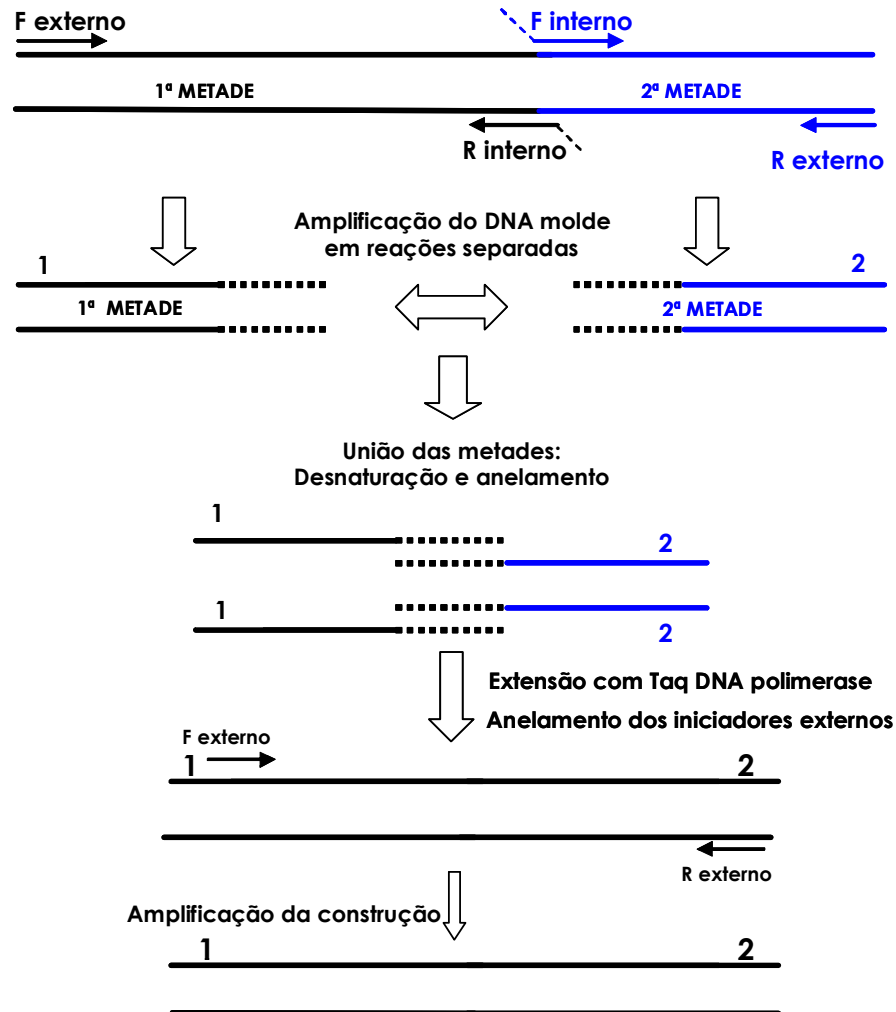
3.1.7 Construção da seqüência aberta de leitura de *PRNP* com os haplótipos 129M/180I, 129V/180I, 129V/183A e 129V/200K

As seqüências de *PRNP* com os haplótipos do tipo selvagem, associado ou não ao polimorfismo do códon 129, foram obtidas diretamente a partir de amostras de DNA de indivíduos controle. As seqüências com haplótipos 129M/183A e 129M/200K foram obtidas a partir das amostras de DNA de pacientes com doenças priônicas.

Os produtos amplificados por PCR a partir de DNA genômico foram clonados no vetor *pGEM®-T Easy Vector System I* (Promega), segundo protocolo do fabricante, e os clones positivos foram seqüenciados.

Os clones do gene *PRNP* amplificados a partir de DNA genômico e clonados no vetor *pGEM®-T* foram utilizados para a construção dos mutantes de PrP^C em vetor pEGFP-C1.

3.1.7.1 PCR recombinante



Legenda: Esquema ilustrando a técnica de PCR recombinante, utilizada para a construção dos mutantes. Aqui vemos a amplificação da ORF usada como molde, o produto amplificado representando os fragmentos delimitados pelos iniciadores (metades) e a ligação dessas metades para se obter uma nova ORF, contendo a mutação desejada.

Figura 6 - PCR recombinante.

Os mutantes para os quais não conseguimos amostras de pacientes foram construídos utilizando a técnica de PCR recombinante (AUSUBEL et al., 1993), uma abordagem simples para se fazer uma mutação sítio-dirigida, já padronizada e utilizada anteriormente em outros trabalhos do grupo (ZANATA et al., 2002).

Como DNA molde foram utilizados os clones gerados a partir de DNA genômico em vetor *pGEM[®]-T*: PrP^C WT/129M e WT/129V para a construção dos haplótipos 129M/180I e 129V/180I; e 129M/183A e 129M/200K para construção dos mutantes com haplótipos 129V/183A e 129V/200K, respectivamente. Para estas construções foram utilizados iniciadores internos específicos contendo uma base alterada codificando para a mutação de interesse (Fw180I e Rv180I) ou para o aminoácido valina no caso do códon 129 (Fw129Ve Rv129V). Para todas as construções foram utilizados iniciadores externos com sítio de restrição para as enzimas *EcoRI* e *BamHI* (F2 e R2, respectivamente), de modo que os fragmentos pudessem ser inseridos no sítio múltiplo de clonagem do vetor pEGFP-C1.

A Figura 6 mostra um esquema ilustrando as etapas da reação de PCR recombinante. Primeiramente foram realizadas duas reações de PCR concomitantes. Em uma das reações são utilizados o iniciador *forward* externo juntamente com um *reverse* interno, que resulta em um fragmento que denominamos “1ª metade”. Na outra reação são utilizados um iniciador *forward* interno juntamente com um *reverse* externo, que gera um fragmento que denominamos “2ª metade”. A segunda etapa consiste na junção das “metades”, onde cada uma delas funciona tanto como molde quanto iniciador

para a síntese da outra, gerando cópias do gene inteiro. Isto porque os iniciadores internos se sobrepõem em 7 códons, de modo que a extremidade 3' de uma metade seja complementar à extremidade 3' da outra. Este processo ocorre em uma reação com 25 ciclos contendo apenas uma desnaturação a 95°C por 5 minutos, uma hibridação a 60°C por 1 minuto e uma extensão a 68°C por 10 minutos. Finalmente, são introduzidos na reação os iniciadores externos F2 e R2 para a amplificação da nova fita contendo a mutação desejada, sendo realizada então nova reação de PCR.

Para as reações de PCR, foi utilizado o “kit” *Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity*, seguindo as condições sugeridas pelo fabricante, sendo as condições de ciclagem as mesmas do item “3.1.5.1”.

3.1.8 Clonagem dos mutantes PrP^C 129M/180I, 129V/180I, 129M/183A, 129V/183A, 129M/200K e 129V/200K, e das variantes polimórficas PrP^C WT/129M e WT/129V no vetor pEGFP-C1 contendo seqüência para o peptídeo sinal de PrP^C

Todas as construções amplificadas e purificadas, assim como o plasmídeo pEGFP-C1 contendo seqüência que codifica para o peptídeo sinal de PrP^C, foram submetidos a uma digestão dupla com as enzimas *EcoRI* (Gibco™) e *BamHI* (New England Biolabs™), utilizando os tampões apropriados, por 16 horas a 37°C. O produto dessa digestão sofreu uma nova purificação com “kit” *Wizard[®] PCR Clean-Up System*. Os insertos ligados no vetor foram clonados em bactérias termocompetentes e os clones então foram purificados e seqüenciados.

3.1.9 Seqüenciamento de clones

Uma vez selecionados os clones, cada um deles foi seqüenciado e a seqüência de bases nucleotídicas varrida minuciosamente para verificação da presença de mutação e identificação do aminoácido presente no códon polimórfico 129. O seqüenciamento destes clones foi feito utilizando iniciadores pUC/M13 (Promega), que anelam na seqüência do vetor.

Para o seqüenciamento de clones foi utilizado o kit *DYEnamic E Terminator[®]* (Amersham Pharmacia Biotech), seguindo protocolo do fabricante. A leitura da seqüência foi feita em seqüenciador *ABI 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

3.2 TRANSFEÇÃO DAS QUIMERAS GFP-PRP^C 129M/180I, 129V/180I, 129M/183A, 129V/183A, 129M/200K E 129V/200K, GFP-PRP^C WT/129M E GFP-PRP^C WT/129V EM LINHAGENS CELULARES

3.2.1 Linhagens celulares e cultura de células

As células foram cultivadas em meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino em atmosfera de 5% de CO₂ à 37°C. O meio foi trocado a cada 48 horas.

- HEK 293 (ATCC[®] Number: CRL-1573[™]): linhagem embrionária proveniente de rim humano, cultivada em meio MEM[®] (Gibco[™])

- F14 (cedida pelo Dr. David Brown): linhagem proveniente de fusão de células da linhagem N18TG2 de neuroblastoma murino e neurônios cerebelares de camundongos deficientes para o gene de PrP^C. Cultivada em meio DMEM[®]-High Glucose (Gibco[™]).
- MEF^{0/0}: linhagem proveniente de fibroblastos embrionários de camundongos deficientes para o gene de PrP^C. Cultivadas em meio DMEM[®] (Gibco[™]).
- CF10 (cedida pela Dra. Sue Priola): células derivadas de cérebro de embriões de camundongos deficientes para o gene de PrP^C. Cultivadas em meio Opti-MEM[®] (Gibco) e 1% de antibióticos Penicilin/streptavidine (Gibco[™]).
- N2a (ATCC[®] Number: CCL-131[™]): clone estabelecido a partir de neuroblastoma murino. Cultivadas em meio MEM[®] (Gibco[™]) contendo piruvato monossódico 1mM.
- SN56 (SN56.B5.G4): derivada da fusão de neurônios de camundongo de 21 dias pós-natal e linhagem de neuroblastoma murino N18TG2 (BLUSZTAJN et al., 1992). Cultivadas em meio DMEM[®] (Gibco[™]).

3.2.2 Transfecção com Lipofectamine[®] 2000 (Invitrogen[™])

Um dia antes da transfecção as células foram plaqueadas em uma confluência de aproximadamente 60% em placas de 35mm. Foram adicionados 2,5μL de Lipofectamine[®]2000 a 150μL do meio. Separadamente, em outros 150μL de meio de cultura, foi adicionado 2μg

DNA plasmidial. Cada uma das soluções foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente e elas foram então misturadas delicadamente. A solução contendo Lipofectamine®2000 e DNA plasmidial em meio de cultura foi então incubada por 20 minutos à temperatura ambiente para a formação dos complexos DNA-Lipofectamine®2000. Durante este período, as células foram lavadas com PBS (*Phosphate Buffered Saline Solution*, solução salina tamponada com fosfato – 10mM de Na_2HPO_4 , 150mM NaCl, pH 7,4) e 1,5mL de meio de cultura sem soro ou antibióticos foi adicionado a cada placa. Após este período, a mistura foi adicionada a cada placa e as células foram incubadas por 4 horas. Ao final do período de transfecção, cada placa foi lavada uma vez com PBS e foram adicionados 2mL de meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino.

Para transfecção estável na linhagem N2a, após a transfecção, as células foram selecionadas com 600µg/mL de Geneticina (Gibco™), ao qual o vetor pEGFP-C1 confere resistência. A partir destas populações foram selecionados clones pelo método de diluição limitante.

3.2.3 Transfecção pelo método de co-precipitação de fosfato de cálcio

Para transfecção em placas de 100mm de diâmetro, utilizamos 12µg do plasmídeo de interesse em 750µl de água deionizada, seguido de 250µl de solução 1M de CaCl_2 e 1000µl de solução 2X BBS (50mM BES, 250mM de NaCl e 1mM Na_2HPO_4 , pH 6,95). Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, foram adicionados 8 ml de meio de cultura com soro. As células foram incubadas com a solução acima por 5 horas em estufa

úmida com 3% CO₂. Após este tempo, o meio foi retirado e a placa lavada com 5ml de solução PBS. Novo meio de cultura foi adicionado e a placa incubada em estufa úmida, com 5% de CO₂, por 48-72 horas.

3.2.4 Transfecção com Effectene™ (Qiagen)

As células foram transfectadas em placas de 35mm e a padronização das condições de transfecção foi realizada seguindo as recomendações do fabricante.

3.3 IMUNODETECÇÃO (WESTERN BLOT)

As células N2a semeadas em placas de 100mm em alta confluência, foram incubadas em tampão de lise (50 mM tris-HCl pH 7,5, 0,5% Triton X-100, 0,5% deoxicolato de sódio, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl). A solução protéica foi dosada através de ensaio colorimétrico pelo reagente de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay*, Bio-Rad). Aproximadamente 250µg de proteínas do extrato foram separadas eletroforéticamente em gel de poliacrilamida a 10% contendo SDS (SDS-PAGE), transferidas e imobilizadas em membrana de nitrocelulose (0,45µm – Amersham Biosciences). A membrana foi bloqueada com TBST (120mM de NaCl, 20mM de Tris e 0,05% de Tween 20) contendo 5% de leite desnatado liofilizado (Molico-Nestlé™). Em seguida, a membrana foi incubada com soro anti-PrP^C policlonal M235 – produzido em camundogos deficientes para o

gene de PrP^C sensibilizados com proteína PrP^C murina recombinante (ZANATA et al., 2002) e que é capaz de reconhecer tanto a proteína murina quanto a humana – diluído 1:3000 em TBST. Após lavagem com TBST, a membrana foi incubada com anticorpo secundário (contra IgG de camundongo) conjugado à peroxidase diluído 1:3000. Após nova sequência de lavagens a reação foi revelada utilizando o "kit" *ECL Western Blotting Analysis System* (Amersham Biosciences) seguida de exposição de um filme de raio-X à membrana.

