

ESTUDO FUNCIONAL DE PROTEÍNAS PRION CELULAR MUTANTES NO DOMÍNIO DE LIGAÇÃO À STI1 E A VITRONECTINA

PAMELA ANDRADE LOURENÇO PEREDA

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dra. Vilma Regima Martins

São Paulo

2007



FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Pereda, Pamela Andrade Lourenço

Estudo funcional de proteínas prion celular mutantes no domínio de ligação à STI1 e a vitronectina / Pamela Andrade Lourenço Pereda – São Paulo, 2007.

80p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Oncologia.

Orientadora: Vilma Regina Martins

Descritores: 1. DOENÇAS DE PRION. 2. PROTEINAS MUTANTES. 3. SÍNDROME DE GERSTMANN-STRAUSSLER-SCHEINKER. 4. PROTEINAS PRPC. 5. VITRONECTINA.

*Ao meu marido Camilo Pereda e ao meu filho Caíque
Pereda por serem a razão da minha felicidade.*

Eu amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Dra. Vilma R. Martins, pela orientação, por seu compromisso com o ensino e pela oportunidade de integrar um dos mais respeitados grupos de pesquisa do Brasil;

Às Dras **Marilene Lopes** e **Gláucia Hajj**, pela excencial contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Luiz Fernando L. Reis, pela excelência na condução desta pós-graduação e pelo 7 na Capes;

Aos amigos do laboratório de Biologia Celular e Molecular: Camila, Cinthia, Cleiton, Eliane, Gabriel, Michele, Zanith, Flávio e Tiago por todos os momentos compartilhados, amizade, carinho, lições e ajuda;

À 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, e em especial para Sra. Conceição, Isabel, Leia, Sr. Eudes, Sampaio;

A Capes, FAPESP e ao Howard Hughes Medical Institute pelo apoio financeiro;

À minha família, por toda a ajuda, por todo o amor;

Especialmente, ao meu marido por sempre estar ao meu lado para tudo;

E a Deus, o meu imenso obrigada!!!



RESUMO

Pereda PAL. **Estudo funcional de proteínas prion celular mutantes no domínio de ligação à STI1 e a vitronectina.** São Paulo; 2007. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

A proteína prion celular (PrP^{C}) é a isoforma normal da proteína infecciosa denominada prion ou PrP^{Sc} . A forma infecciosa está envolvida em doenças neurodegenerativas transmissíveis, tanto em homens (doença de Creutzfeldt-Jakob, doença de Gerstmann-Sträussler-Scheinker ou GSS e Insônia Familiar Fatal), quanto em animais (*scrapie*, encefalopatia espongiforme bovina, etc). Nosso grupo recentemente caracterizou dois ligantes que interagem com PrP^{C} através do domínio 105-128. A proteína STI1 ("Stress inducible protein 1"), uma co-chaperonina que associa-se aos resíduos 113-128 de PrP^{C} levando a neuritogênese e neuroproteção por vias de sinalização distintas. Além disso, está envolvida com a proliferação celular em gliomas. A segunda, vitronectina (Vn), uma proteína de matriz extracelular, interage com os aminoácidos 105-119 de PrP^{C} modulando o crescimento axonal. Mutações em PrP^{C} nos códons Pro102Leu, Pro105Leu e Ala117Val (correspondentes aos aminoácidos 101, 104 e 116 na sequência de camundongos) estão contidas no sítio de interação com STI1 e vitronectina e estão associadas à síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), uma doença priônica hereditária. É interessante notar que camundongos transgênicos com alta expressão do gene de PrP^{C} contendo a mutação Pro101Leu apresentam neurodegeneração espontânea, enquanto que sua expressão em níveis normais causa maior susceptibilidade à infecção por PrP^{Sc} . Já a mutação Ala117Val produz uma forma transmembrânica de PrP^{C} que, no entanto, não causa deposição de PrP^{Sc} nem infecção. Diante destes dados, pode-se propor que mutações nestes domínios de PrP^{C} estejam associadas à perda de função de PrP^{C} . A modulação da interação de PrP^{C} com STI1 e vitronectina pode ainda ter um

papel relevante em outras doenças humanas relacionadas a proliferação e morte celular, como o câncer. Desta forma, é bastante relevante conhecer o papel das alterações no domínio de PrP^C contido entre os aminoácidos 102 a 128 sobre os eventos biológicos desencadeados pela sua interação com STI1 e vitronectina. Vetores de expressão contendo construções de PrP^C tipo selvagem ou com mutações nos codons 102, 105 e 117 associadas com os polimorfismos 129Met ou 129Val fusionadas a GFP foram geradas e expressas em células eucarióticas. Através de microscopia confocal mostramos que as construções GFP-PrP^C 129Met, GFP-PrP^C 129Val, GFP-PrP^C 102Leu/129Met; GFP-PrP^C 102Leu/129Val; GFP-PrP^C 105Leu/129Met; GFP-PrP^C 105Leu/129Val; GFP-PrP^C 117Val/129M são corretamente endereçadas à membrana plasmática e região perinuclear. E que a construção GFP-PrP^C 117Val/129Val fica retida no citoplasma celular e a forma detectada em ensaios de western blotting tem uma massa molecular de cerca de 45KDa que contrasta com aquelas de 60KDa presente nas outras construções. As construções transfectadas em células N2a foram selecionadas e clones com expressão semelhante das proteínas foram isolados. Ensaios de migração à vitronectina mostraram que não havia diferença entre os clones expressando a proteína tipo selvagem ou os mutantes. Ensaios de migração à STI1 não foram realizados uma vez que esta proteína não induziu migração em ensaios de haptotaxia. No entanto, este ensaio não é suficiente para 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

Pereda PAL. **[Functional study of mutant prion proteins in ligation domain STI1 and vitronectin]**. São Paulo; 2007. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

The cellular prion protein (PrP^{C}) is a normal isoform of the infectious protein denominated prion or PrP^{Sc} (scrapie prion protein). The infectious form is involved in fatal neurodegenerative disorders, such as Creutzfeldt- Jakob disease (CJD), Gerstman-Straussler-Scheinker syndrome (GSS) and Fatal-Familial- Insomnia (FFI) in humans, or scrapie and bovine spongiform encephalopathy (BSE) in animals. Recently, our group characterized two ligands that interact with PrP^{C} through 105-128 aminoacids domain. The first ligand, STI1 protein (Stress-Inducible-Protein 1), a co-chaperone, binds PrP^{C} at the residues 113-128 promoting neuritogenesis and neuroprotection through distinct signaling pathway. Moreover, PrP^{C} -STI1 interaction is involved in the Glioma cellular proliferation. The second ligand, Vitronectin (Vn), an extracellular matrix protein, interacts with PrP^{C} at the aminoacids 105-119 modulating the axonal growth. PrP^{C} mutations at codons Pro102Leu and Ala117Val (corresponding to aminoacids 101, 104 and 116 in mice sequence) represents the STI1 and VN binding sites in the PrP^{C} molecule and are associated to Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome (GSS), an hereditary prion disease. Interestingly, transgenic mice expressing high levels of PrP^{C} mutant (Pro101Leu) showed spontaneous neurodegeneration, while its expression in basal level causes more susceptibility the PrP^{Sc} . On the other hand, PrP^{C} mutation Ala117Val produces a PrP^{C} transmembrane form that does not cause neither deposition of PrP^{Sc} nor infection. Taken together, these data suggest that PrP^{C} mutation might be associated to PrP^{C} loss-of-function. The modulation of PrP^{C} interaction with STI1 and Vitronectin can still play a relevant role in other human disease related to proliferation and cellular death, like cancer. Indeed, it is relevant to know the role of the

altered PrP^C molecule within aminoacids 102-128 and to investigate the biological events triggered by STI1 and Vitronectin interaction. Expression vectors presenting wild-type or mutated PrP^C at codons 102, 105 and 117 combined with the polymorphism 129Met or 129Val and fused to GFP were generated and expressed in eucariotic cells. Using confocal microscopy, we showed that GFP-PrP^C 129Met, GFP-PrP^C 129Val, GFP-PrP^C 102Leu/129Met; GFP-PrP^C 102Leu/129Val; GFP-PrP^C 105Leu/129Met; GFP-PrP^C 105Leu/129Val; GFP-PrP^C 117Val/129M were correctly localized on the plasma membrane and perinuclear region while GFP-PrP^C 117Val/129Val remained stuck in the cytoplasm. Using western blot assays we observed that the GFP-PrP^C 117Val/129Val presented a main form of 45KDa while all of the other constructions had 60KDa. N2a cells were stably transfected with these constructions and selected clones with similar expression of PrP^C or its mutated forms were isolated. In migration assays promoted by vitronectin the cells expressing the mutated PrP^C protein presented the same migratory activity of those expressing the mutated proteins. Migration assays induced by STI1 were not performed since this protein was unable to induce migration. Nonetheless, these preliminary observations do not preclude 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	Gel agarose, purificação de vetor	32
Figura 2	Vetor pEGFP-C1	33
Figura 3	Sequenciamento do clone de PrP ^C P102L	34
Figura 4	Sequenciamento do clone de PrP ^C P102L com polimorfismo no códon 129.	34
Figura 5	PCR recombinante.	36
Figura 6	Digestão diagnóstica.	37
Figura 7	Sequenciamento dos clones de PrP ^C P102L, P105L.	38
Figura 8	Sequenciamento do clone de PrP ^C A117V, M129V.	39
Figura 9	Linhagem F14 expressa PrP ^C .	40
Figura 10	Linhagem F14 expressa PrP ^C endógeno.	41
Figura 11	Curva de seleção celular com blasticidina.	42
Figura 12	CF10 não expressa PrP ^C endógeno.	43
Figura 13	Imagem em microscopia confocal da sublocalização das proteínas quimeras.	47
Figura 14	Western Blotting do pool de células HEK 293T transfectadas com os mutantes.	48
Figura 15	As células N2a expressam as construções transfectadas.	50
Figura 16	Histograma representativo de ensaios de citometria de fluxo.	51
Figura 17	Histograma representativo de ensaios de citometria de fluxo.	52
Figura 18	Clones de células N2a transfectadas (polimorfismos no códon	

129).	53
Figura 19 Clones das células transfectadas (mutações).	54
Figura 20 Citometria de fluxo N2a.	55
Figura 21 Citometria de fluxo dos clones de N2a com o anticorpo 3F4.	56
Figura 22 Anticorpo M235 reconhece PrP ^C humano em células HEK293.	57
Figura 23 Gráfico dos ensaios de migração contra Vn com os clones #1.	61
Figura 24 Gráfico dos ensaios de migração contra Vn com os clones # 2.	62
Figura 25 Gráfico comparativo das médias independentes entre os clones 1 e 2.	63