3.4 CITOMETRIA DE FLUXO

Alíquotas de 10^6 células foram incubadas por 30 minutos a 37°C com meio acrescido de 10% de soro fetal bovino para a recuperação da membrana após a tripsinização. Em seguida foram incubadas com anticorpo policlonal M235 em PBS-BSA-azida (PBS contendo 0,5% albumina sérica bovina – BSA – e 0,05% azida sódica) por 1 hora a 4°C. As células foram então lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com anticorpo secundário marcado com PE (ficoeritrina, BD PharMingen) em PBS-BSA-azida, por 1h à 4°C. Após nova lavagem, as células foram ressuspensas no mesmo tampão e a leitura de fluorescência realizada nos aparelho BD FACScan ou BD FACSCalibur (ambos Becton Dickinson), utilizando os *softwares* “*Cell Lyses*” ou “*Cell Quest Pro*”, respectivamente. O teste de Kilmorogov-Smirnov para comparação de duas populações foi realizado no *software* “*Cell Quest Pro*”.

Nos casos em que verificamos apenas a fluorescência de GFP, alíquotas de 10^6 células foram ressuspensas em solução PBS-BSA-azida, seguida da leitura direta da fluorescência.

Para a análise de fluorescência selecionamos o uso do laser de argônio (emissão 488nm) e detectores de 530nm (GFP) e 585nm (PE).

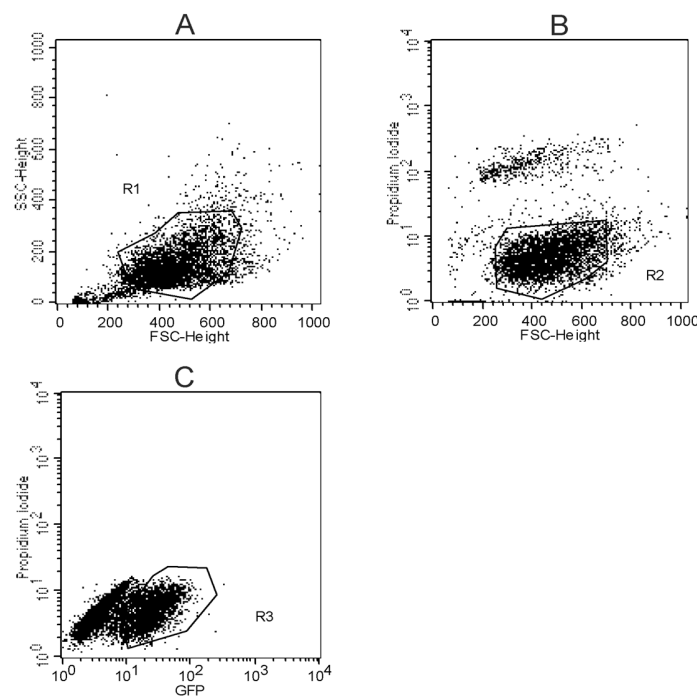
3.4.1 FACS (*fluorescence-activated cell sorting*, ou separação celular ativada por fluorescência)

A separação das células, “ou cell sorting”, foi realizada no aparelho BD FACSCalibur, utilizando o *software* “CellQuest Pro”. As células foram ressuspensas em uma solução de PBS-BSA 0,5%, de modo a resultar numa concentração final aproximada de 10^7 céls/mL. Para marcar as células inviáveis, utilizamos 1µg/mL do corante intercalante de DNA iodeto de propídeo (IP). Alíquotas das células sem IP foram separadas para serem utilizadas para compensação da leitura de fluorescência vermelha (IP) em relação à verde (GFP). Como controle negativo da fluorescência foi utilizada uma população de células N2a não transfectadas, de onde também foi separada uma alíquota sem IP.

Na Figura 7 estão ilustrados os parâmetros de seleção das células de interesse. Em A, vemos a distribuição populacional de células por tamanho (eixo X) e granulosidade (eixo Y) onde selecionamos uma região, deixando de fora possíveis fragmentos celulares e células agregadas. Em B, selecionamos as células viáveis, tendo tamanho de células (eixo X) por fluorescência de iodeto de propídeo (eixo Y). E em C, selecionamos as

células por fluorescência de GFP, tendo intensidade de fluorescência de GFP (eixo X) por intensidade de fluorescência de iodeto de propídeo (eixo Y).

As células selecionadas foram coletadas em tubos de 50mL previamente revestidos com uma solução de BSA 5% em PBS incubada por 1 hora a 4°C. Em seguida as células foram recuperadas com uma centrifugação a 300xg por 5 minutos, ressuspensas em meio de cultura e colocadas em garrafas de cultura celular.



Legenda: Gráficos do tipo “dot-plots” para seleção de células N2a expressando GFP-PrP^C 129M. As regiões delimitadas pela linha preta indicam a população escolhida. A, Exclusão de fragmentos celulares e células grandes; B, Seleção das células viáveis (não marcadas com IP – *propidium iodide*); C, Seleção de células GFP-positivas.

Figura 7 - Parâmetros utilizados no FACS.

3.5 ENSAIO DE MIGRAÇÃO

Os ensaios foram realizados em câmaras de Boyden (Transwell® – Corning) com membranas de 6,5mm de diâmetro contendo poros de 8,0µm. As membranas foram sensibilizadas com 5µg/ml de LN ou 0,5% de BSA por 1 hora a 37°C. Para evitar ligações inespecíficas, em seguida as membranas foram bloqueadas com BSA 0,5% por 30 minutos a 37°C. Em cada poço foram plaqueadas 2×10^5 células, que permaneceram incubadas por 6 horas em estufa com atmosfera constante de 5% de CO₂ a 37°C. Encerrado o período de migração, os poços foram lavados com PBS e as células fixadas com paraformaldeído (4%) e coradas com intercalante de DNA DAPI (0,1µg/ml). As células que não migraram, ficando na face superior da membrana, foram removidas para possibilitar a quantificação. Imagens de 10 campos aleatórios de cada membrana foram capturadas em microscópio Olympus IX70 sob filtro UV (SWB). A contagem do número de células por campo foi realizada com o auxílio de um programa de processamento de imagem (Image J®).

Para comparação entre as amostras, os valores de média de número de células por campo foram normalizados em relação à média obtida das células N2a transfectadas com o vetor vazio. As análises estatísticas da média de 3 experimentos independentes foram feitas através da análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltiplas Tukey-HSD. Foi considerada uma diferença estatisticamente significativa quando $p < 0,05$ em relação à migração dos clones que expressavam PrP^C WT/129M.

3.6 ENSAIO DE INTERNALIZAÇÃO DE PRP^C INDUZIDA POR ÍONS COBRE

Para o ensaio de internalização, células N2a expressando as diferentes construções foram plaqueadas em baixa confluência sobre lamínulas em placas de 35mm. Em PBS, Cu²⁺ (500μM) foi adicionado e incubado por 10 minutos. Utilizando microscopia confocal (como abaixo), foram capturadas imagens aos 5 e 10 minutos de incubação. Os resultados foram analisados qualitativamente através dessas imagens.

3.7 MICROSCOPIA CONFOCAL

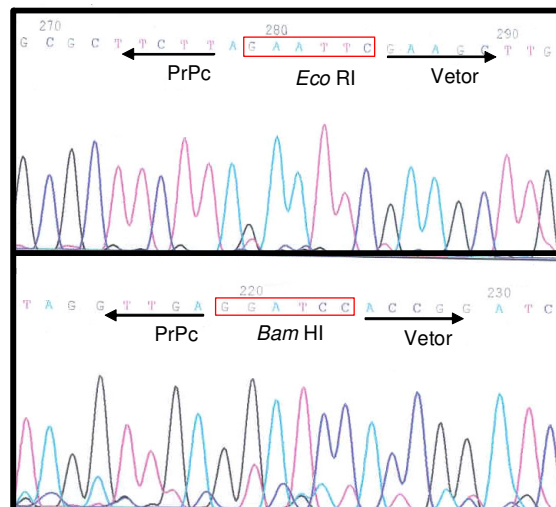
As análises feitas sob microscopia confocal (*BioRad Radiance*) foram realizadas em microscópio Nikon TE 2000 utilizando laser de argônio 488nm.

4 RESULTADOS

4.1 CONSTRUÇÃO E CLONAGEM DE *PRNP* NO VETOR PEGFP-C1.

A primeira etapa do trabalho consistiu na construção e clonagem, no vetor pEGFP-C1, da sequência do gene de PrP^C contendo as mutações desejadas.

Comparando a sequência de bases nucleotídicas do vetor com os seqüenciamentos dos pontos onde o inserto de *PRNP* clonado foi inserido em pEGFP, vemos o correto posicionamento dos sítios de restrição das enzimas *EcoRI* e *BamHI* (Figura 8).

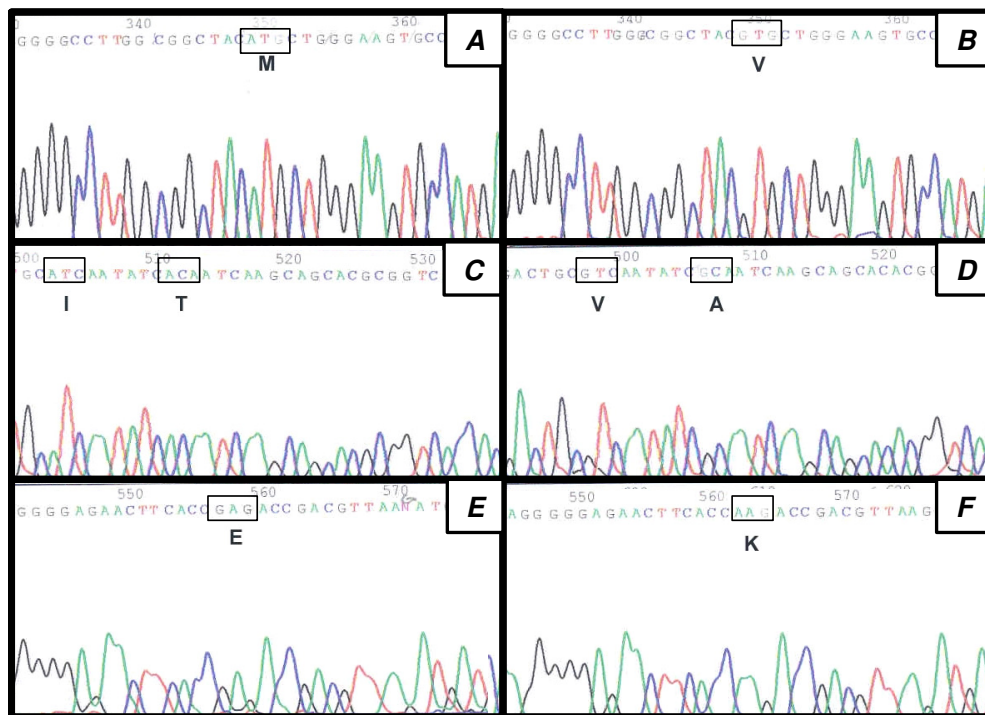


Legenda: Eletroferograma representativo do seqüenciamento dos sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* e *BamHI* entre o vetor e o inserto de *PRNP*.

Figura 8 - Posicionamento correto das seqüências dos sítios de restrição.

Ainda, nossos mutantes não apresentaram erros adicionais em suas bases. Observamos a presença das mutações e dos polimorfismos

desejados, como mostra a Figura 9, onde vemos a correta mudança dos nucleotídeos, representados nos códons 129M como -ATG-, 129V como -GTG-, 180I -ATC-, 183A -GCA- e 200K -AAG-.



Legenda: Eletroferogramas representativos do seqüenciamento dos clones de *PRNP* no vetor pEGFP-C1 mostrando as regiões mutadas e as correspondentes do tipo selvagem. A- códon 129M; B- códon 129V; C- códons 180I (mutado) e 183T (normal); D- códon 180V (normal) e 183A (mutado); E- códon 200E (normal); F- códon 200K (mutado).

Figura 9 - Seqüência dos códons tipo selvagem, polimórfico e mutantes nas construções em pEGFP-C1.

4.2 TRANSFEÇÃO DAS CONSTRUÇÕES EM LINHAGENS CELULARES

Para a avaliação bioquímica e biológica das proteínas mutantes, os vetores contendo as quimeras GFP-PrP^C foram transfectados em linhagens celulares. Foram feitos testes em diversas linhagens, iniciando por aquelas que não apresentavam expressão endógena de PrP^C, que seriam as mais apropriadas para que não houvesse uma possível interferência da proteína endógena na atividade funcional da proteína mutante. No entanto, após diversas tentativas (resumidas na Tabela 3), verificamos que a linhagem N2a, apesar de expressar PrP^C, era a que melhor se enquadrava nas nossas necessidades, sendo de origem neuronal e apresentando melhor eficiência de transfecção. A linhagem F14 parecia ser a ideal por ser proveniente de células depletadas de PrP^C e apresentar boa eficiência de transfecção, mas em uma análise para confirmar a ausência de proteína nestas células, detectamos alta expressão de PrP^C na superfície (dados não mostrados).

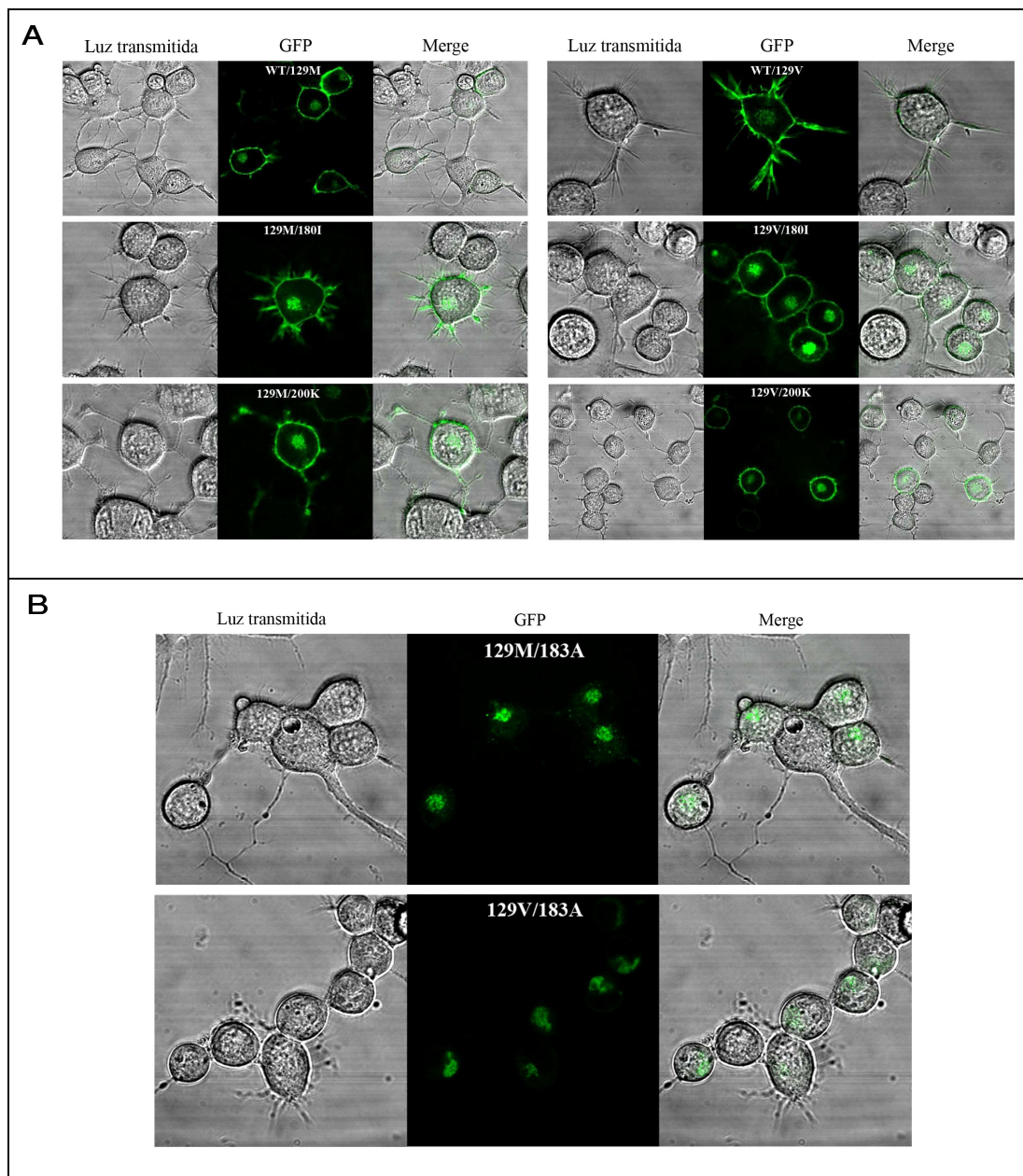
Tabela 3 – Eficiência dos métodos de transfecção testados em diversas linhagens celulares.

Linhagem	Eficiência do Método de Transfecção			Aplicação
	<i>Ca₂PO₄</i>	<i>Lipofectamine</i>	<i>Effectene</i>	
<i>HEK 293T</i>	boa	nula (tóxico)	n/a	n/a
<i>F14</i>	ruim	boa	n/a	n/a
<i>MEF^{0/0}</i>	nula (tóxico)	nula (tóxico)	nula (tóxico)	n/a
<i>CF10</i>	ruim	ruim	ruim	n/a
<i>N2a</i>	ruim	boa	n/a	ensaios funcionais
<i>SN56</i>	ruim	boa	n/a	avaliação distribuição celular

4.3 ANÁLISE DE DISTRIBUIÇÃO CELULAR DAS MOLÉCULAS DE PRP^C MUTADAS

Para avaliar a distribuição celular das quimeras mutantes, optamos por utilizar a linhagem celular SN56, de origem neuronal, pois ela apresenta uma morfologia ideal para este tipo de análise, sendo utilizada em diversos estudos de localização e tráfego de proteínas (BARBOSA, Jr. et al., 2002; MAGALHAES et al., 2005; MAGALHAES et al., 2002). Após a transfecção, as células foram carenciadas de soro e foi adicionado 1mM de dibutiril-AMPc para diferenciá-las. As imagens foram adquiridas através de microscopia confocal.

Como já descrito anteriormente, PrP^C é uma glicoproteína de membrana plasmática. Assim, conforme o esperado, foi possível observar as quimeras GFP-PrP^C WT/129M e WT/129V localizando-se na membrana celular e na região perinuclear, que corresponde ao complexo de Golgi (LEE et al., 2001) (Figura 10A). Este mesmo padrão de distribuição celular foi observado para os mutantes 129M/180I, 129V/180I, 129M/200K e 129V/200K. Interessantemente, observamos que a proteína prion celular com a mutação T183A parece estar acumulada na região perinuclear, independentemente do aminoácido presente no códon polimórfico 129 (Figura 10B).

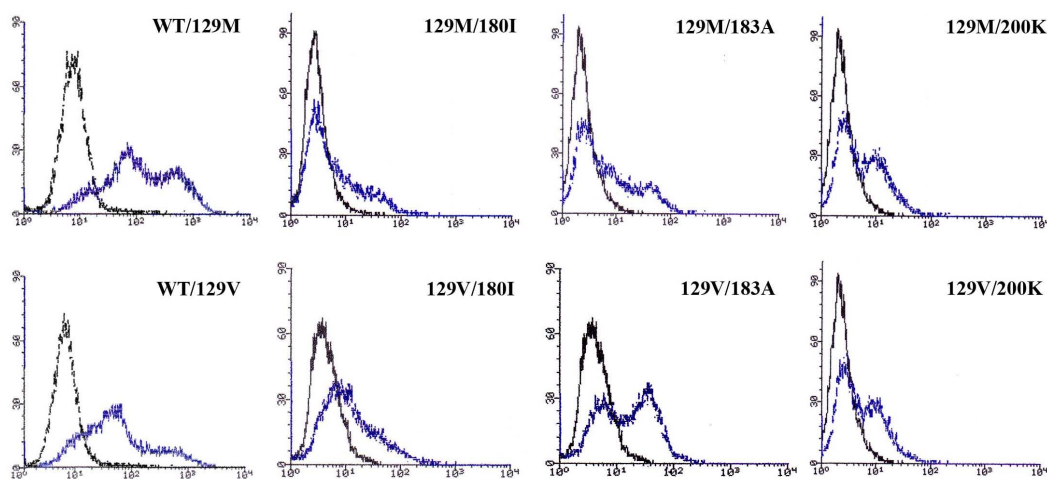


Legenda: Imagens de microscopia confocal mostrando a distribuição celular das construções GFP-PrP^C. A: Construções que apresentam localização celular normal. B: As quimeras GFP-PrP^C 129M/183A e 129V/183A apresentam distribuição celular alterada.

Figura 10 - Distribuição celular das construções GFP-PrP^C.

4.4 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DAS PROTEÍNAS MUTANTES

Para os ensaios funcionais, as construções foram transfectadas na linhagem N2a. Após a seleção com geneticina, observamos que as populações de células foram capazes de manter a expressão de GFP-PrP^C (Figura 11). No entanto, como se pode observar, elas são heterogêneas (presença de dois ou mais picos de deslocamento de fluorescência), sendo necessária a seleção de clones para a obtenção de populações com um nível homogêneo de expressão de GFP-PrP^C.



Legenda: Histogramas representativos de ensaios de citometria de fluxo, mostrando o deslocamento dos picos de fluorescência de GFP das populações selecionadas (linhas azuis) em relação às células N2a não transfectadas (linhas pretas).

Figura 11 – Expressão das quimeras GFP-PrP^C nas populações selecionadas.

Assim, através do método de diluição limitante, selecionamos dois clones das células transfectadas com cada construção mutante e do tipo

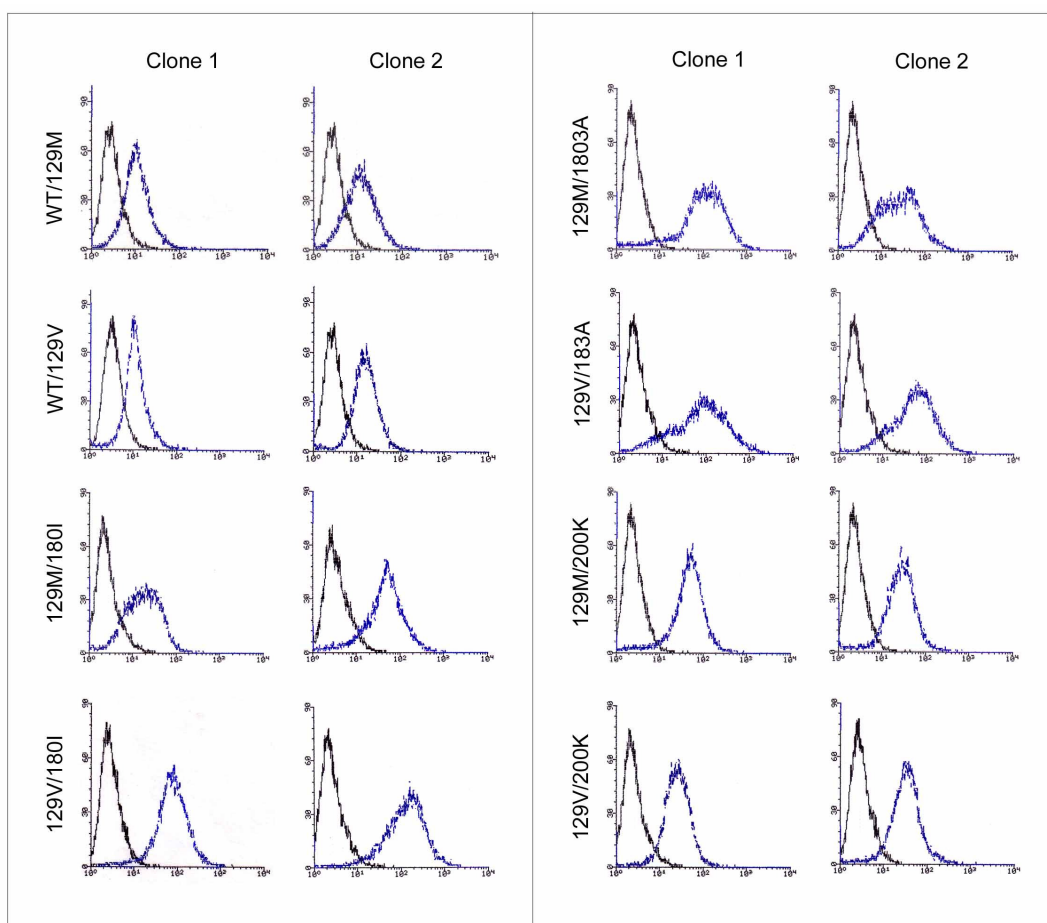
selvagem (Figura 12), para a realização dos ensaios funcionais com dois grupos de clones distintos. Podemos notar a presença de apenas um pico de deslocamento de fluorescência mostrando homogeneidade entre as populações celulares.