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 Média de intensidade de fluorescência dos Clones 1. 58

Tabela 2 Média geométrica para distribuição de eventos dos clones 2. 59

Quadro 1 Resumo das principais mutações descritas no gene do PrP^C. 10

Quadro 2 Linhagens celulares testadas. 45

LISTA DE ABREVIATURAS

Ala	Alanina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
BSA	Albumina Sérica Bovina
CJD	Creutzfeldt-Jakob Disease
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FFI	Insônia Familiar Fatal
GFP	Proteína fluorescente verde
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
Kd	Constante de dissociação
KDa	kilodaltons
LB	Meio Luria-Bertani
Leu	Leucina
LN	Laminina
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógenos
Met	Metionina
PBS	Tampão Salina Fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI3K	Fosfatidil-inositol 3 quinase
PKA	Proteína Quinase dependente de cAMP
Prnp	Gene da Proteína Prion Celular
Pro	Prolina
PrP^C	Proteína Prion Celular
PrP^{Sc}	Proteína Prion Celular Scrapie
RNA	Ácido Ribonucleico
SDS	Duodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Bovino Fetal

STI1	Stress inducible protein 1
TBS/TBST	Tris Buffered Saline/ Tris Buffered Saline Tween
TE	Tris-EDTA
TSE	Encefalopatia espongiforme transmissível
UV	Ultravioleta
Val	Valina
Vn	Vitronectina
Xgal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis	1
1.2	Descoberta do agente infeccioso	3
1.3	Proteína Prion Celular (PrP ^C)	5
1.4	Associação de mutações no gene de PrP ^C e TSEs	9
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo geral	14
2.2	Objetivos específicos	14
3	MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1	Clonagem dos mutantes de PrP ^C 102L/129M e do alelo normal com 129V em vetor pGEM	15
3.1.1	Extração de DNA plasmidial	17
3.2	Construção dos mutantes 102Leu/129Val, 105Leu/129Val, 105Leu/129Met 117Val/129Met, 117Val/129Val em vetor que expressa proteína fluorescente verde	19
3.2.1	Preparo do Vetor pGFP para clonagem do peptídeo sinal humano	19
3.2.2	Preparo do vetor peptídeo sinal-pEGFP para clonagem dos mutantes	20
3.2.3	Desenho dos iniciadores com mutação na sequência de interesse	20
3.2.4	Extração de DNA em larga escala	22
3.3	Padronização da transfecção das construções dos mutantes de PrP ^C em pGFP	24
3.3.1	Transfecção com CaCl ₂	24
3.3.2	Transfecção com Lipofectamina	25
3.3.3	Eletroporação	25
3.3.4	Transfecção com Effectene	26
3.3.5	Linearização dos Vetores	26

3.4	Imunodeteção	27
3.5	Seleção com antibiótico	28
3.6	Citometria de fluxo	29
3.7	Análise de distribuição sub-celular de PrP ^C	29
3.8	Ensaio de Migração	
4	RESULTADOS	
4.1	Construção dos mutantes de PrP ^C em vetor que expressa a proteína fluorescente verde (GFP)	31
4.2	Padronização das transfecções de mutantes fusionados a pEGFP em diferentes linhagens celulares	31
4.3	Avaliação da localização sub-celular de PrP ^C	39
4.4	Geração de clones celulares de células N2a transfectadas com pEGFP associatdo aos mutantes de PrP ^C	46
4.4	Análise quantitativa da expressão de PrP ^C nos clones de células N2a transfectadas com os mutantes de PrP ^C	49
4.5	Ensaio de migração celular induzida por vitronectina nos clones de N2a expressando PrP ^C mutantes	58
4.6	Ensaio de migração celular à STI1 dos clones de N2a expressando PrP ^C mutantes	60
		63
5	DISCUSSÃO	64
6	CONCLUSÕES	70
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES TRANSMISSÍVEIS

Encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs) são doenças neurodegenerativas caracterizadas pela morte neuronal e vacuolização cerebral. Essas enfermidades acometem homens e animais e apresentam caráter hereditário, infeccioso ou esporádico.

A doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD) assim chamada por ter sido descrita primeiramente por Creutzfeldt em 1920 e por Jakob em 1921, é a mais comum das TSEs, pode apresentar caráter autossômico dominante, e neste caso acomete uma em um milhão de pessoas. CJD também pode manifestar-se através de contágio iatrogênico ou apresentar caráter esporádico. Os sintomas apresentados resumem-se em desordens visuais, perda da memória e movimentos mioclônicos, sendo que estes sintomas evoluem até a morte num período de 12 meses (RICHARDSON e MASTERS 1995).

Há relatos de transmissão iatrogênica de CJD por transplante de dura-máter e córnea de indivíduos com TSE (LANG et al. 1998), foi constatada também a contaminação por material cirúrgico mal esterilizado (FLECHSIG et al. 2001). Segundo trabalhos recentemente publicados, há possibilidade também da transmissão de CJD por transfusão de hemocomponentes (LLEWELYN et al. 2004).

Os casos esporádicos da doença foram assim denominados pela impossibilidade de associá-la a mutações gênicas, exposição a agentes infecciosos ou qualquer indício que justifique sua causa (WILL 2003).

A síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) é uma outra TSE, também hereditária e autossômica dominante. Possui como sintomatologia: ataxia, tremores, dificuldades de locomoção, distúrbios da fala, irritabilidade, comportamento descontrolado e redução da capacidade intelectual.

A última TSE descrita é a Insônia Familiar Fatal, que se manifesta em idade menos avançada que a CJD, por volta dos 48 anos de idade e costuma causar distúrbios do sono, do sistema endócrino e motor causando por último a demência (MEDORI et al. 1992).

Em animais, a TSE mais conhecida é a encefalopatia espongiforme bovina (BSE), também chamada de “doença da vaca louca”, que é causada pela contaminação do gado através de ração suplementada com proteína de carne e ossos de ovelhas contaminadas por *scrapie* (PRUSINER et al. 1991). O *scrapie* é outra TSE que se manifesta em ovelhas e cabras, causando perda de coordenação e intenso prurido (PRUSINER 1982; BASLER et al. 1986).

Por sua vez, a doença mais preocupante, particularmente na América do Norte é a “Chronic Wasting disease” e a “Transmissible Mink Encephalopathy” que afetam animais de vida livre como o visão, cervos, antílopes e martas respectivamente.

1.2 DESCOBERTA DO AGENTE INFECCIOSO

Diferentes modelos experimentais foram realizados na tentativa de melhor compreender o mecanismo de transmissão das TSEs e de purificar o seu agente etiológico.

Estes modelos tornaram possível a obtenção de grandes quantidades de extratos protéicos provenientes de cérebro de animais portadores da doença. Assim através de diversas técnicas como a centrifugação diferencial, extrações com detergentes, proteólise limitada, precipitação com sulfato de amônio e eletroforese, pôde-se constatar que este agente tratava-se de uma partícula infecciosa exclusivamente protéica. Uma característica muito interessante do agente infeccioso é a sua resistência parcial à digestão proteolítica.

A descoberta de que as TSEs eram causadas por um agente protéico provocou uma quebra de paradigma, ao se contrastar com a afirmação da biologia de que doenças infecciosas são causadas por microorganismos que contêm ácidos nucleicos (DNA e RNA) (PRUSINER 1982).

Através de anticorpos produzidos a partir do agente infeccioso purificado, pode-se reconhecer uma proteína de 27-30kDa em extratos protéicos de cérebro de animais infectados. Entretanto, em extratos protéicos de cérebro de animais não infectados, os anticorpos também reconheciam uma proteína com cerca de 30-35kDa, ou seja, foi observado que havia uma isoforma normal do agente infeccioso (OESCH et al. 1985).

Desta forma, os estudos possibilitaram o sequenciamento da proteína reconhecida por este anticorpo, tornando possível assim a clonagem do gene homólogo ao agente infeccioso (OESCH et al. 1985; CHESEBRO et al. 1985). Esta isoforma normal foi denominada proteína prion celular ou PrP^C e a forma infecciosa proteína prion *scrapie* ou PrP^{Sc} (BASLER et al. 1986).

Supõe-se que PrP^{Sc} seja capaz de converter moléculas de PrP^C em moléculas resistentes à digestão proteolítica. A maior evidência para esta hipótese é dada pelo fato de animais deficientes para o gene de PrP^C não apresentarem a doença (BUELER et al. 1992).

Devido a grande insolubilidade de PrP^{Sc}, é provável que seu acúmulo seja um dos motivos que levem à morte neuronal e deposição de material amilóide, degenerando assim as células do sistema nervoso.

Vários modelos tem sido propostos para explicar a formação de aglomerados de PrP^{Sc}, porém a proposta geral é que a proteína se desestabilize em consequência da infecção com PrP^{Sc} e se converta de PrP^C em PrP^{Sc}. O acúmulo de PrP^{Sc} leva a progressão rápida dessas doenças (HUANG et al. 1994; COHEN et al. 1994).

Entretanto, há ainda muitas questões em aberto, pois já foram descritos casos de doenças causadas por prion onde não são encontrados tais aglomerados.

1.3 PROTEÍNA PRION CELULAR (PrP^C)

PrP^C é uma proteína de superfície celular, codificada pelo gene (*Pmp*) presente no cromossomo 20 em humanos e 2 em camundongos (OESCH et al. 1985; CHESEBRO et al. 1985). PrP^C possui aproximadamente 250 aminoácidos, dos quais os primeiros 22 na extremidade amino-terminal sinalizam o endereçamento ao retículo endoplasmático rugoso, onde o peptídeo sinal N-terminal (resíduo 1-22) e o segmento hidrofóbico C terminal (resíduos 231-253) são clivados, seguindo-se a adição da âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Esta é então encaminhada para o complexo de Golgi e transportada até a superfície celular (PRUSINER et al. 1991; HARRIS 1999).

A estrutura tridimensional da proteína prion foi determinada por ressonância magnética em pH ácido (RIEK et al. 1996, 1997).

A expressão de PrP^C é mais abundante em neurônios, mas também ocorre em outros tipos celulares como os gânglios simpáticos e células componentes do sistema imune (FORD et al. 2002). A distribuição sub-celular se dá em membranas celulares pré-sinápticas (HERMS et al. 1999), em axônios em crescimento (SALES et al. 2002) e no citoplasma de alguns tipos neuronais (MIRONOV et al. 2003).

PrP^C é constitutivamente expresso em diferentes tecidos de animais adultos (BASLER et al. 1986) e suas concentrações são altamente reguladas durante o desenvolvimento. Em camundongos, PrP^C pode ser encontrado a partir do nono dia de vida intra-uterina e, após o nascimento a

expressão da proteína aumenta atingindo um pico de expressão no dia 14º pós-natal. Dependendo da região do cérebro, estas concentrações de PrP^C se mantêm ou diminuem no animal adulto (SALES et al. 2002).

A função de PrP^C ainda não foi completamente desvendada, porém sua conservação evolutiva sugere um importante papel fisiológico. PrP^C pode desempenhar funções tanto isoladamente quanto associado a outras proteínas e está relacionado a muitos fenômenos biológicos desde estresse oxidativo até ativação de linfócitos, apresentando também várias funções em células neuronais (MARTINS e BRENTANI 2002).

A principal hipótese sobre a função de PrP^C é que a proteína prion seja uma plataforma de superfície celular dinâmica para reunir a modulação de sinais baseados na seletividade de interações moleculares e sinalizações transmembrana, traduzindo desta forma uma vasta gama de consequências fisiológicas e comportamentais (revisado por LINDEM et al. 2007).

PrP^C possui dois sítios altamente conservados de glicosilação, sendo que pode ser encontrado na forma não glicosilada, monoglicosilada ou diglicosilada. O papel da glicosilação foi atribuído a suscetibilidade de conversão conformacional, bem como a diversidade das TSEs (LAW SON et al. 2005). Algumas simulações de dinâmica molecular sugerem que os glicanos N-ligados podem modular a estabilidade de PrP^C (ZUEGG e GREASY 2000; ERMONVAL et al. 2003; DEMARCO e DAGGERT 2005).

Recentemente, CHEN et al. (2003), mostraram que PrP^C participa no estímulo de vias de sinalização envolvidas em sobrevivência e diferenciação neuronal como: Fyn quinase, fosfatidil-inositol 3 quinase (PI3K), proteína

quinase dependente de cAMP (PKA) e proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK).

Nosso grupo caracterizou a interação entre PrP^C e a proteína de matriz extracelular laminina (LN). Esta interação possui alta afinidade (K_d 2×10^{-8} M) e especificidade e se dá entre o decapeptídeo da região carboxi-terminal da cadeia $\gamma 1$ de LN (GRANER et al. 2000) e o domínio entre os aminoácidos 173 ao 182 de PrP^C (COITINHO et al. 2006).

Sugere-se que a interação PrP^C-LN possa ter um importante papel fisiológico em uma variedade de tecidos onde ambas são expressas. Nosso grupo identificou que esta interação induz neuritogênese *ex vivo*, em culturas primárias de neurônios hipocampusais. Entretanto neurônios derivados de animais deficientes para PrP^C (Prnp^{0/0}) apresentaram neuritogênese reduzida em resposta a LN. Além disso, quando estes neurônios foram plaqueados sobre o peptídeo carboxi-terminal da cadeia $\gamma 1$ de LN, apenas aqueles do tipo selvagem apresentavam neuritogênese (GRANER et al. 2000). Isto indica que a ligação de PrP^C à LN é um processo importante na diferenciação neuronal.

Outros dados demonstram ainda que o bloqueio da interação PrP^C-LN usando anticorpos específicos impede a consolidação da memória de longa duração (COITINHO et al. 2006).

Nosso grupo também demonstrou através de ensaios de ligação *in vitro* a interação de alta afinidade (K_d de 10^{-7} M) entre PrP^C e uma co-chaperonina denominada STI1 ("Stress inducible protein 1") (ZANATA et al. 2002). Os domínios de interação foram mapeados entre os aminoácidos

113-128 de PrP^C e entre os resíduos 230-245 de STI1 (ZANATA et al. 2002). Além de observarmos a expressão de STI1 na superfície celular, também demonstramos que STI1 depende de PrP^C para induzir um efeito protetor contra apoptose em um modelo já estabelecido de neurônios da retina. STI1 estimula tanto a via de MAPK quanto a de PKA, no entanto somente esta última é relevante para o fenômeno de neuroproteção (CHIARINI et al. 2002; ZANATA et al. 2002).

Dados recentes do grupo mostraram que a interação entre PrP^C e STI1 apresenta efeito neuroprotetor não apenas em neurônios retinianos mas também em neurônios hipocampusais ao ativar a via de PKA; além disso, promove crescimento neurítico através da via de MAPK nestas células (LOPES et al. 2005).

Após a observação que PrP^C interage com a proteína de matriz extracelular LN (GRANER et al. 2000) o grupo avaliou se PrP^C poderia agir como um receptor pleiotrópico, ligando-se a outras proteínas de matriz. De fato, observou-se a interação da PrP^C com a proteína denominada vitronectina. Por outro lado a interação não ocorre com outras proteínas da matriz extracelular como fibronectina e colágeno IV (HAJJ et al. 2007).

A vitronectina (Vn) é uma glicoproteína multifuncional de 459 aminoácidos e massa molecular de 75kDa, que está relacionada a processos metabólicos como adesão celular, mecanismos de defesa humoral, invasão e migração celulares (SEGER e SHALTIEL 2000). É possível observar a presença de Vn em vários tecidos como músculo esquelético, rins, tecido conjuntivo e nervoso (HAYMAN et al. 1983).

Vn possui a capacidade de interagir com integrinas e provocar a formação de “clusters” na membrana celular, o que leva à interação com proteínas de citoesqueleto acionando cascatas de sinalização intracelulares (HYNES 2002).

Através de ensaios de ligação semelhantes aos já feitos anteriormente pelo nosso grupo com PrP^C, LN e STI1 foi possível demonstrar a ligação de PrP^C com Vn como específica e de alta afinidade ($kd\ 10^{-8}\text{ M}$). O sítio de interação entre ambas as proteínas foi mapeado e reside entre os aminoácidos 105-119 em PrP^C e 309-322 em Vn. Além disso, foi possível evidenciar que essa interação é importante no mecanismo de crescimento axonal de gânglios da raiz dorsal (HAJJ 2004).

Deste modo, alterações na molécula de PrP^C podem privar o tecido nervoso de sinais neuroprotetores e de diferenciação neuronal, o que estaria relacionado ao aparecimento de patologias associadas à perda de função desta proteína.

1.4 ASSOCIAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE DE PrP^C E TSES

Existe uma série de mutações no gene de PrP^C que levam ao aparecimento das TSEs. O Quadro 1 fornece-nos uma visão panorâmica a respeito de todas as mutações já descritas, onde se pode observar que estas ocorrem em toda a extensão da proteína. Além disso, a razão para uma mutação causar uma sintomatologia específica associada à uma doença e não a outra, ainda, não foi estabelecida. Neste aspecto é

interessante notar que a mutação que ocorre no resíduo Asp178Asn pode levar ao aparecimento de FFI ou CJD, o que determina o desenvolvimento de uma das doenças é um polimorfismo no aminoácido 129, que varia entre valina ou metionina. A mutação no códon 178 acompanhada do genótipo Val129 no mesmo alelo determina o desenvolvimento de CJD, enquanto que a mutação acompanhada de Met129 causa FFI (MEDORI et al. 1992).

Quadro 1 - Resumo das principais mutações descritas no gene do PrP^C.

Códon	Mutação	Patologia associada	Referências
51-91	Inserção 48 a 216 pb	CJD /GSS	GOLDFARB et al. (1993)
102	Pro→Leu	GSS	HSIAO et al. (1989)
105	Pro→Leu	GSS	YAMADA et al. (1993)
117	Ala→Val	GSS	DOH-URA et al. (1989)
145	Tyr→STOP	GSS	GHETTI et al. (1996)
171	Asn→Ser	Esquizofrenia	SAMAIA et al. (1997)
178	Asp→Asn	IFF/CJD	GOLDFARB (1991); MEDORI et al. (1992)
180	Val→Ile	CJD	KITAMOTO et al. (1993)
183	Thr→Ala	CJD	NITRINI et al. (1997)
187	His→Arg	GSS	CERVENAKOVA et al. (1999)
188	Trh→Lys	Demência	FINCKH et al. (2000)
196	Glu→Lys	CJD	PEOC'H et al. (2000)
198	Phe→Ser	GSS	HSIAO et al. (1992)
200	Glu→Lys	CJD	GOLDFARB et al. (1991)
202	Asp→Asn	GSS	PICCARDO et al. (1998)
208	Arg→His	CJD	MASTRIANNI et al. (1996)
210	Val→Ile	CJD	POCCHIARI et al. (1993)
211	Glu →Gln	CJD	PEOC'H et al. (2000)
212	Gln→ Pro	GSS	PICCARDO et al. (1998)
217	Gln→ Arg	GSS	HSIAO et al. (1989)
232	Met→ Arg	CJD	KITAMOTO et al. (1994)

Diferentes mutações associadas a GSS entre elas Pro102Leu, Pro105Leu e Ala117Val foram notificadas no domínio 102-125, que representa o sítio de interação de PrP^C à Vn e STI1. Uma vez que a interação de PrP^C com estas moléculas está envolvida com distintos fenômenos biológicos como a diferenciação neuronal e a neuroproteção (ZANATA et al. 2002; CHIARINI et al. 2002; LOPES et al. 2005; HAJJ et al. 2007), torna-se indispensável investigar se essas mutações estão associadas a perda de função de PrP^C.

102 (Pro102Leu): Mutação t pica de pacientes portadores de GSS, a doença costuma se apresentar por volta da quarta a sexta década de vida, os sintomas são síndrome cerebelar progressiva e lenta, com perda da capacidade mental e distúrbios comportamentais no estágio mais avançado da doença. Pode-se observar através da análise microscópica depósitos de material amilóide no cerebelo e no córtex cerebral, associados à alterações espongiiformes (HSIAO et al. 1989).

105 (Pro105Leu): Esta mutação costuma tornar-se evidente em pacientes com idade média entre 40 e 50 anos de idade, pôde ser observado clinicamente através de sintomas como a hiperreflexia nos membros inferiores e sinal de Babinski. Uma análise histológica do córtex cerebral mostra deposição de PrP^{Sc} principalmente no córtex motor, corpo estriado, tálamo e no cerebelo (YAMADA et al. 1993).