A análise do deslocamento dos picos de fluorescência de GFP do segundo grupo de clones, quando comparados à fluorescência de GFP do primeiro grupo, se mostraram similares (Figura 12). A Tabela 4 mostra as médias das intensidades de fluorescência de cada clone normalizadas com relação à média da intensidade de fluorescência da célula N2a não transfectada

A aparente discrepância observada entre alguns números ocorre porque a medida da intensidade de fluorescência é influenciada pela medida da base do histograma, refletindo a homogeneidade da população. Apesar da expressão às vezes não ser homogênea, a maior parte das populações apresentam uma intensidade de fluorescência que fica entre o segundo e o terceiro log do eixo y. Indicando, portanto uma expressão similar de GFP e indiretamente de PrP^C entre os clones.

Tabela 4 – Comparação entre as médias de intensidades de fluorescência de GFP dos clones do grupo 1 e do grupo 2.

	clone 1	clone 2
WT/129M	3,57	3,87
WT/129V	3,17	4,68
129M/180I	5,40	11,75
129V/180I	27,37	43,68
129M/183A	41,42	9,48
129V/183A	24,56	17,90
129M/200K	16,55	9,56
129V/200K	9,32	9,99



Legenda: Histogramas representativos de ensaios de citometria de fluxo mostrando o deslocamento dos picos de fluorescência de GFP dos clones selecionados por diluição limitante (linhas azuis) em relação às células N2a não transfectadas (linhas pretas).

Figura 12 - Expressão das quimeras GFP-PrP^C nos clones selecionados a partir das populações iniciais.

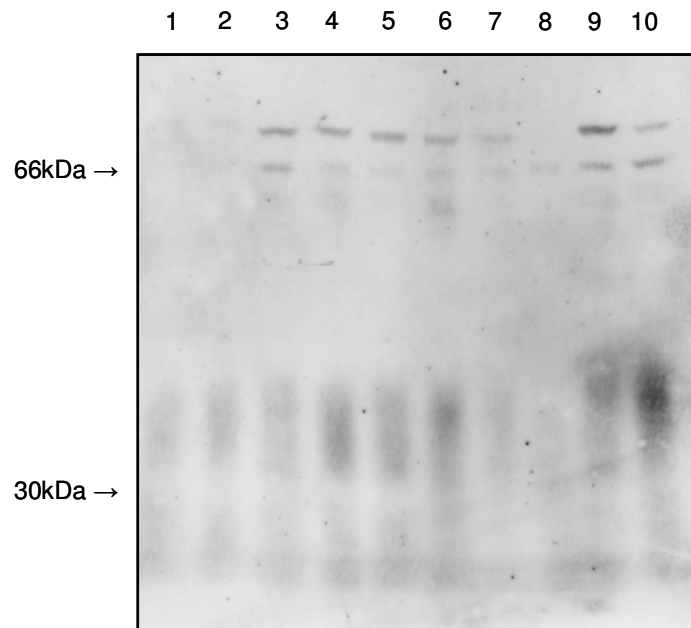
4.4.1 Ensaio de imunodeteção das construções nos clones de N2a

Para verificar a expressão das construções nos clones selecionados, primeiramente foi realizado um ensaio de imunodeteção utilizando o anticorpo policlonal anti-PrP^C M235, que é capaz de reconhecer tanto a proteína murina quanto a humana. Desta forma, podemos comparar as intensidades das bandas correspondentes à proteína exógena (humana) em relação à endógena (murina). Por esta abordagem realizamos uma avaliação qualitativa da expressão das construções GFP-PrP^C nos clones e mostramos que, aparentemente, a intensidade das bandas correspondentes à proteína exógena fusionada a GFP (aproximadamente 66kDa) é similar à das bandas correspondentes à proteína endógena (aproximadamente 30kDa) (Figura 13, linhas 3 a 10), indicando que nossas construções estão sendo expressas em concentrações similares às fisiológicas.

Além do nível de expressão da proteína exógena, por esta abordagem também foi possível fazer uma avaliação do padrão de glicosilação das proteínas mutantes. A separação por SDS-PAGE de PrP^C resulta no aparecimento de 3 bandas distintas, correspondendo às formas diglicosilada, monoglicosilada e não-glicosilada.

Podemos verificar que, com exceção de GFP-PrP^C 129V/183A, todas as construções parecem apresentar as três formas da proteína, com predominância da forma diglicosilada. No caso da construção GFP-PrP^C 129V/183A (Figura 13, linha 8), não detectamos a forma diglicosilada. No

entanto, estudos mais detalhados, como um ensaio enzimático de deglicosilação, serão necessários para confirmar estes resultados.



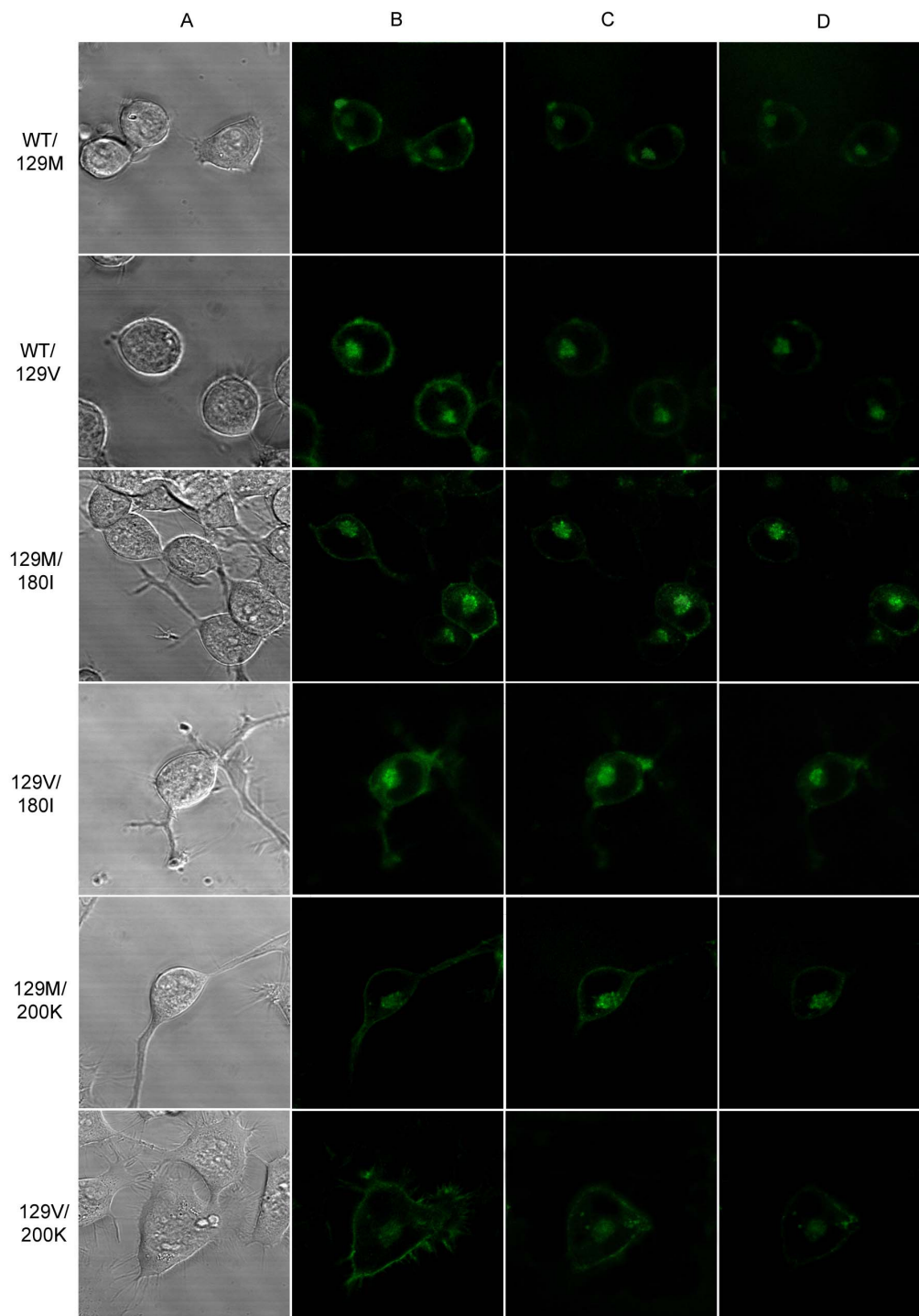
Legenda: Autorradiografia representativa de ensaio de imunodeteção de PrP^C nos clones do primeiro grupo, utilizando anticorpo policlonal anti-PrP^C, que reconhece da mesma forma a proteína murina e a humana. 1-N2a não transfectada; 2- GFP; 3- GFP-PrP^C WT/129M; 4- WT/129V; 5- 129M/180I; 6-129V/180I; 7-129M/183A; 8- 129V/183A; 9-129M/200K; 10- 129V/200K.

Figura 13 - Expressão basal das construções transfectadas nos clones selecionados.

4.4.2 Ensaio de internalização induzida por Cu²⁺

A indução de internalização de PrP^C presente na superfície celular é uma abordagem simples para verificação da funcionalidade das construções GFP-PrP^C (LEE et al., 2001). Como podemos observar na Figura 14, todas as construções avaliadas foram internalizadas após adição de íons Cu²⁺. Esta avaliação não foi possível de ser realizada com as construções

apresentando a mutação T183A, uma vez que elas não foram detectadas na superfície celular.



Legenda: Imagens de microscopia confocal mostrando o processo de internalização das construções GFP-PrP^C na membrana plasmática em 0 min (B), 5 min (C) e 10 min (D) após a adição de Cu²⁺. A: luz transmitida; B-D: GFP.

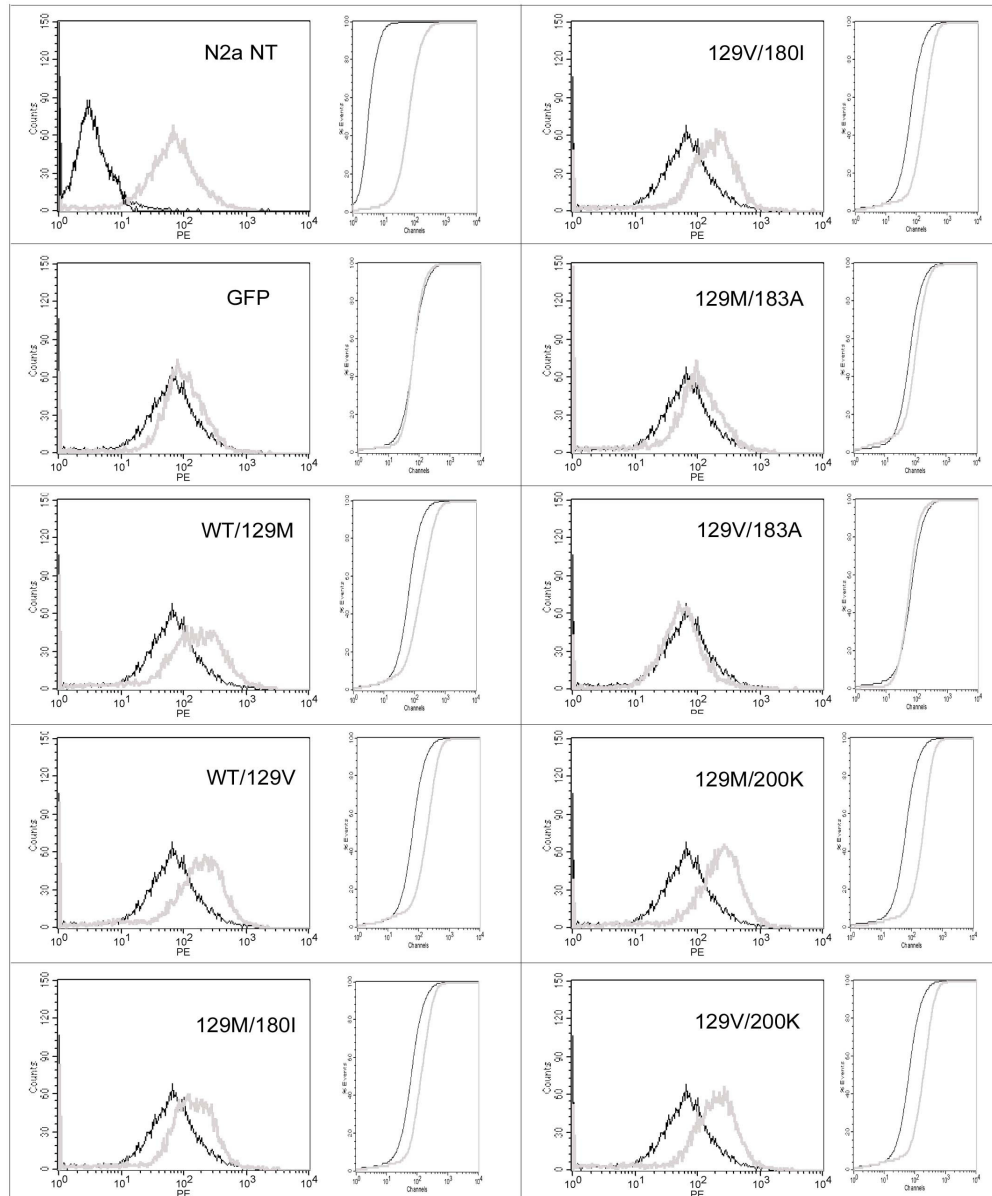
Figura 14 – Internalização induzida por Cu²⁺ nos clones expressando as construções de PrP^C.