117(Ala117Val): Descrita em pacientes de uma família francesa e de duas famílias inglesas. A faixa etária de manifestação da doença se apresentou ampla entre 19 e 64 anos de idade, com uma evolução da doença de 2 a 6

anos. Os sintomas apresentados foram a demência pré-senil associada a sinais extra-piramidais, parkinsonismo e ataxia. Histologicamente foi observada no córtex, gânglio basal, tálamo a deposição de material amilóide, associados à degeneração espongiiforme (DOH-URA et al. 1989).

129(Met129Val): Sabe-se que o polimorfismo (Met129Val) no códon 129 de *PRNP* está relacionado à susceptibilidade ao desenvolvimento da doença esporádica ou adquirida de Creutzfeldt-Jakob (CJD) (WADSWORTH et al. 2004). Este polimorfismo foi identificado pela primeira vez através de um estudo da doença Gerstmann-Straussler em uma família francesa (DOH-URA et al. 1989). Posteriormente o mesmo polimorfismo foi determinado em um estudo no Reino Unido com 22 casos de pacientes com Creutzfeldt-Jakob. Neste estudo foi encontrado uma maior frequência de homozigotos para metionina na posição 129, sendo que 90% dos casos esporádicos de CJD apresentavam este polimorfismo comparados a 51% de homozigotos na população normal. Este resultado ressalta a importância do estudo dos diferentes alelos polimórficos do códon 129 em combinação com as diferentes mutações patológicas.

DEL BO et al. (2004) mostraram uma associação entre polimorfismo no códon 129 do gene *PRNP* e prejuízos cognitivos em indivíduos com síndrome de Down. Foi encontrada uma diferença significativa na taxa de declínio da habilidade intelectual em um subgrupo de pacientes que carregava pelo menos um alelo valina comparado com aqueles com metionina/metionina. Portanto levando a conclusão que a variabilidade no

gene *PRNP* pode contribuir para acelerar a taxa de declínio cognitivo nestes indivíduos.

O genótipo Met/Met ou Met/Val no códon 129 do gene *PRNP* foi ainda associado a uma melhora na performance na memória de longa duração em indivíduos jovens normais quando comparados com um grupo semelhante apresentando Val em homozigose (PAPASSOTIROPOULOS et al. 2005). Desta forma, sugerindo a importância do códon 129 nas funções celulares de PrP^C.

Portanto, o presente trabalho avaliará as mutações em *PRNP* associadas a GSS presentes nos códons 102, 105, 117 em combinação com os polimorfismos valina ou metionina no códon 129.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Expressar proteínas PrP^C contendo mutações Pro102Leu, Pro105Leu e Ala117Val associadas com o polimorfismo 129Met or 129Val e avaliar sua interação com Vn e STI1, sua distribuição, compartimentalização e sinalização celular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Construção dos mutantes de PrP^C Pro102Leu, Pro105Leu e Ala117Val associados com polimorfismo no códon 129 metionina ou valina fusionados a proteína fluorescente verde (GFP),
2. Avaliação da distribuição celular destes mutantes de PrP^C;
3. Avaliação da interação destes mutantes de PrP^C com as proteína STI1 e vitronectina por ensaios de migração por haptotaxia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi submetido a Comissão de ética em pesquisa (CEP) do Hospital do Câncer na reunião do dia 31/05/2005, os membros da comissão aprovaram a realização do estudo. Projeto de pesquisa nº: 699/05.

3.1 CLONAGEM DOS MUTANTES DE PrP^C 102L/129M E DO ALELO NORMAL COM 129V EM VETOR PGEM

Para a clonagem do mutante de PrP^C 102L/129M e do alelo normal 129V em vetor pGEM foram utilizados os seguintes iniciadores sintetizados pela empresa IDT ("Integrated DNA Technologies") baseados na sequência de PrP^C humano depositada no -*GenBank* sob o número AY=008282 (www.ncbi.nlm.nih.gov):

- 1 *Forward: F1seq 5'ATG CTG GTT CTC TTT GTG 3'*
- 2 *Reverse: F2seq 5'CTC CCT CAA GCT GGA AAA AGA 3'*

Foi utilizado como molde o DNA genômico de pacientes portadores de doenças hereditárias por prion ou DNA de indivíduos adultos normais possuem os códons respectivamente 102L/129M ou 102P/129V e de PrP^C mutados. Esses pacientes fazem parte de um estudo conduzido por outra aluna de nosso grupo (LANDEMBERGER 2006). O gene de PrP^C com as

devidas mutações foi amplificado via PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizando Taq polimerase Platinum (Invitrogen). A identificação dos produtos de PCR foi feita através de gel de agarose 0,8% em tampão contendo brometo de etídio (10ng/mL). Os fragmentos de DNA foram visualizados sob luz UV.

Posteriormente foi feita uma purificação dos fragmentos de DNA amplificados segundo o protocolo fornecido pelo Kit Wizard® SV Gel and PCR clean-up system (Promega). O produto da purificação foi visualizado novamente através do gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio (10ng/ml). Este produto de PCR purificado foi utilizado em uma reação de ligação com 400 unidades T4 ligase no vetor pGEM T Easy vector-system (Promega), por 16 horas. O produto desta reação (3µl) foi empregado na transformação de 100µl de bactérias competentes DH5α, e incubado por 30 minutos no gelo, juntamente com o tubo controle apenas com bactérias. Após este período transferimos os tubos para um banho seco a 42°C por dois minutos para que ocorra a transformação. Em seguida os tubos foram colocados no gelo por 3 minutos, e logo após foi acrescentado 1ml de LB (para 100ml: 1g Triptona, 0,5g extrato de levedura, 1g NaCl) (Meio Luria-Bertani) (Sambrook, 2001) e foi deixado no banho à 37°C por 1 hora para recuperação da parede celular da bactéria.

Neste intervalo foram feitas placas de Petri com 14mL de LB ágar acrescido de XGal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside), IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) e 50µg/mL de Ampicilina para que se pudesse fazer a seleção das colônias através da triagem azul/branca,

uma vez que o vetor utilizado codifica a β -galactosidase na região do sítio de clonagem.

Após o período de 1 hora em que as bactérias foram deixadas no banho, os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 1700 xg. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* da bactéria foi ressuspensionado em 100 μ l de LB semeado sobre o LB ágar. As placas foram incubadas a 37°C durante 16 horas.

Para selecionar os clones que receberam a construção inserto + vetor corretamente, as colônias foram removidas da placa com auxílio de uma alça plástica estéril (Fisherbrand®Bac-Loops®) e inoculadas em 50 μ l de LB acrescido de 50 μ g/ml de ampicilina para serem amplificadas via PCR. Os iniciadores usados foram os mesmos utilizados na amplificação anterior. O resultado deste PCR foi analisado através de gel de agarose como já citado anteriormente, um fragmento de 800pb foi identificado e as colônias positivas foram selecionadas para gerar um pré-inóculo para purificação de DNA.

3.1.1 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

Através deste inóculo foi feita uma extração de DNA com o sistema "Minipreps DNA Purification System" (Promega) seguindo o protocolo do fabricante. Brevemente, centrifugou-se este inóculo a 9700 xg por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 300 μ l de "cell ressuspension solution". Em seguida adicionou-se 300 μ l de

Cell Lysis solution e o tubo foi invertido algumas vezes para homogenização. A solução de lise foi inativada com 300µl de “neutralization solution”.

O lisado foi centrifugado por 10 minutos a 20800 xg para separar debris celulares e DNA genômico. O sobrenadante foi recuperado, foi adicionado 1ml de resina e a mistura foi incubada por 20 minutos à temperatura ambiente. A resina foi empacotada em colunas fornecidas pelo Kit e lavadas com “wash solution” (2mL). Logo após este procedimento a coluna foi transferida para um tubo e centrifugada a 9700 xg por 2 minutos para eliminar o tampão de lavagem restante. O DNA foi eluído da resina com 50µl de água quente livre de nucleases com centrifugação por 2 minutos a 9700xg.

O DNA extraído foi analisado através de gel de agarose 0,8%, corado com Brometo de etídio (10ng/mL). Com esta preparação fez-se o sequenciamento utilizando o Kit Big Dye e os iniciadores utilizados anteriormente. A reação foi colocada no termociclador e as ciclagens utilizadas foram 95°C por 20 segundos, 60°C por 1 minuto e 15 segundos e isto se repetiu por 24 vezes. Após o término das ciclagens, foi feita a precipitação do DNA com 1µl de acetado de sódio 1,5mM e 40ul de Etanol 95%, incubando-se 15 minutos no gelo. Após a centrifugação de 10 minutos a 4°C, aspirou-se todo o sobrenadante, adicionou-se 250ul de Etanol 75% e centrifugou-se por mais 10 minutos à 9700 xg. Descartou-se novamente o sobrenadante e o tubo foi colocado na estufa a 56°C para secar. Após estes procedimentos foi feito o sequenciamento e para isso foi utilizado o “kit” “Dynamic™ ET terminator cycle sequencing” (Amersham Pharmacia),

conforme instruções do fabricante, e o processamento das mesmas foi realizado no sequenciador automático ABI Prism 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer).

Finalizando assim a construção da mutação 102P/129V no vetor pGEM que foi usada como molde para as subclonagens em vetor pEGFP.

3.2 CONSTRUÇÃO DOS MUTANTES 102LEU/129VAL, 105LEU/129VAL, 105LEU/129MET 117VAL/129MET, 117VAL/129VAL EM VETOR QUE EXPRESSA PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE

3.2.1 PREPARAÇÃO DO VETOR PGFP PARA CLONAGEM DO PEPTÍDEO SINAL HUMANO

Para que PrP^C seja endereçado corretamente para a superfície celular fusionado a GFP é necessário inserir o fragmento de DNA que codifica para essa sequência na região à montante (5') da sequência que codifica GFP.

Para esse fim, usamos como molde DNA genômico humano para amplificarmos o fragmento de PrP^C que codifica a sequência do peptídeo sinal. Os iniciadores usados foram:

Foward (FHpepsinal)(5'-3')CCACCGGTAGCAGTCATTATGCGAA
CCT

Reverse (RHpepsinal)(5'-3')AAACCGGTAAGCAGAGGCCAGG
TCACT

A ciclagem usada na PCR, com ciclos de 95°C (desnaturação) 1 minuto, 60°C (hibridação) 1 minuto, 68°C (extensão) 1 minuto, repetidos 34 vezes e 68°C para extensão final por 5 minutos .

O fragmento de DNA correspondente ao peptídeo sinal humano, foi digerido com enzima *Age-I*, e purificado para a sua ligação ao vetor pEGFP previamente digerido com *Age-I* e desfosforilado.

As etapas de ligação, transformação e sequenciamento foram realizadas como citado anteriormente (item 3.1).

3.2.2 PREPARAÇÃO DO VETOR PEPTÍDEO SINAL-PEGFP PARA CLONAGEM DOS MUTANTES

O vetor pGFP-C1 (Clontech) com o peptídeo sinal humano já clonado, foi purificado com o Kit Clean-Up (Promega) após digestão enzimática com *EcoRI* e *BamHI*, foi desfosforilado durante 30 minutos a 37°C com 10 unidades (U) da enzima Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (Invitrogen). A reação foi então inativada por 10 minutos a 72°C e novamente purificada. O vetor digerido, desfosforilado e purificado foi utilizado nas clonagens dos mutantes.

3.2.3 DESENHO DOS INICIADORES COM MUTAÇÃO NA SEQÜÊNCIA DE INTERESSE

Foram desenhados iniciadores a serem utilizados nas construções das mutações sítio dirigidas nos códons Pro105Leu, Ala117Val e Met129Val

de PrP^C. Foi utilizado o software Oligo tech para analisar se os iniciadores formavam dímeros e para verificar a temperatura de *annealing* dos mesmos.

Iniciador Fw105L

5'-CCGAGTAAGCTAAAAACCAACATG-3'

Iniciador Rv 105L

5'-GTTGGTTTTTAGCTTACTCGGCTT-3'

Iniciador Fw117V

5'-GGTGCAGCAGTAGCAGGGGCAGTG-3'

Iniciador Rv117v

5'-AGCCCCAGCTACTGCAGCACCAGC-3'

Iniciadores que flanqueiam as extremidades 5' e 3' do gene de PrPc
(FHIIPrPc): 5'CAT GAA TTC T AAG AAG CGC CCG AAG CCT GGA3'
(RHIIPrPc): 5'ACT GGA TCC TCA ACC TAC TAT CAG AAA GAT3'

A técnica de PCR recombinante (AUSUBEL et al. 1994) foi utilizada para construir as mutações sítio dirigidas.

Foram feitas duas reações de PCR uma utilizando o iniciador FHIIPrPc juntamente com o *reverse* de cada mutação para amplificarmos a 1ª. Metade da ORF de *Prnp* e a outra utilizando o iniciador *Foward* de cada mutação juntamente com o RHIIPrPc para amplificação da 2ª. Metade da ORF de *Prnp*.

Os iniciadores internos se sobrepõem em 7 códons, fazendo com que as fitas sintetizadas por eles sejam coesivas. O próximo passo foi fazer uma reação de ligação e extensão destas duas metades sem o uso de iniciadores, pois cada metade é o próprio iniciador da outra metade. Para

isso usa-se ciclagem apenas de desnaturação, uma hibridação e uma extensão. Logo depois os iniciadores externos são inseridos no sistema (FHIIPrP^C e RHIIPrP^C) para amplificação da nova fita contendo a mutação desejada.

O produto de PCR foi purificado e em seguida foi feita uma digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamH*, para a ligação ao vetor pEGFP-C1 (Clontech) digerido previamente com as mesmas enzimas, como já descrito anteriormente. Após a purificação do produto de digestão o vetor e o inserto foram ligados utilizando 400 unidades da enzima T4 Ligase, tampão apropriado da enzima, 25ng vetor, 125ng do inserto e a quantidade suficiente de água para completar 20ul de reação. Após a adição de cada um destes componentes a reação foi incubada a 4°C 16 horas. Foi feita a transformação como já descrito anteriormente e 16 horas depois foram selecionadas algumas colônias da placa de transformação. Em seguida, foi feita uma PCR a fim de verificar quais colônias possuíam o inserto de PrP^C. As colônias que mostraram-se positivas apresentando uma banda do tamanho de PrP^C, aproximadamente 800 pares de bases, foram inoculadas em 5ml de LB acrescidos de Kanamicina 50µg/ul, para extração de DNA, como já descrita anteriormente. A partir desta preparação fez-se a reação de sequenciamento para verificar se as mutações estavam corretas.

Após a verificação do sequenciamento os clones selecionados foram submetidos a uma extração de DNA em larga escala.

3.2.4 EXTRAÇÃO DE DNA EM LARGA ESCALA

Para a realização desta preparação de DNA foi utilizado o Kit Qiagen® Plasmid Maxi seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, a cultura foi centrifugada por 10 minutos a 4°C e 2700 xg e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspendido com 10 ml de tampão P1, e adicionado 10ml de tampão P2, a solução foi invertida gentilmente e em seguida deixada à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida foi acrescentado 10ml de tampão P3 gelado e o tubo foi invertido novamente. A solução foi deixada no gelo por 15 minutos, enquanto isso a coluna para filtrar a solução foi equilibrada com tampão QBT, separadamente foi montado um outro filtro com uma membrana de 0,2µm e acoplado a uma mangueira de sucção a vácuo com um tubo falcon de 50ml embaixo.

A solução foi filtrada por meio de sucção, e este filtrado foi passado pela coluna já equilibrada com QBT, o eluato foi desprezado, e a coluna foi lavada duas vezes com 30ml de tampão QC, o lavado e o DNA foi eluído com 15ml de tampão QF que desta vez foi armazenado foi desprezado em um tubo falcon de 50ml. O DNA foi precipitado com 10,5 ml de isopropanol, e centrifugado por 30 minutos a 4°C a 8600 xg. O sobrenadante foi descartado, foi acrescentado etanol 70%, e então foi centrifugado novamente por 40 minutos a 8600 xg a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi colocado para secar na estufa a 56°C.

O DNA foi ressuspendido com 500µl de TE (Tris-EDTA) e quantificado através de absorbância em 260nm e sua qualidade analisada em gel de

agarose 0,8%. Todos os clones selecionados foram armazenados no freezer -70°C, com LB 10% glicerol.

3.3 PADRONIZAÇÃO DA TRANSFEÇÃO DAS CONSTRUÇÕES DOS MUTANTES DE PRP^C EM pEGFP

As linhagens celulares utilizadas foram HEK293 (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[™]), (BROWN 2001), MEF^{0/0} "*Mice embryonic Fibroblast*" (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[™]), SN56 (fusão de neurônio septal e neuroblastoma de camundongo) e N2a (ATCC[®] Number: CCL-131[™]) clone estabelecido a partir de neuroblastoma murino. Cultivadas em meio MEM[®] (Gibco[™]) contendo piruvato monossódico 1mM.

3.3.1 TRANSFEÇÃO COM CACL2

As células (4×10^4) para transfecção foram semeadas em uma placa de 35mm e mantidas em cultura por 16 horas. Foram adicionados os

reagentes na seguinte ordem: 3µg de DNA, 187ul H₂O, 62,5ul CaCl₂ 1M e 250ul de BBS após 5 minutos de incubação o meio foi aspirado das placas em cultivo e foi acrescentada a mistura. As células foram incubadas na estufa úmida a 37°C com 3% CO₂ por 5 horas.

Após este período todo o meio das placas foi aspirado e as mesmas foram lavadas duas vezes com PBS. Em seguida foi colocado meio apropriado (2ml) nas placas e foram incubadas por mais 24 horas a 37°C em estufa úmida com 5% CO₂.

As imagens das células transfectadas foram adquiridas através de um microscópio de fluorescência utilizado para excitar a molécula fluorescente (GFP) sob luz ultravioleta (488nm).

3.3.2 TRANSFEÇÃO COM LIPOFECTAMINA

Foram plaqueadas 4x10⁴ células em uma placa de 6 poços usando Optimem completo acrescido com 10% Soro Fetal Bovino (Invitrogen) e 1% penicilina e estreptomicina 5000µ/ml (Gibco). Em seguida as células foram incubadas em estufa úmida 37°C com 3% CO₂ por 16 horas.

Para transfectar, foi usado um tubo para diluir 1 e 2 µg de vetor em 150µl de meio Optimem sem soro e sem antibiótico. Em outro tubo foram diluídas concentrações de 2,5µg, 5 e 10µg de lipofectamina em 150µl de meio sem soro e sem antibiótico.

As duas soluções foram incubadas separadamente por 5 minutos e então foram misturadas e incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente.

Neste intervalo as placas foram lavadas com meio sem soro e foi

adicionado 1,5 ml de meio Optimem sem soro e sem antibiótico.

Foram adicionados os 300ul da solução (lipofectamina e vetor) sobre a placa de cultivo contendo 1,5 ml de meio de maneira que a solução ficasse homogeneizada. Após o período de incubação de 4 horas a 37°C em estufa úmida com 5% CO₂, o meio foi trocado por Optimem completo e a placa foi incubada novamente na mesma condição anterior por 24 a 48 horas.

O pico máximo de expressão da quimera GFP-PrP^C mutantes se dá de 24 a 48 horas após a transfecção.

3.3.3 ELETROPORAÇÃO

As cubetas de eletroporação devem ficar expostas a luz ultravioleta por 15 minutos para esterilização. As células em cultura foram tripsinizadas e centrifugadas por 5 minutos a 3800 xg e ressuspensas em 1ml de meio DMEM 10% soro. Foi colocado em cada cubeta: 2,5ul de tampão BES 0,5M pH 7,2 na parede no fundo da cubeta, adicionamos também 10µg/ul de DNA de esperma de salmão, 15µg de DNA e 1X10⁶ de células. As cubetas foram colocadas no eletroporador (170V, capacitância 950, constante entre 40 e 50). Após estes procedimentos as células foram plaqueadas e mantidas em estufa úmida a 37°C por 24 horas com 5% CO₂, para posteriormente serem analisadas através de um microscópio de fluorescência.

3.3.4 TRANSFEÇÃO COM EFFECTENE

A transfecção com Effectene Transfection Reagent 2002 Qiagen, foi realizada conforme instrução dos fabricantes (ARNOLD et al. 2006).

3.3.5 LINEARIZAÇÃO DOS VETORES

Os vetores foram linearizados com enzimas cuidadosamente escolhidas de modo que cortassem apenas um único sítio e que não prejudicasse nenhuma função importante do vetor. As enzimas de restrição selecionadas foram a *Clal* e *ScaI* para os vetores pEGFP e pEF6 (vetor de blasticidina) respectivamente. Os vetores foram digeridos 16 horas à 37°C, e purificados com Kit clean Up e dosados no espectrofotômetro (NanoDrop-1000 Spectrophotometer).