4.4.3 Avaliação do nível de expressão das construções de PrP^C na superfície celular por citometria de fluxo

Foram realizados ensaios de citometria de fluxo com marcação indireta de ficoeritrina (PE) nas células não permeabilizadas, utilizando o anticorpo policlonal M235. Para isso foram selecionados os clones 1 de cada tipo de construção de PrP^C (ver Figura 12 e Tabela 4). A Figura 15 mostra, à esquerda, os histogramas representativos destes ensaios e, à direita, os gráficos representativos do teste K-S (Kolmogorov-Smirnov) realizado para a comparação entre a população controle e as que expressam as diferentes construções. Em ensaios de citometria de fluxo, o teste K-S de duas amostras é utilizado para comparar duas curvas em histogramas sobrepostos, onde é avaliada a frequência de distribuição de pontos em cada curva, encontrando a maior diferença entre as duas curvas (D). Assim, podemos dizer que o valor estatístico D é a maior diferença entre intensidade de fluorescência de duas populações, com probabilidade de erro menor que 0,1% ($p < 0,001$).

A Tabela 5 mostra a média de três experimentos distintos das intensidades de fluorescência (médias geométricas dos histogramas) normalizadas em relação a um controle de células N2a não transfectadas e incubadas com o mesmo anticorpo. Como se vê, os clones GFP-PrP^C WT/129M, WT/129V, 129M/180I, 129V/180I, 129M/200K, 129V/200K apresentam expressão relativamente homogênea entre si (intensidade de fluorescência de 2,11 a 2,73 vezes maior do que o controle). Ainda, mostramos que os clones de células, em comparação com o controle,

expressam mais PrP^C na superfície, com uma diferença máxima de 38% ($D=0,38$) a 52% ($D=0,52$), indicando também que não há superexpressão da proteína nestes clones.



Legenda: Histogramas representativos de ensaios de citometria de fluxo detectando o deslocamento dos picos de PrP^C exógeno (linha cinza) com relação a célula N2a não transfectada (linha preta). À direita dos histogramas, gráficos gerados pelo teste K-S.

Figura 15 - Expressão de PrP^C exógeno nos clones do grupo 1.

Tabela 5 – Médias de intensidade de fluorescência do primeiro grupo de clones (Grupo 1).

	Intensidade de fluorescência média (valores relativos)	<i>D</i> ($p < 0,01$)
N2a	1,00	0,94*
GFP	1,12	0,16
WT/129M	2,11	0,38
WT/129V	2,76	0,52
129M/180I	2,08	0,38
129V/180I	2,06	0,45
129M/183A	1,07	0,14
129V/183A	0,76	0,18
129M/200K	2,66	0,52
129V/200K	2,01	0,44

* Valor obtido com a comparação da célula N2a marcada com anticorpo M235 em relação à mesma célula sem marcação.

Não foi possível avaliar por esta abordagem a expressão da proteína mutante dos clones expressando GFP-PrP^C 129M/183A e 129V/183A, uma vez que, no caso desta mutação, a proteína não é localizada na superfície celular.

Os clones 2 de cada construção (ver Figura 12 e Tabela 4) não foram analisados com o uso de anticorpos anti-PrP^C, mas os dados das Figuras 12 e 13 bem como da Tabela 5 sugerem que existe uma expressão similar tanto entre os clones 1 e 2 como entre as diferentes construções de PrP^C.

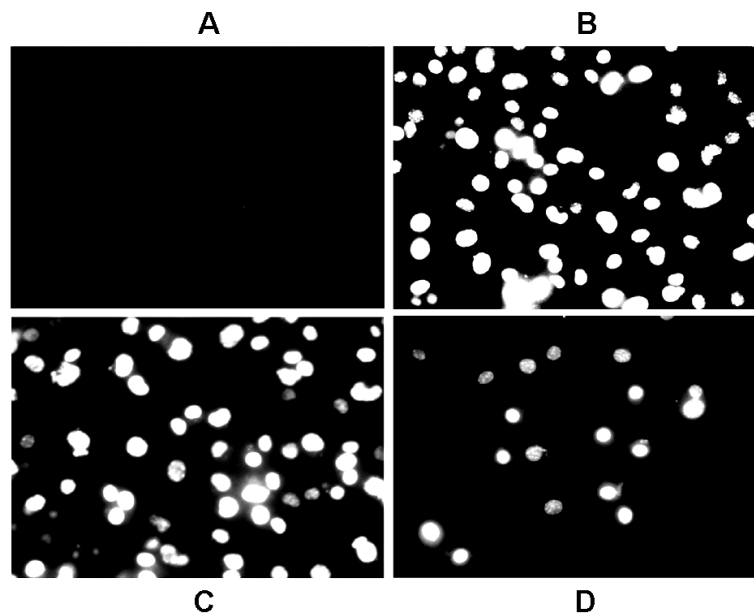
4.4.4 Ensaios de migração celular

4.4.4.1 Clones 1 e 2 de cada construção selecionados por diluição limitante

Os ensaios de migração foram feitos utilizando células N2a não transfectadas sobre o substrato de BSA (controle negativo) e sobre LN

(controle positivo) para cada clone de células transfectadas. Estas ultimas foram ensaiadas apenas na presença de LN. Uma imagem representativa do ensaio está apresentada na Figura 16.

Os resultados de todos os ensaios estão expressos de maneira normalizada com relação aos clones de GFP. Acreditamos que este seja o melhor controle de migração, já que são células N2a que foram transfectadas com o vetor para a expressão de GFP, mas que não expressam PrP^C exógeno. Para análise estatística, utilizamos como parâmetro de comparação a migração ocorrida nos clones transfectados com a construção que expressa o PrP^C protótipo WT/129M.



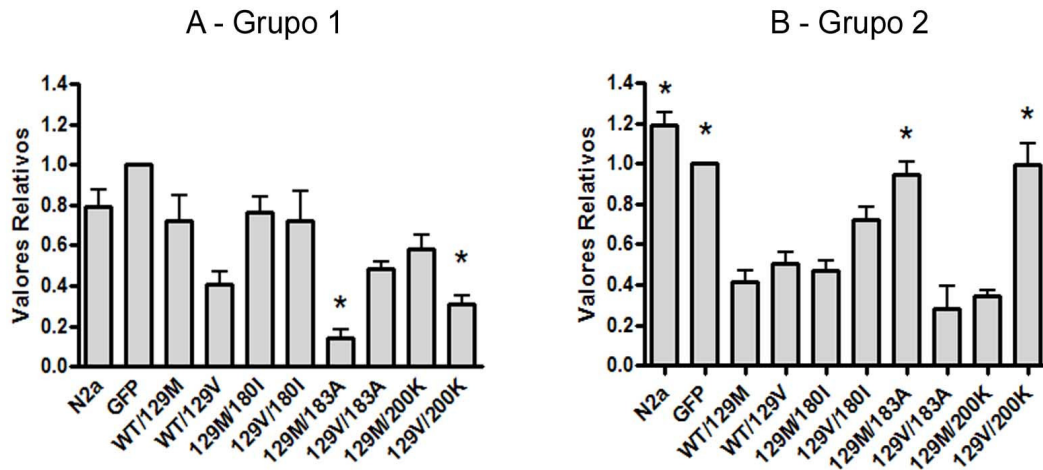
Legenda: Imagem capturada sob microscopia de luz UV de um campo da membrana porosa da Câmara de Boyden (aumento 40X) com células coradas com DAPI. A, N2a não transfectada sobre BSA (controle negativo); B, N2a não transfectada sobre LN (controle positivo); C, GFP-PrP^C WT/129M (clone 1) e D, GFP-PrP^C 129V/200K (clone 1).

Figura 16 - Imagem representativa do ensaio de migração.

Os resultados dos ensaios dos clones 1 estão mostrados na Figura 17A. A primeira observação interessante foi a de que a adição de PrP^C do tipo selvagem com o polimorfismo 129M ou 129V não alterou a taxa de migração. A expressão da mutação 180I associada com M ou V no códon 129 também não modificou a migração celular. Por outro lado, a presença dos mutantes 183A associado a 129M e de 200K associado a 129V causou uma inibição na migração celular mediada por laminina.

Para confirmar estes resultados, realizamos experimentos com os clones do grupo 2 (Figura 17B). Surpreendentemente, observamos uma inibição na migração dos clones expressando as proteínas do tipo selvagem (WT/129M e WT/129V), bem como os mutantes 129M/180I, 129V/183A e 129M/200K. Ainda mais intrigante foi a observação de que, neste caso, as células expressando GFP-PrP^C 129M/183A e GFP-PrP^C 129V/200K mantiveram os níveis basais de migração, ao contrário do que aconteceu com os clones do grupo 1 expressando os respectivos mutantes de PrP^C.

Uma vez que os clones expressam concentrações de PrP^C exógeno semelhante aos níveis da proteína endógena, descartamos que a superexpressão da proteína exógena pudesse ser responsável pelos resultados discrepantes nos ensaios de migração. Assim, a próxima hipótese levantada foi a de que os resultados não estavam refletindo a presença ou ausência de mutação em PrP^C, e sim algum evento clonal específico dos clones avaliados.



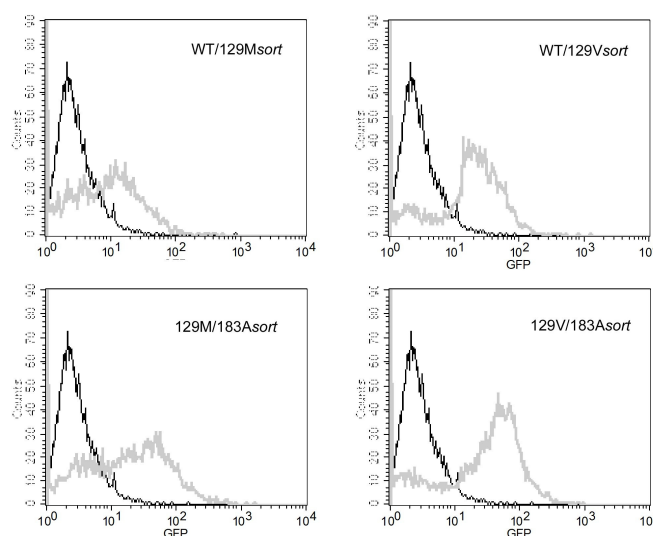
Legenda: Em A, clones do grupo 1e em B, clones do grupo 2. Os valores das médias do número de células por campo foram normalizados com relação ao clone expressando o vetor vazio (GFP). * $p < 0,05$ comparados ao clone WT/129M.

Figura 17 – Quantificação dos ensaios de migração com os clones de N2a dos grupos 1 e 2.

4.4.4.2 Uso de “cell sorting” para o isolamento de “pools” celulares expressando as construções de interesse.

A solução encontrada para contornar o problema do efeito clonal foi, a partir das populações heterogêneas iniciais, selecionar através de “cell sorting” uma população com expressão homogênea das diferentes construções de GFP-PrP^C.

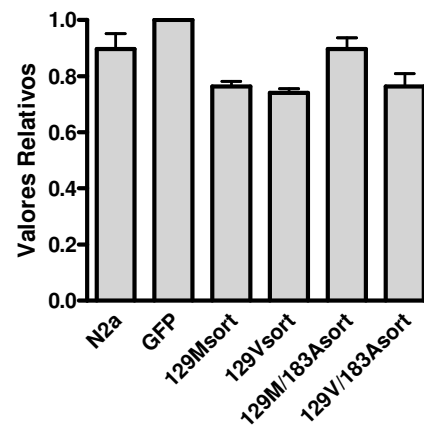
Foi possível isolar populações homogêneas de N2a expressando GFP-PrP^C WT/129M, WT/129V, 129M/183A e 129V/183A (Figura 18).



Legenda: Histogramas representativos de ensaio de citometria de fluxo mostrando curvas de expressão de GFP nas populações selecionadas por FACS. Linha preta: N2a não transfectadas; linha cinza: população selecionada.

Figura 18 - Expressão de GFP-PrP^C nas populações selecionadas por FACS.

Os resultados dos ensaios de migração realizados com estas populações são mostrados na Figura 19. Como controle, utilizamos, além da célula N2a não transfectada, o clone de GFP que faz parte do grupo 1. Podemos observar que nem a proteína do tipo selvagem, nem o mutante T183A afetaram a capacidade de migração das células, independente do polimorfismo no códon 129. Este resultado sugere que, de fato, nos experimentos realizados com os clones (Figura 17) as diferenças nas taxas de migração ocorreram devido ao efeito clonal. Como apenas tivemos acesso à técnica de “cell sorting” nos últimos meses deste trabalho, infelizmente não houve tempo hábil para ampliar estes experimentos para as outras populações mutantes.



Legenda: Os valores das médias de número de células por campo foram normalizados com relação ao clone expressando o vetor vazio (GFP).

Figura 19 - Quantificação dos ensaios de migração com as populações selecionadas por FACS.

5 DISCUSSÃO

Desde a identificação do gene que codifica a proteína prion celular, até o ano de 2004 haviam sido descritas 55 mutações patogênicas e 16 polimorfismos em *PRNP*, sendo que este número ainda está crescendo. A maior parte dos trabalhos que estudam mutações em *PRNP* estão focados na biossíntese e processamento das proteínas mutadas, avaliando seu potencial em ser convertidas em PrP^{res}. Até o momento não encontramos trabalhos em que avalia-se a influência destas mutações sobre a função biológica de PrP^C.

Parece que, apesar da crescente aceitação da hipótese de perda de função da proteína como sendo a causa de algumas doenças priônicas, ainda é mais comum a idéia de que o principal causador das doenças é o acúmulo da isoforma insolúvel, tóxica, nas células.

No entanto, até hoje não foi provado que o agente causador da doença seja composto somente por PrP^{res}. De fato, é provável que outras moléculas são necessárias para a propagação do prion, participando como componentes ou cofatores na conversão de PrP^C em PrP^{res} (revisado por CAUGHEY e BARON, 2006). Ainda, PrP^C pode ser um mediador da neurotoxicidade de PrP^{res}, destacando a importância de investigar como a função normal de PrP^C pode estar corrompida nas TSEs.

Desta forma, fica clara a relevância deste trabalho ao estudar como uma função normal de PrP^C pode ser afetada na presença de mutações patogênicas no gene *PRNP*. Para tal estudo, foram geradas construções

GFP-PrP^C apresentando as mutações V180I, T183A ou E200K, associadas à CJD, a mais freqüente TSE hereditária. Ainda, as mutações foram associadas ao polimorfismo no códon 129, que tem papel importante no fenótipo de algumas doenças priônicas e também relacionado à susceptibilidade à vCJD. Além disso, estas mutações estão localizadas dentro ou próximas ao sítio de interação à laminina, descrita pelo nosso grupo como sendo essencial no fenômeno de diferenciação neuronal (GRANER et al., 2000a; GRANER et al., 2000b).

A utilização da proteína prion celular fusionada à GFP, aliada à microscopia confocal, possibilita a observação das células vivas, sem necessidade de fixação ou marcação indireta. Desta forma, torna possível a avaliação tanto da localização subcelular das construções mutantes, quanto sua funcionalidade no que se refere à capacidade de ser internalizada em resposta à adição de íons cobre ao meio de cultura. A fusão de GFP a PrP^C não interfere em sua biossíntese, processamento ou capacidade de ser internalizada, como já descrito anteriormente em outros trabalhos do grupo (LEE et al., 2001; MAGALHAES et al., 2002).

5.1 ANÁLISE DE DISTRIBUIÇÃO CELULAR DAS MOLÉCULAS DE PRP^C MUTADAS

As construções GFP-PrP^C do tipo selvagem (WT/129M, WT/129V), assim como as mutantes 129M/180I, 129V/180I, 129M/200K e 129V/200K estão corretamente distribuídas na célula, estando localizadas na membrana

plasmática e na região perinuclear. Estas observações não haviam sido feitas até então para o mutante V180I. Em um trabalho de Lehmann e Harris (1996) apenas são citados dados não publicados de que o mutante E200K está associado à membrana plasmática (LEHMANN e HARRIS, 1996). Ainda, nenhum trabalho associa as mutações ao polimorfismo do códon 129.

Já o mutante T183A, independente do códon polimórfico 129 associado, não vai para a superfície celular, ficando apenas na região perinuclear. Diversos trabalhos relatam a ausência total ou parcial desta proteína mutante na superfície celular, sendo que todos os trabalhos estudam a proteína murina. Enquanto alguns trabalhos revelaram a ausência de expressão do PrP^C 183A na superfície celular em células CHO, CV1 e N2a (KORTH et al., 2000; LEHMANN e HARRIS, 1997; ROGERS et al., 1990), outros observaram a presença deste mutante na superfície de células N2a e FRT (*Fisher rat thyroid*, tireóide de rato) transfectadas estavelmente e subclonadas, além de fibroblastos murinos não clonados (CAMPANA et al., 2006; NEUENDORF et al., 2004). Campana, no entanto, detecta apenas um sinal fraco na superfície através de imunohistoquímica em células não permeabilizadas, enquanto em células permeabilizadas há um forte sinal intracelular difuso. Estas discrepâncias podem ter sido causadas devido às diferentes técnicas utilizadas. Neuendorf e colaboradores (2004) sugerem que nos casos em que a proteína foi detectada na superfície, poderia ser devido a sua superexpressão, exaurindo a maquinaria de tráfego de proteínas e resultando no acúmulo da proteína que normalmente seria

degradada pelo proteassoma. No nosso estudo a proteína mutante T183A expressa em células SN56 transfectadas transitoriamente, bem como nos clones de N2a, nunca foi detectada na superfície das células. Mais recentemente, contradizendo a possível presença de PrP^C T183A na superfície celular, ainda que em condições artificiais, Kiachopoulos e colaboradores (KIACHOPOULOS et al., 2005) descreveram que a mutação T183A impede a ligação da âncora de GPI a PrP^C e hipotetizam que este defeito na maturação é causado pela desestabilização do “core” hidrofóbico pela mutação.

O trabalho de Campana et al. mostra que o mutante T183A intracelular colocaliza com um marcador de retículo endoplasmático, sugerindo que a retenção no RE possa estar envolvida na degradação eficiente das isoformas incorretamente dobradas da proteína.

Diversas glicoproteínas necessitam da N-glicosilação intacta para sua expressão na superfície celular (GARCIA et al., 1995; MCFARLANE et al., 2000; OLIVARES et al., 1995; ROBERTS et al., 1998). A proteína prion celular possui duas seqüências consenso para N-glicosilação (NXT) que são conservadas entre todas as espécies (VAN et al., 2003) e em humanos localizam-se nos aminoácidos 181 e 197. Estes sítios são variavelmente glicosilados *in vivo*, de modo que são observadas formas mono-, di- e não-glicosilada (RUDD et al., 1999; STIMSON et al., 1999). Diversos trabalhos investigaram o possível papel da glicosilação na localização subcelular de PrP^C, e diferentes resultados foram mostrados. Em geral, a forma não-glicosilada de PrP^C não é detectada na superfície celular, permanecendo

presa no citoplasma (DEARMOND et al., 1997; LEHMANN e HARRIS, 1997; ROGERS et al., 1990). No entanto, outros trabalhos detectam a forma não-glicosilada na superfície de diferentes linhagens celulares quando transfectadas com alguns dos mutantes no sítio de glicosilação (KORTH et al., 2000; NEUENDORF et al., 2004). Isso sugere que a mutação no aminoácido, e não a falta de glicosilação, pode influenciar o destino intracelular de PrP^C. Ainda, foi demonstrado que PrP^C sem oligossacarídeos complexos após o tratamento com geldanamicina é localizado na superfície celular (WINKLHOFER et al., 2003), sugerindo que PrP^C pode trafegar na célula independente da presença de açúcares maduros, mais uma indicação de que a mutação no códon 183 é a responsável pela retenção da proteína no retículo endoplasmático.

A mutação T183A destrói o primeiro sítio acceptor de N-glicosilação. Apesar de não termos feito aqui uma análise específica do padrão de glicosilação, podemos observar que, no caso do haplótipo 129V/183A, parece haver alguma modificação neste padrão, o que não observamos para o haplótipo 129M/183A. Isto é curioso, uma vez que os trabalhos da literatura utilizam a mutação T183A não associada ao polimorfismo no códon 129 para descrever que esta mutação afeta o padrão de glicosilação, abolindo a forma diglicosilada da proteína (CAMPANA et al., 2006; KIACHOPOULOS et al., 2005; NEUENDORF et al., 2004). Devemos salientar, no entanto, que as nossas observações sobre o padrão de glicosilação são apenas sugestões, uma vez que não foi realizado nenhum ensaio enzimático de deglicosilação específico a fim de nos certificarmos de

que as diferentes bandas vistas próximas a altura esperada para GFP-PrP^C são realmente as distintas formas di-, mono- e não-glicosiladas da proteína. Assim, a aparente glicosilação normal de PrP^C 129M/183A pode ser um artefato e uma avaliação mais minuciosa deverá ser realizada.

No caso das mutações V180I e E200K, a glicosilação normal já foi descrita previamente, apesar da primeira estar localizada próximo a um dos sítios de glicosilação (CHASSEIGNEAUX et al., 2006; ROSENMANN et al., 2001).

5.2 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DAS PROTEÍNAS MUTANTES

Para a avaliação funcional das proteínas mutantes, as construções GFP-PrP^C foram transfectadas em células da linhagem N2a, que foram selecionadas com geneticina gerando populações com expressão heterogênea das proteínas de interesse, de onde foram selecionados clones através do método de diluição limitante. Estes clones foram utilizados em ensaios internalização e de migração celular.

As observações divergentes nos ensaios de migração realizados com dois clones diferentes para cada construção nos levaram a sugerir a existência de alteração no padrão de migração celular em decorrência de um efeito clonal. Ou seja, alguns destes clones parecem ter sido gerados a partir de uma célula que apresentava alguma disfunção que foi refletida na sua capacidade migratória.

Os ensaios realizados com as populações selecionadas através de FACS não mostraram diferença nas taxas de migração entre as populações GFP-PrP^C do tipo selvagem e as mutantes T183A, independente da presença do polimorfismo no códon 129.

Não seria esperado que a proteína contendo a mutação T183A tivesse influência direta no processo de migração celular, uma vez que não está localizada na membrana plasmática. Porém, a observação de que a adição de mais moléculas de PrP^C do tipo selvagem à membrana não foi capaz de aumentar a taxa de migração de células N2a pode significar que PrP^C tem participação menos efetiva nos processos de migração se comparado a outros ligantes de laminina como as integrinas.

Haptotaxia é a motilidade direcional ou projeção de células (como projeção axonal, por exemplo) contra um gradiente de sítios de adesão celular ou quimioatrativos ligados a um substrato. Estes gradientes estão naturalmente presentes na matriz extracelular ou podem ser estabelecidos artificialmente pela alteração da concentração de sítios de adesão em um substrato (CARTER, 1967). O conceito de migração celular envolve um ciclo de diversos passos altamente coordenados e regulados. Em resposta a diversos estímulos migratórios, o movimento direcional é iniciado quando, na frente da célula, a polimerização de actina direciona uma protusão da membrana, que é estabilizada pela ligação à matriz extracelular (MEC). Complexos de adesão mediados por *integrinas*, que não apenas ligam a MEC ao citoesqueleto de actina, como funcionam como centros de

transdução de sinal, modulam a migração celular (FRANCO e HUTTENLOCHER, 2005).

O estímulo migratório utilizado nos nossos ensaios foi a laminina, uma proteína de matriz extracelular, cuja ligação com PrP^C poderia ser afetada pelas mutações localizadas dentro ou próximas ao sítio de interação.

As integrinas, por sua vez, são uma família de glicoproteínas de superfície celular envolvidas em diversas funções celulares relacionadas à adesão das células à MEC. As interações mediadas por integrinas influenciam diversos aspectos do comportamento celular, como morfologia, adesão, migração e proliferação. A importância fundamental de integrinas é de formar a conexão entre a MEC no exterior da célula com o citoesqueleto no interior (COPPOLINO e DEDHAR, 2000).

A presença nas balsas lipídicas de integrinas (DECKER e FFRENCH-CONSTANT, 2004), de proteínas GPI ancoradas como PrP^C e de proteínas transmembrânicas, quinases da família Src, entre outras (SIMONS e TOOMRE, 2000), sugere um papel importante destes microdomínios de membrana em processos de sinalização celular. Assim, pode-se imaginar que a laminina ligue-se tanto a PrP^C quanto a integrinas nestas balsas, ativando cascatas de sinalização distintas mas que podem convergir.

NCAM L1 potencializa a migração de células neurais através de sua interação com integrinas, ativando sinalização por MAPK, PI3K e Src (THELEN et al., 2002). Dentro deste contexto, a adição de PrP^C do tipo selvagem à membrana pode não ter influenciado a migração porque as vias de sinalização envolvidas neste processo poderiam estar saturadas tanto

pela presença de PrP^C endógeno quanto de integrinas. No entanto, com a observação de que alguns mutantes de PrP^C causam uma diminuição na taxa de migração (MACHADO, dissertação de Mestrado), pode-se argumentar que estas proteínas mutantes estariam impedindo a migração mediada pela interação entre a laminina e as integrinas nas células N2a.

Por causa desta grande influência da interação integrina-LN no processo de migração celular, outras abordagens devem ser realizadas a fim de melhor avaliar o impacto das mutações na função normal da proteína prion celular, além das vias de sinalização envolvidas nestes processos.

6 CONCLUSÕES

- As quimeras mutantes GFP-PrP^C 129M/180I, 129V/180I, 129M/200K e 129V/200K, assim como as do tipo selvagem GFP-PrP^C WT/129M e WT/129V são corretamente direcionadas para a membrana plasmática;
- As quimeras GFP-PrP^C 129M/183A e 129V/183A estão localizadas na região perinuclear, previamente descrito na literatura como correspondente ao retículo endoplasmático;
- As construções se mostraram funcionais – com exceção do mutante T183A, por não se localizar na superfície celular – em ensaio de internalização induzida por íons Cu²⁺ realizado com os clones;
- As proteínas PrP^C do tipo selvagem e aquelas expressando as mutações 129M/183A e 129V/183A quando expressas em células N2a não alteram o processo de migração celular mediado por LN.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguzzi A e Haass C. Games played by rogue proteins in prion disorders and Alzheimer's disease. **Science** 2003; 302:814-818.