3.4 IMUNODETECÇÃO

As linhagens F14 e HEK293T foram lisadas com PBS NP40 1% (para 100ml- 1% NP-40 1 mL; 10% Glicerol 10mL; 135Mm NaCl 2,7mL; 20Mm Tris pH 8,0 2mL) acrescido de inibidor de proteases. O extrato celular foi centrifugado por 10 minutos a 15300 xg e 4°C, o sobrenadante foi passado para um novo tubo e o precipitado desprezado. A concentração de proteína foi dosada através de reação colorimétrica pelo reagente de Bradford.

O reagente de Bradford foi diluído 5 vezes em H₂O e 200ul da solução foi adicionada em poços de placas de 96 poços. Foi feita uma curva padrão com uma proteína de massa conhecida, BSA (Albumina Sérica Bovina) que foi utilizada como referência para dosagem do extrato protéico celular. Em seguida a placa foi levada a um leitor de Elisa.

Um total de 50µg de proteína por poço foi aplicada juntamente com tampão redutor 4x (240mM TRIS HCl, 0,8% SDS, 200mM 2 Mercaptoetanol,

traços de bromo fenol blue, 40% Glicerol, H₂O quantidade suficiente para 12mL). Como controle positivo foi usado um extrato de encefalo fração 30% (ZANATA et al. 2002) e como marcador foi usado o High Mass Ladder (Invitrogen). Todos os tubos foram fervidos por 10 minutos antes da aplicação em gel acrilamida 10% que em seguida foi submetido a uma eletroforese com SDS Page.

Após a eletroforese o gel foi submetido a transferência para membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences) em uma amperagem de 0,04A por 60 minutos.

Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau (0,1% Ponceau, 10% ácido acético) e lavada com H₂O para verificar a eficiência da transferência protéica.

Na etapa de imunodeteccção a membrana foi bloqueada com leite Molico 5% diluído em TBST por 1 hora. Posteriormente foram feitas 3 lavagens com TBST, e incubada com 1mL de leite molico e 1:1000 de anticorpo primário de mouse anti-PrP^c produzido no laboratório (ZANATA et al. 2002).

A membrana foi incubada na câmara fria a 4°C por 16 horas e após este período foi lavada por 3 vezes com TBST (10Mm Tris pH7,4NaCl150Mm, 0,05% Tween), e incubada com anticorpo secundário anti-mouse HRP (Amersham) diluído 1:5000 em leite molico por 1 hora à temperatura ambiente.

A membrana foi revelada com uma solução 1:1 de ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences). O filme "High

performance autoradiography Amershan Biosciences” foi colocado sobre a membrana e exposto por 5 minutos. Em seguida o filme foi colocado na solução reveladora (Kodak), na água e na solução fixadora (Kodak) e colocado para secar.

3.5 SELEÇÃO COM ANTIBIÓTICO

As células foram selecionadas com 600µg/mL de Geneticina (Gibco™), ao qual o vetor pEGFP-C1 confere resistência, por 15 dias.

3.6 CITOMETRIA DE FLUXO

As células foram retiradas da placa de cultura através de tripsina, a tripsina foi inativada com meio MEM, 10% soro fetal bovino e 1% piruvato de sódio (20ml de soro fetal bovino, 2ml de Piruvato (concentração), para 200ml de meio MEM), e as células foram incubadas a 37°C por 1 hora para o restabelecimento da membrana.

As células foram centrifugadas novamente, o sobrenadante descartado e as mesmas ressuspensas em PBS 0,5% BSA contendo o anticorpo anti-PrP^C e (1µg/µl) diluído 1:100 e incubada a 4°C por 1 hora.

Após este período as células foram lavadas 3 vezes com PBS. O anticorpo secundário anti-mouse FITC (Pharmingen) 1/200 foi diluído em 100ul de PBS 0,5% BSA e incubado por 1 hora a 4°C. Em seguida as células foram lavadas 3 vezes com PBS e a fluorescência 2 (ficoeretrina-PE) foi medida no citômetro (Fac Scan- Becton Dickinson).

3.7 ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO SUBCELULAR DE PRP^C

Para analisar a distribuição celular dos mutantes de PrP^C, foram realizadas transfecções em células SN56, uma linhagem celular originária da fusão de neurônios septais e neuroblastoma de cérebro de camundongo neonatal. Estas células foram utilizadas devido ao seu amplo uso em estudos de tráfego de proteínas. As células foram transfectadas com lipofectamina numa concentração de 2,5µg/µl e 2µg de DNA conforme o protocolo descrito no item 3.3.2. As células foram plaqueadas em lamínulas de vidro para microscopia de 22mm, transfectadas e em seguida diferenciada com Adenosina monofosfato cíclico (AMPc) 2mM em meio DMEM sem soro com 1% L-glutamina por 48 horas. Os núcleos celulares foram corados com DAPI 0,14',6-Diamidina-2-fenilindole (0,1µg/ml). As lamínulas foram montadas em aparato próprio e as imagens das células vivas analisadas em microscópio Nikon TE 2000 sob microscopia confocal (*BioRad Radiance*) utilizando laser de argônio 488nm.

3.8 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 10µg/ml de VN por 1 hora a 37°C. A seguir as membranas foram bloqueadas com BSA 0,5% por 30 minutos a 37°C. Em cada poço foram plaqueadas 2x10⁵ células, que permaneceram incubadas por 6 horas em estufa com atmosfera constante de 5% de CO₂ a

37°C. Os poços foram então 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.

4 RESULTADOS

4.1 CONSTRUÇÃO DOS MUTANTES DE PRPC EM VETOR QUE EXPRESSA A PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE (GFP)

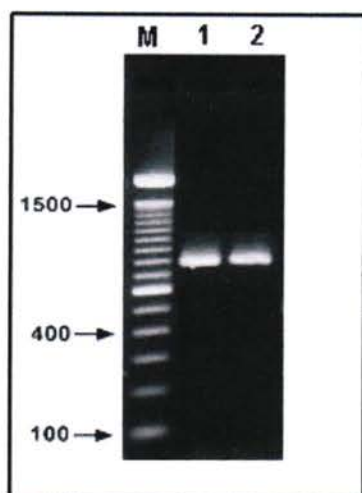
Os mutantes de PrP^C foram clonados no vetor pGFP para que fosse possível analisar a distribuição celular das quimeras GFP-PrP^C e

posteriormente estudar o comportamento desses mutantes em distintos ensaios biológicos.

A clonagem da mutação no códon Pro102Leu de PrP^C no vetor pGEM se deu a partir da amplificação de DNA genômico de um paciente portador de GSS que apresentava a mutação de interesse.

Para que fosse possível selecionar os dois alelos do gene de PrP^C que apresentasse a mutação P102L associada ou não ao polimorfismo 129M, clonamos o fragmento mutado primeiramente em vetor pGEM utilizando o sistema de clonagem pGEM T-Easy Vector System (Promega).

Esse sistema foi utilizado na clonagem de fragmentos de DNA diretamente do produto de PCR que pode ser visualizado na Figura 1.



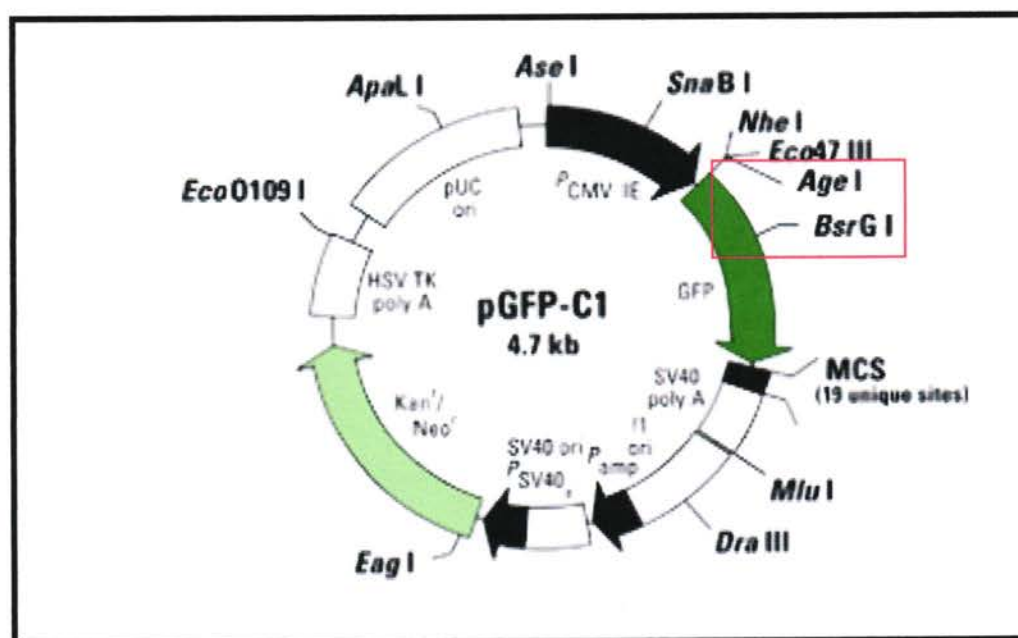
Legenda: Produto amplificado e purificado do fragmento de *PRNP* contendo a mutação Pro102Leu M- marcador de peso molecular 100 pares de bases, 1 e 2 duplicatas da construção P102L.

Figura 1 - Gel agarose fragmento amplificado de PrP^C.

Após analisados e conferidos os clones contendo 102Leu/129Met e 102Pro/129Val foram selecionados e utilizados como molde para subclonagem em vetor pEGFP.

Primeiramente, para que PrP^C seja endereçado corretamente para a membrana plasmática faz-se necessário clonar o peptídeo sinal humano que sinaliza para sua compartimentalização na superfície celular. Como todos os nossos mutantes contêm a sequência de PrP^C humano, desenhemos iniciadores para clonar o peptídeo sinal humano a partir de cDNA humano através de PCR com iniciadores específicos.

A sequência que representa o peptídeo sinal humano foi inserido no sítio de *AgeI* do vetor pEGFP a 5' da sequência do vetor que codifica EGFP (veja Figura 2).