Aguzzi A e Polymenidou M. Mammalian prion biology: One century of evolving concepts. **Cell** 2004; 116:313-327.

Ausubel, FM, Brent, R, Kingston, RE, Moore, DD, Seidman, JD, Smith, JA, and Struhl K. New York: Wiley Interscience; 1993.

Barbosa J, Jr., Ferreira LT, Martins-Silva C, Santos MS, Torres GE, Caron MG, Gomez MV, Ferguson SS, Prado MA, Prado VF. Trafficking of the vesicular acetylcholine transporter in SN56 cells: a dynamin-sensitive step and interaction with the AP-2 adaptor complex. **J. Neurochem.** 2002; 82:1221-1228.

Barry RA e Prusiner SB. Monoclonal antibodies to the cellular and scrapie prion proteins. **J. Infect. Dis.** 1986; 154:518-521.

Beck K, Hunter I, Engel J. Structure and Function of Laminin - Anatomy of A Multidomain Glycoprotein. **Faseb Journal** 1990; 4:148-160.

Bennion BJ e Daggett V. Protein conformation and diagnostic tests: the prion protein. **Clin. Chem.** 2002; 48:2105-2114.

Blusztajn JK, Venturini A, Jackson DA, Lee HJ, Wainer BH. Acetylcholine synthesis and release is enhanced by dibutyryl cyclic AMP in a neuronal cell line derived from mouse septum. **J. Neurosci.** 1992; 12:793-799.

Brandner S, Isenmann S, Raeber A, Fischer M, Sailer A, Kobayashi Y, Marino S, Weissmann C, Aguzzi A. Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. **Nature** 1996; 379:339-343.

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

Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, von Bohlen A, Schulz-Schaeffer W, Giese A, Westaway D,

Kretzschmar H. The cellular prion protein binds copper in vivo. **Nature** 1997; 390:684-687.

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

Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. **Cell** 1993; 73:1339-1347.

Campana V, Sarnataro D, Fasano C, Casanova P, Paladino S, Zurzolo C. Detergent-resistant membrane domains but not the proteasome are involved in the misfolding of a PrP mutant retained in the endoplasmic reticulum. **J. Cell Sci.** 2006; 119:433-442.

Carter SB. Haptotaxis and the mechanism of cell motility. **Nature** 1967; 213:256-260.

Caughey B e Baron GS. Prions and their partners in crime. **Nature** 2006; 443:803-810.

Caughey B, Race RE, Ernst D, Buchmeier MJ, Chesebro B. Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. **J. Virol.** 1989; 63:175-181.

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

Chandler RL. Encephalopathy in Mice Produced by Inoculation with Scrapie Brain Material. **Lancet** 1961; 1:1378-&.

Chapman J, Ben-Israel J, Goldhammer Y, Korczyn AD. The risk of developing Creutzfeldt-Jakob disease in subjects with the PRNP gene codon 200 point mutation. **Neurology** 1994; 44:1683-1686.

Chasseigneaux S, Haik S, Laffont-Proust I, De MO, Lenne M, Brandel JP, Hauw JJ, Laplanche JL, Peoc'h K. V180I mutation of the prion protein gene associated with atypical PrPSc glycosylation. **Neurosci. Lett.** 2006; 408:165-169.

Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. **EMBO J.** 2002; 21:3317-3326.

Coitinho AS, Freitas AR, Lopes MH, Hajj GN, Roesler R, Walz R, Rossato JI, Cammarota M, Izquierdo I, Martins VR, Brentani RR. The interaction between prion protein and laminin modulates memory consolidation. **Eur. J. Neurosci.** 2006; 24:3255-3264.

Colling SB, Collinge J, Jefferys JGR. Hippocampal slices from prion protein null mice: Disrupted Ca^{2+} -activated K^{+} currents. **Neurosci. Lett.** 1996; 209:49-52.

Colling SB, Khana M, Collinge J, Jefferys JG. Mossy fibre reorganization in the hippocampus of prion protein null mice. **Brain Res.** 1997; 755:28-35.

Collinge J, Palmer MS, Dryden AJ. Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. **Lancet** 1991; 337:1441-1442.

Collinge J, Whittington MA, Sidle KCL, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR, Jefferys JGR. Prion Protein Is Necessary for Normal Synaptic Function. **Nature** 1994; 370:295-297.

Colombo R. Age and origin of the PRNP E200K mutation causing familial Creutzfeldt-Jacob disease in Libyan Jews. **Am. J. Hum. Genet.** 2000; 67:528-531.

Coppolino MG e Dedhar S. Bi-directional signal transduction by integrin receptors. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 2000; 32:171-188.

D'Alessandro M, Petraroli R, Ladogana A, Pocchiari M. High incidence of Creutzfeldt-Jakob disease in rural Calabria, Italy. **Lancet** 1998; 352:1989-1990.

DeArmond SJ, Sanchez H, Yehiely F, Qiu Y, Ninchak-Casey A, Daggett V, Camerino AP, Cayetano J, Rogers M, Groth D, Torchia M, Tremblay P, Scott MR, Cohen FE, Prusiner SB. Selective neuronal targeting in prion disease. **Neuron** 1997; 19:1337-1348.

Decker L e French-Constant C. Lipid rafts and integrin activation regulate oligodendrocyte survival. **J. Neurosci.** 2004; 24:3816-3825.

Doh-ura K, Kitamoto T, Sakaki Y, Tateishi J. CJD discrepancy. **Nature** 1991; 353:801-802.

Doh-ura K, Tateishi J, Sasaki H, Kitamoto T, Sakaki Y. Pro----leu change at position 102 of prion protein is the most common but not the sole mutation related to Gerstmann-Straussler syndrome. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1989; 163:974-979.

Fournier JG, Escaig-Haye F, de Villemeur TB, Robain O, Lasmezas CI, Deslys JP, Dormont D, Brown P. Distribution and submicroscopic immunogold localization of cellular prion protein (PrPc) in extracerebral tissues. **Cell and Tissue Research** 1998; 292:77-84.

Franco SJ e Huttenlocher A. Regulating cell migration: calpains make the cut. **J. Cell Sci.** 2005; 118:3829-3838.

Gabriel J-M, Oesch B, Kretzschmar H, Scott M, Prusiner SB. Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 1992; 89:9097-9101.

Garcia RC, Cundell DR, Tuomanen EI, Kolakowski LF, Jr., Gerard C, Gerard NP. The role of N-glycosylation for functional expression of the human platelet-activating factor receptor. Glycosylation is required for efficient membrane trafficking. **J. Biol. Chem.** 1995; 270:25178-25184.

Gasset M, Baldwin MA, Lloyd DH, Gabriel JM, Holtzman DM, Cohen F, Fletterick R, Prusiner SB. Predicted Alpha-Helical Regions of the Prion Protein When Synthesized As Peptides Form Amyloid. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 1992; 89:10940-10944.

Goldfarb LG, Brown P, Mitrova E, Cervenakova L, Goldin L, Korczyn AD, Chapman J, Galvez S, Cartier L, Rubenstein R, . Creutzfeldt-Jacob disease associated with the PRNP codon 200Lys mutation: an analysis of 45 families. **Eur. J. Epidemiol.** 1991; 7:477-486.

Goldfarb LG, Korczyn AD, Brown P, Chapman J, GAJDUSEK DC. Mutation in codon 200 of scrapie amyloid precursor gene linked to Creutzfeldt-Jakob disease in Sephardic Jews of Libyan and non-Libyan origin. **Lancet** 1990; 336:637-638.

Goldfarb LG, Petersen RB, Tabaton M, Brown P, LeBlanc AC, Montagna P, Cortelli P, Julien J, Vital C, Pendelbury WW, . Fatal familial insomnia and

familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. **Science** 1992; 258:806-808.

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. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. **Brain Res. Mol. Brain Res.** 2000a; 76:85-92.

Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Martins VR, Jay DG, Brentani RR. Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. **FEBS Lett.** 2000b; 482:257-260.

Hajj, GN. **A proteína prion celular e seus ligantes-Vitronectina, STI1 e Laminina- nos mecanismos de plasticidade neuronal.** São Paulo; 2004. [Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo - Instituto de Química]

Harris DA, Falls DL, Johnson FA, Fischbach GD. A Prion-Like Protein from Chicken Brain Copurifies with An Acetylcholine Receptor-Inducing Activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 1991; 88:7664-7668.

Herms JW, Korte S, Gall S, Schneider I, Dunker S, Kretschmar HA. Altered intracellular calcium homeostasis in cerebellar granule cells of prion protein-deficient mice. **J. Neurochem.** 2000; 75:1487-1492.

Hetz C, Maundrell K, Soto C. Is loss of function of the prion protein the cause of prion disorders? **Trends Mol. Med.** 2003; 9:237-243.

Horiuchi M, Yamazaki N, Ikeda T, Ishiguro N, Shinagawa M. A Cellular-Form of Prion Protein (Prpc) Exists in Many Nonneuronal Tissues of Sheep. **J. Gen. Virol.** 1995; 76:2583-2587.

Hornshaw MP, Mcdermott JR, Candy JM. Copper-Binding to the N-Terminal Tandem Repeat Regions of Mammalian and Avian Prion Protein. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 1995; 207:621-629.

Hsiao K, Baker HF, Crow TJ, Poulter M, Owen F, Terwilliger JD, Westaway D, Ott J, Prusiner SB. Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. **Nature** 1989; 338:342-345.

Ironside JW, Ritchie DL, Head MW. Phenotypic variability in human prion diseases. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.** 2005; 31:565-579.

Jackson GS e Collinge J. The molecular pathology of CJD: old and new variants. **Mol. Pathol.** 2001; 54:393-399.

Jin K, Shiga Y, Shibuya S, Chida K, Sato Y, Konno H, Doh-ura K, Kitamoto T, Itoyama Y. Clinical features of Creutzfeldt-Jakob disease with V180I mutation. **Neurology** 2004; 62:502-505.

Kaneko K, Vey M, Scott M, Pilkuhn S, Cohen FE, Prusiner SB. COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 1997; 94:2333-2338.

Keshet GI, Ovadia H, Taraboulos A, Gabizon R. Scrapie-infected mice and PrP knockout mice share abnormal localization and activity of neuronal nitric oxide synthase. **J. Neurochem.** 1999; 72:1224-1231.

Kiachopoulos S, Bracher A, Winklhofer KF, Tatzelt J. Pathogenic mutations located in the hydrophobic core of the prion protein interfere with folding and attachment of the glycosylphosphatidylinositol anchor. **J. Biol. Chem.** 2005; 280:9320-9329.

Kim SJ e Hegde RS. Cotranslational partitioning of nascent prion protein into multiple populations at the translocation channel. **Mol. Biol. Cell.** 2002; 13:3775-3786.

Kitamoto T, Ohta M, Dohura K, Hitoshi S, Terao Y, Tateishi J. Novel Missense Variants of Prion Protein in Creutzfeldt-Jakob Disease Or Gerstmann-Straussler Syndrome. **Biochem Biophys Res Communications** 1993; 191:709-714.

Klamt F, Dal Pizzol F, da Frola MLC, Walz R, Andrades ME, da Silva EG, Brentani RR, Izquierdo I, Moreira JCF. Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. **Free Rad. Biol. Med.** 2001; 30:1137-1144.

Kong, Q, Surewicz, WK, Petersen, RB, Zou, W, Chen, SG, Gambetti, P, Parchi, P, Capellari, S, Goldfarb, L, Montagna, P, Lugaresi, E, Piccardo, P, e Ghetti, B. Inherited Prion Diseases. In: Prusiner, SB. **Prion Biology and Diseases**. 2nd edition. New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2004. p. 673-775.

Korth C, Kaneko K, Prusiner SB. Expression of unglycosylated mutated prion protein facilitates PrP(Sc) formation in neuroblastoma cells infected with different prion strains. **J. Gen. Virol.** 2000; 81:2555-2563.

Kovacs GG, Puopolo M, Ladogana A, Pocchiari M, Budka H, van DC, Collins SJ, Boyd A, Giulivi A, Coulthart M, asnerie-Laupretre N, Brandel JP, Zerr I, Kretzschmar HA, de Pedro-Cuesta J, Calero-Lara M, Glatzel M, Aguzzi A, Bishop M, Knight R, Belay G, Will R, Mitrova E. Genetic prion disease: the EUROCD experience. **Hum. Genet.** 2005; 118:166-174.

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

Lee HS, Sambuughin N, Cervenakova L, Chapman J, Pocchiari M, Litvak S, Qi HY, Budka H, del ST, Furukawa H, Brown P, GAJDUSEK DC, Long JC, Korczyn AD, Goldfarb LG. Ancestral origins and worldwide distribution of the PRNP 200K mutation causing familial Creutzfeldt-Jakob disease. **Am. J. Hum. Genet.** 1999; 64:1063-1070.