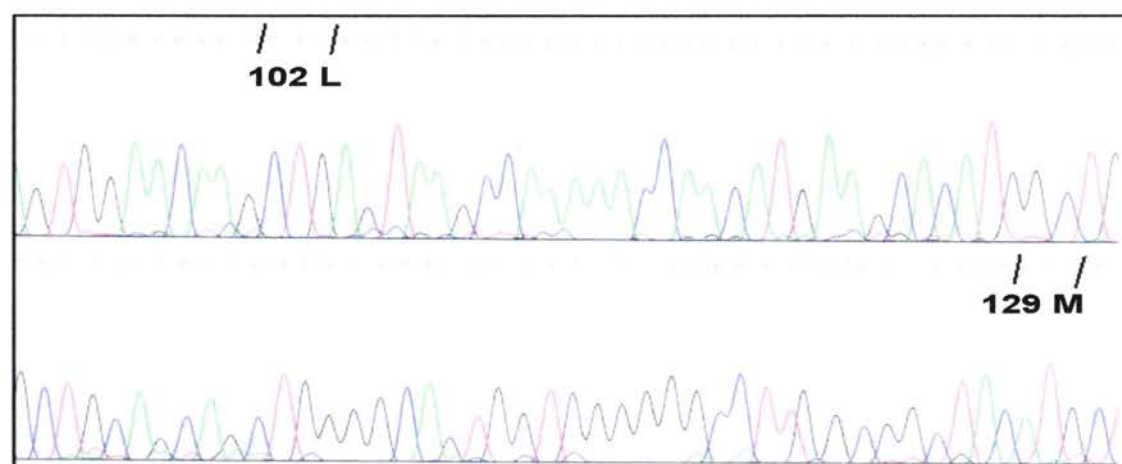


Legenda: Figura ilustrativa do vetor pEGFP-C1, em destaque o sítio de AgeI.

Figura 2 - Vetor pEGFP-C1.

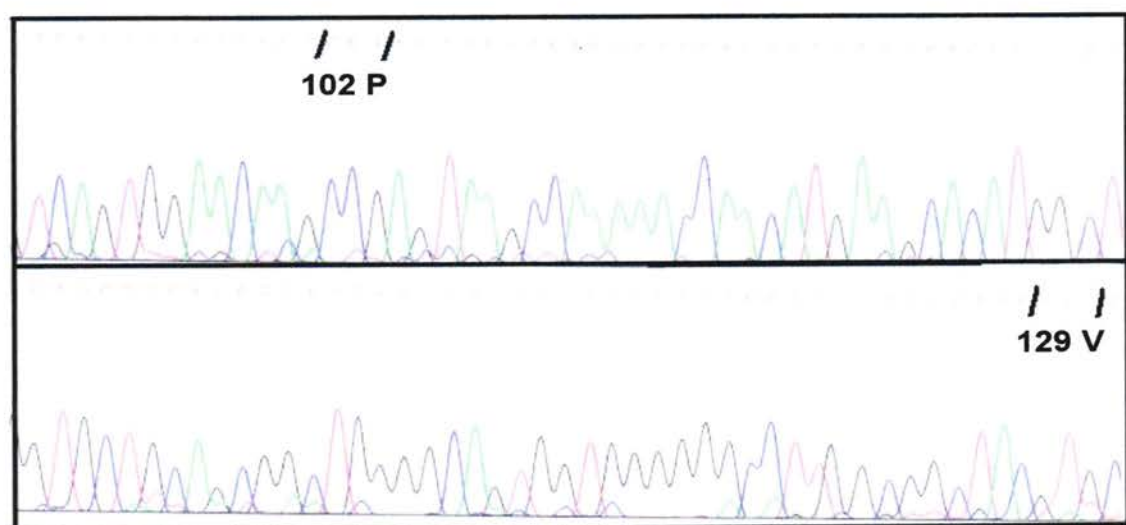
A construção pEGFP peptídeo sinal humano foi conferida através de reação de sequenciamento para confirmarmos a ausência de erros na adição nucleotídica.

Os clones pEGFP-PrPc Pro102 foram então analisados e o sítio mutado associado ou não ao polimorfismo 129 pode ser verificado nas Figuras 3 e 4.



Legenda: Eletroferograma representativo do sequenciamento do clone não mutado (Leu102) com o polimorfismo Met129.

Figura 3 - Sequenciamento do clone Leu102/Met129.

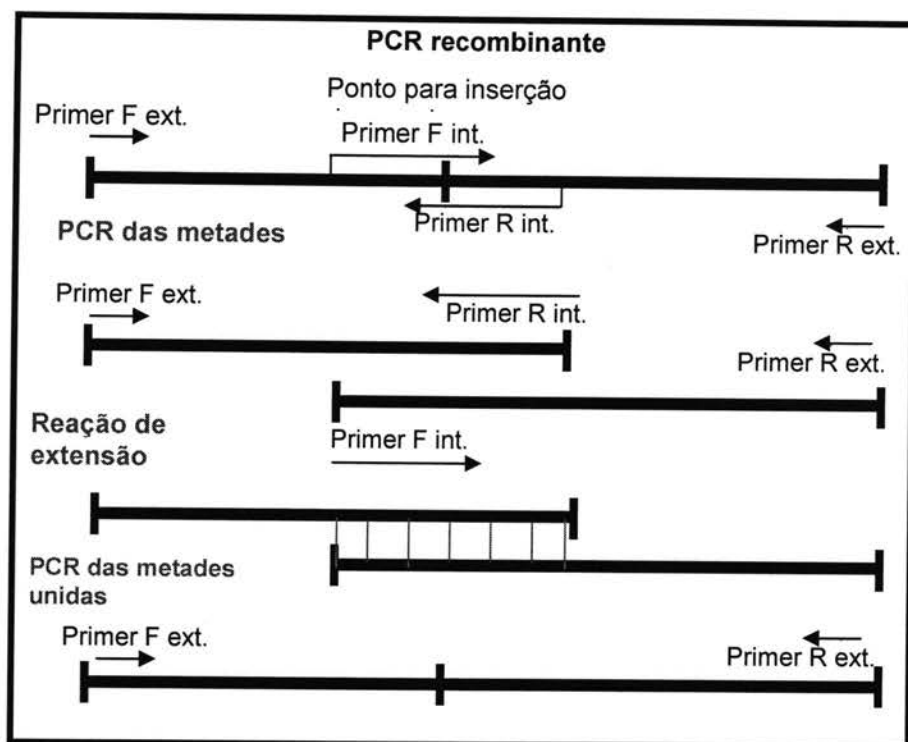


Legenda: Eletroferograma representativo do sequenciamento do clone que apresenta a mutação/polimorfismo nos códons Pro102 e Val129.

Figura 4 - Sequenciamento do clone Pro102/Val129.

Já para as construções das mutações 102L/129M, 105L/129M, 105L/129V, 117V/129M, 117V/129V, WT/129V, WT/129M utilizamos a técnica de PCR recombinante para alterar a sequência nucleotídica e consecutivamente o aminoácido de interesse, já que não tínhamos DNA genômico de pacientes que apresentavam essas mutações.

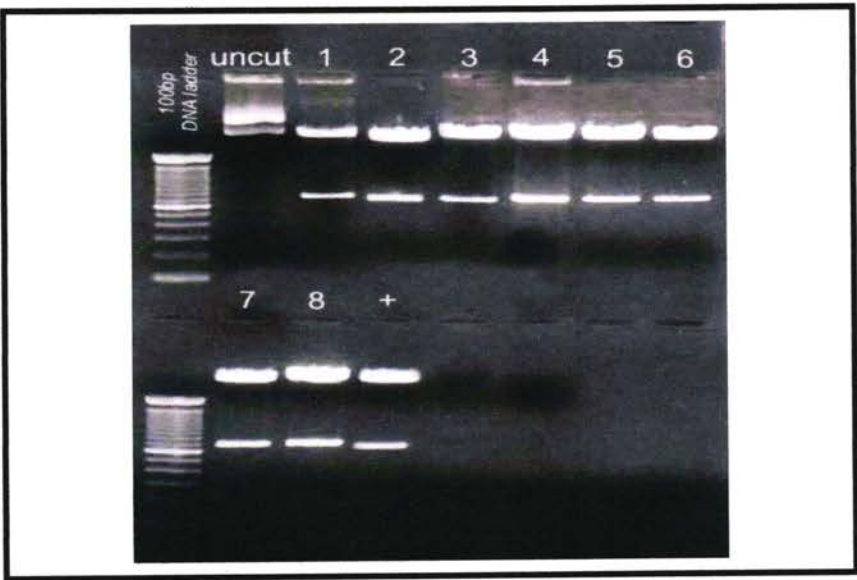
A técnica de PCR recombinante foi utilizada para que as duas metades da ORF de PRNP sejam amplificadas separadamente. Primeiramente é feita uma PCR para amplificar a primeira metade da ORF com iniciador FHIIPrPc (primer F5') juntamente com o iniciador *reverse* (Primer R3') que possui a mutação de interesse. A seguir uma segunda reação foi realizada para amplificar a segunda metade da ORF de PRNP com o primer RHIIPrPc juntamente com o *forward* de cada mutação de interesse. Os iniciadores internos sobrepõem-se em sete códons, fazendo com que as fitas sintetizadas sejam coesivas, o próximo passo foi fazer uma reação de ligação e extensão destas duas metades. Um esquema da técnica pode ser observado na Figura 5.



Legenda: Esquema ilustrativo de PCR recombinante

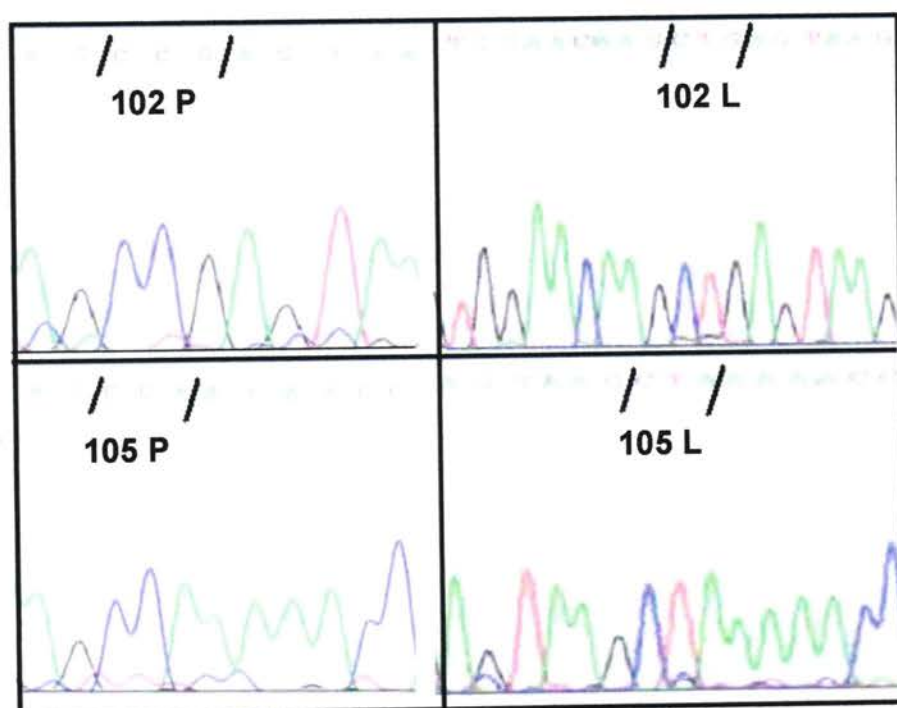
Figura 5 - PCR recombinante.