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

Lehmann S e Harris DA. Two mutant prion proteins expressed in cultured cells acquire biochemical properties reminiscent of the scrapie isoform. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A** 1996; 93:5610-5614.

Lehmann S e Harris DA. Blockade of glycosylation promotes acquisition of scrapie-like properties by the prion protein in cultured cells. **J. Biol. Chem.** 1997; 272:21479-21487.

Liebkind R, Laatikainen T, Liesi P. Is the soluble KDI domain of gamma 1 laminin a regeneration factor for the mammalian central nervous system? **J. Neurosci. Res.** 2003; 73:637-643.

Liemann S e Glockshuber R. Influence of amino acid substitutions related to inherited human prion diseases on the thermodynamic stability of the cellular prion protein. **Biochemistry** 1999; 38:3258-3267.

Liesi P, Laatikainen T, Wright JM. Biologically active sequence (KDI) mediates the neurite outgrowth function of the gamma-1 chain of laminin-1. **J. Neurosci. Res.** 2001; 66:1047-1053.

Lopes MH, Hajj GN, Muras AG, Mancini GL, Castro RM, Ribeiro KC, Brentani RR, Linden R, Martins VR. Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. **J. Neurosci.** 2005; 25:11330-11339.

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

Magalhaes AC, Baron GS, Lee KS, Steele-Mortimer O, Dorward D, Prado MA, Caughey B. Uptake and neuritic transport of scrapie prion protein coincident with infection of neuronal cells. **J. Neurosci.** 2005; 25:5207-5216.

Magalhaes AC, Silva JA, Lee KS, Martins VR, Prado VF, Ferguson SS, Gomez MV, Brentani RR, Prado MA. Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. **J. Biol. Chem.** 2002; 277:33311-33318.

Mallucci G, Dickinson A, Linehan J, Klohn PC, Brandner S, Collinge J. Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. **Science** 2003; 302:871-874.

Mallucci GR, Ratte S, Asante EA, Linehan J, Gowland I, Jefferys JGR, Collinge J. Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. **Embo Journal** 2002; 21:202-210.

Manson J, West JD, Thomson V, McBride P, Kaufman MH, Hope J. The Prion Protein Gene - A Role in Mouse Embryogenesis. **Development** 1992; 115:117-122.

Martins VR. A receptor for infectious and cellular prion protein. **Braz J Med Biol Res** 1999; 32:853-859.

Martins VR, Graner E, Garcia-Abreu J, de Souza SJ, Mercadante AF, Veiga SS, Zanata SM, Neto VM, Brentani RR. Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. **Nat. Med.** 1997; 3:1376-1382.

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; 512:25-28.

Masters CL, GAJDUSEK DC, Gibbs CJ, Jr. The familial occurrence of Creutzfeldt-Jakob disease and Alzheimer's disease. **Brain** 1981; 104:535-558.

Masters CL e Richardson EP. Sub-Acute Spongiform Encephalopathy (Creutzfeldt-Jakob Disease) - Nature and Progression of Spongiform Change. **Brain** 1978; 101:333-344.

McFarlane I, Breen KC, Di GL, Moya KL. Inhibition of N-glycan processing alters axonal transport of synaptic glycoproteins in vivo. **Neuroreport** 2000; 11:1543-1547.

Mironov A, Latawiec D, Wille H, Bouzamondo-Bernstein E, Legname G, Williamson RA, Burton D, DeArmond SJ, Prusiner SB, Peters PJ. Cytosolic prion protein in neurons. **Journal of Neuroscience** 2003; 23:7183-7193.

Mitrova E e Belay G. Creutzfeldt-Jakob disease with E200K mutation in Slovakia: characterization and development. **Acta Virol.** 2002; 46:31-39.

Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, Laplanche JL, Lehmann S, Launay JM, Kellermann O. Signal transduction through prion protein. **Science** 2000; 289:1925-1928.

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

Neuendorf E, Weber A, Saalmueller A, Schatzl H, Reifenberg K, Pfaff E, Groschup MH. Glycosylation deficiency at either one of the two glycan attachment sites of cellular prion protein preserves susceptibility to bovine spongiform encephalopathy and scrapie infections. **J. Biol. Chem.** 2004; 279:53306-53316.

Nicolet CM e Craig EA. Isolation and Characterization of Sti1, A Stress-Inducible Gene from *Saccharomyces-Cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology** 1989; 9:3638-3646.

Nitrini R, Rosemberg S, Passos-Bueno MR, da Silva LS, Iughetti P, Papadopoulos M, Carrilho PM, Caramelli P, Albrecht S, Zatz M, LeBlanc A. Familial spongiform encephalopathy associated with a novel prion protein gene mutation. **Ann. Neurol.** 1997; 42:138-146.

Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, . A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. **Cell** 1985; 40:735-746.

Oidtmann B, Simon D, Holtkamp N, Hoffmann R, Baier M. Identification of cDNAs from Japanese pufferfish (*Fugu rubripes*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) coding for homologues to tetrapod prion proteins. **Febs Letters** 2003; 538:96-100.

Olivares L, Aragon C, Gimenez C, Zafra F. The role of N-glycosylation in the targeting and activity of the GLYT1 glycine transporter. **J. Biol. Chem.** 1995; 270:9437-9442.

Oliveira MD, Souza LB, Pinto LP, Freitas RA. [Immunohistochemical study of components of the basement membrane in odontogenic cysts]. **Pesqui. Odontol. Bras.** 2002; 16:157-162.

Ovadia H, Rosenmann H, Shezen E, Halimi M, Ofra I, Gabizon R. Effect of scrapie infection on the activity of neuronal nitric-oxide synthase in brain and neuroblastoma cells. **Journal of Biological Chemistry** 1996; 271:16856-16861.

Owen F, Poulter M, Lofthouse R, Collinge J, Crow TJ, Risby D, Baker HF, Ridley RM, Hsiao K, Prusiner SB. Insertion in prion protein gene in familial Creutzfeldt-Jakob disease. **Lancet** 1989; 1:51-52.

Palmer MS, Dryden AJ, Hughes JT, Collinge J. Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. **Nature** 1991; 352:340-342.

Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Hunag Z, Fletterick RJ, Cohen FE, Prusiner SB. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 1993; 90:10962-10966.

Pauly PC e Harris DA. Copper stimulates endocytosis of the prion protein. **J. Biol. Chem.** 1998; 273:33107-33110.

Petchanikow C, Saborio GP, Anderes L, Frossard MJ, Olmedo MI, Soto C. Biochemical and structural studies of the prion protein polymorphism. **FEBS Lett.** 2001; 509:451-456.

Peters PJ, Mironov A, Peretz D, van Donselaar E, Leclerc E, Erpel S, DeArmond SJ, Burton DR, Williamson RA, Vey M, Prusiner SB. Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. **Journal of Cell Biology** 2003; 162:703-717.

Prusiner SB. Scrapie Prions. **Annual Review of Microbiology** 1989; 43:345-374.

Prusiner SB. Molecular-Biology of Prion Diseases. **Science** 1991; 252:1515-1522.

Prusiner SB. Prions. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A** 1998; 95:13363-13383.

Revesz T, Holton JL, Lashley T, Plant G, Rostagno A, Ghiso J, Frangione B. Sporadic and familial cerebral amyloid angiopathies. **Brain Pathology** 2002; 12:343-357.

Richardson EP e Masters CL. The Nosology of Creutzfeldt-Jakob-Disease and Conditions Related to the Accumulation of Prpcjd in the Nervous-System. **Brain Pathology** 1995; 5:33-41.

Roberts SJ, Petropavlovskaja M, Chung KN, Knight CB, Elwood PC. Role of individual N-linked glycosylation sites in the function and intracellular transport of the human alpha folate receptor. **Arch. Biochem. Biophys.** 1998; 351:227-235.

Rogers M, Taraboulos A, Scott M, Groth D, Prusiner SB. Intracellular accumulation of the cellular prion protein after mutagenesis of its Asn-linked glycosylation sites. **Glycobiology** 1990; 1:101-109.

Roos R, GAJDUSEK DC, Gibbs CJ, Jr. The clinical characteristics of transmissible Creutzfeldt-Jakob disease. **Brain** 1973; 96:1-20.

Rosenmann H, Talmor G, Halimi M, Yanai A, Gabizon R, Meiner Z. Prion protein with an E200K mutation displays properties similar to those of the cellular isoform PrP(C). **J. Neurochem.** 2001; 76:1654-1662.

Rudd PM, Endo T, Colominas C, Groth D, Wheeler SF, Harvey DJ, Wormald MR, Serban H, Prusiner SB, Kobata A, Dwek RA. Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A** 1999; 96:13044-13049.

Rudd PM, Merry AH, Wormald MR, Dwek RA. Glycosylation and prion protein. **Current Opinion in Structural Biology** 2002; 12:578-586.

Sales N, Hassig R, Rodolfo K, Di Giamberardino L, Traiffort E, Ruat M, Fretier P, Moya KL. Developmental expression of the cellular prion protein in elongating axons. **Eur. J. Neurosci.** 2002; 15:1163-1177.

Shmerling D, Hegyi I, Fischer M, Blattler T, Brandner S, Gotz J, Rulicke T, Flechsig E, Cozzio A, von Mering C, Hangartner C, Aguzzi A, Weissmann C. Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. **Cell** 1998; 93:203-214.

Shyng SL, Huber MT, Harris DA. A Prion Protein Cycles Between the Cell-Surface and An Endocytic Compartment in Cultured Neuroblastoma-Cells. **Journal of Biological Chemistry** 1993; 268:15922-15928.

Simonic T, Duga S, Strumbo B, Asselta R, Ceciliani F, Ronchi S. cDNA cloning of turtle prion protein. **Febs Letters** 2000; 469:33-38.

Simons K e Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 2000; 1:31-39.

Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. **Cell** 1987; 51:229-240.

Stimson E, Hope J, Chong A, Burlingame AL. Site-specific characterization of the N-linked glycans of murine prion protein by high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and exoglycosidase digestions. **Biochemistry** 1999; 38:4885-4895.

Strumbo B, Ronchi S, Bolis LC, Simonic T. Molecular cloning of the cDNA coding for *Xenopus laevis* prion protein. **Febs Letters** 2001; 508:170-174.

Sunyach C, Jen A, Deng J, Fitzgerald KT, Frobert Y, Grassi J, McCaffrey MW, Morris R. The mechanism of internalization of

glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. **EMBO J.** 2003; 22:3591-3601.

Thelen K, Kedar V, Panicker AK, Schmid RS, Midkiff BR, Maness PF. The neural cell adhesion molecule L1 potentiates integrin-dependent cell migration to extracellular matrix proteins. **J. Neurosci.** 2002; 22:4918-4931.

Tobler I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rulicke T, Moser M, Oesch B, McBride PA, Manson JC. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. **Nature** 1996; 380:639-642.

Tsai MT, Su YC, Chen YH, Chen CH. Lack of evidence to support the association of the human prion gene with schizophrenia. **Mol. Psychiatry** 2001; 6:74-78.

van RT, Smolenaars MM, Madsen O, de Jong WW. Molecular evolution of the mammalian prion protein. **Mol. Biol. Evol.** 2003; 20:111-121.

Vassallo N e Herms J. Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. **Journal of Neurochemistry** 2003; 86:538-544.

Venstrom KA e Reichardt LF. Extracellular-Matrix .2. Role of Extracellular-Matrix Molecules and Their Receptors in the Nervous-System. **Faseb Journal** 1993; 7:996-1003.

Vey M, Pilkuhn S, Wille H, Nixon R, Dearmond SJ, Smart EJ, Anderson RGW, Taraboulos A, Prusiner SB. Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 1996; 93:14945-14949.

Wadsworth JD, Asante EA, Desbruslais M, Linehan JM, Joiner S, Gowland I, Welch J, Stone L, Lloyd SE, Hill AF, Brandner S, Collinge J. Human prion protein with valine 129 prevents expression of variant CJD phenotype. **Science** 2004; 306:1793-1796.

Walz R, Amaral OB, Rockenbach IC, Roesler R, Izquierdo I, Cavalheiro EA, Martins VR, Brentani RR. Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. **Epilepsia** 1999; 40:1679-1682.

Wiksten M, Liebkind R, Laatikainen T, Liesi P. Gamma 1 laminin and its biologically active KDI-domain may guide axons in the floor plate of human embryonic spinal cord. **J. Neurosci. Res.** 2003; 71:338-352.

Winklhofer KF, Heller U, Reintjes A, Tatzelt J. Inhibition of complex glycosylation increases the formation of PrPsc. **Traffic.** 2003; 4:313-322.

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. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. **EMBO J.** 2002; 21:3307-3316.

Zhang YB, Swietnicki W, Zagorski MG, Surewicz WK, Sonnichsen FD. Solution structure of the E200K variant of human prion protein - Implications for the mechanism of pathogenesis in familial prion diseases. **Journal of Biological Chemistry** 2000; 275:33650-33654.

Zimmermann K, Turecek PL, Schwarz HP. Genotyping of the prion protein gene at codon 129. **Acta Neuropathol. (Berl)** 1999; 97:355-358.