Desta maneira, todos os mutantes Pro102/129M e Pro105, Ala117 associados com polimorfismo 129M ou V foram clonados no vetor pEGFP. As construções pEGFP- PrP^C mutantes foram digeridas com *EcoRI* e *BamHIII* para confirmação do tamanho dos insertos (Figura 6) e além disso a os produtos clonados foram re-sequenciados para descartarmos a possibilidade de alteração de bases nucleotídicas. Desta forma, todas as mutações em PrP^C associadas ao polimorfismo no 129 (Met ou Val) foram construídas no vetor pEGFP e sequenciadas.



Legenda: Figura ilustrativa da digestão diagnóstica das construções pEGFP- PrP^c mutantes digeridas com Eco RI e Bam HIII para liberação do inserto. Da esquerda para a direita: Marcador de peso molecular 100 pares de bases, (uncut) não digerido, 1- 102Leu/129Met, 2-102Leu/129Val, 3-105Leu/129Met, 4-105Leu/129Val, 5-117Val/129Met, 6- 117Val/129Val, 7-WT/129Val, 8-WT/129Met e + controle positivo (Prnp de camundongo clonado no vetor pEGFP).

Figura 6 - Digestão diagnóstica.

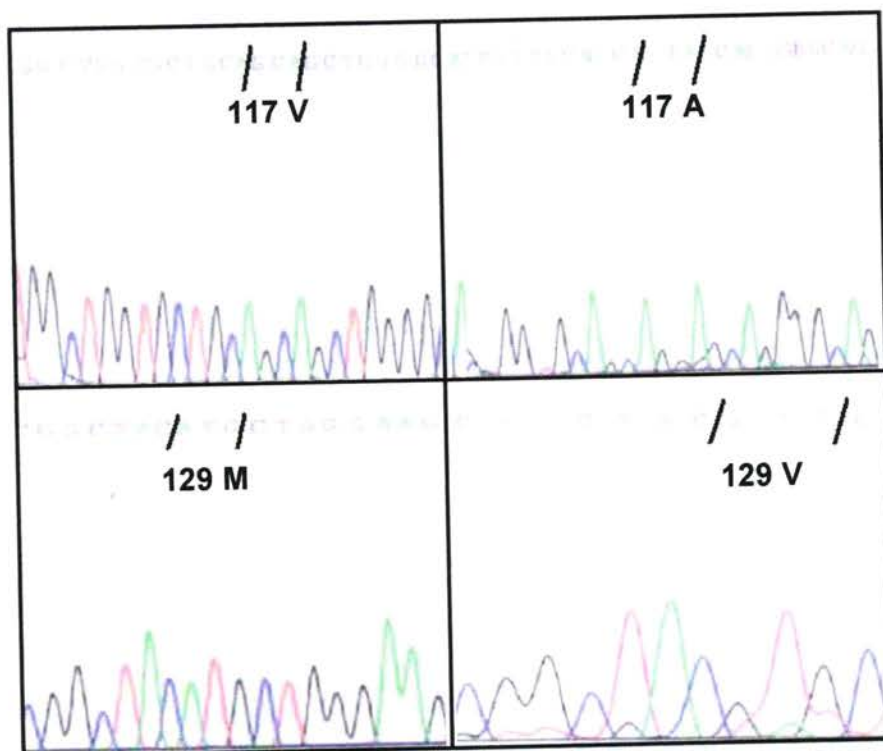


Legenda: Eletroferograma representativo do sequenciamento dos clones Pro102, Leu102, Pro105 e Leu105.

Figura 7 - Sequenciamento dos clones P102L, P105L.

Os eletroferogramas mostrando os códons Pro102, Leu102, Pro105 e Leu105 nos produtos de PRNP amplificados por PCR e clonados no vetor de expressão estão ilustrados na figura 7. As variantes dos códons 117 e 129 são mostradas na Figura 8.

Após a conferência de todas as seqüências das construções GFP-PrP^C mutados foram feitas as preparações de DNA plasmidial que foram usadas em ensaios de transfecção celular.



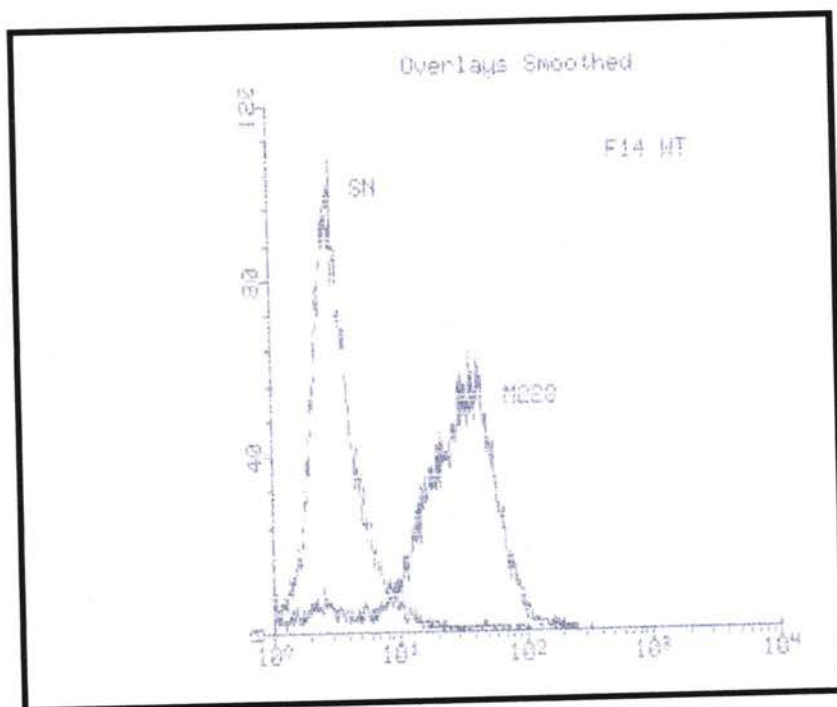
Legenda: Eletroferograma representativo do sequenciamento dos clones que apresentam as mutações Ala117, Val117 e os polimorfismos Met129 e Val129.

Figura 8 - Sequenciamento dos clones Ala117, Val117, Met129 e Val129.

4.2 PADRONIZAÇÃO DAS TRANSFEÇÕES DE MUTANTES FUSIONADOS A pEGFP EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES.

Primeiramente, a nossa célula de escolha foi a linhagem F14 originada a partir da fusão de neurônios cerebelares com neuroblastomas de camundongo deficiente para Prnp (HOLME et al, 2003). Essa célula foi escolhida pois não expressa PrP^C, e portanto a proteína endógena não interferiria em experimentos biológicos nos quais as quimeras GFP-PrP^C exógenas estariam sendo expressas.

celular foi observado quando as células foram avaliadas com um anticorpo policlonal contra PrP^C (M228). Portanto, este resultado confirma a presença de PrP^C na linhagem F14. O soro pré-imune de camundongo não reconhece nenhum antígeno (SN) (Figura 10).



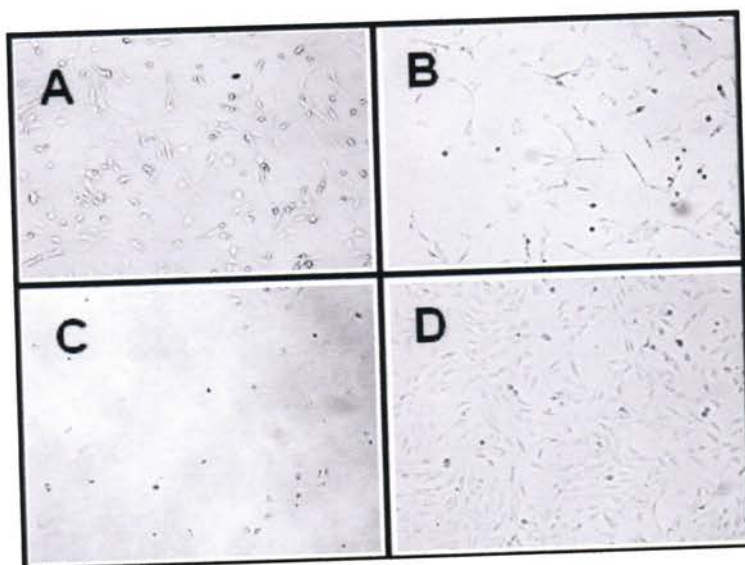
Legenda: Célula F14 foi reagida com soro pré-imune (SN) e com anticorpo anti-PrP^C (M228).

Figura 10 - Linhagem F14 expressa PrP^C endógeno na superfície.

Desta forma, após a constatação de que a célula F14 expressa PrP^C, e que não poderia ser utilizada para os próximos experimentos, foi necessário fazer uma nova pesquisa afim de se encontrar uma outra célula deficiente para PrP^C.

Nosso grupo imortalizou uma linhagem celular originária de cultura primária de fibroblasto embrionário de camundongo deficiente para PrP^C. Essa foi imortalizada por passagem serial na cultura e denominada de

MEF^{0/0} ("Mice Embryonic Fibroblast") (MURAS 2005). Foram feitas padronizações para a co-transfecção destas células com DNA, através do método de lipofectamina, das construções GFP ou GFP-PrP^C tipo-selvagem mais o vetor que confere resistência a blasticidina. A eficiência de transfecção foi de aproximadamente 10%. Além disso, iniciamos a padronização de seleção celular pelo antibiótico realizando uma curva dose-resposta como mostra a Figura 11.



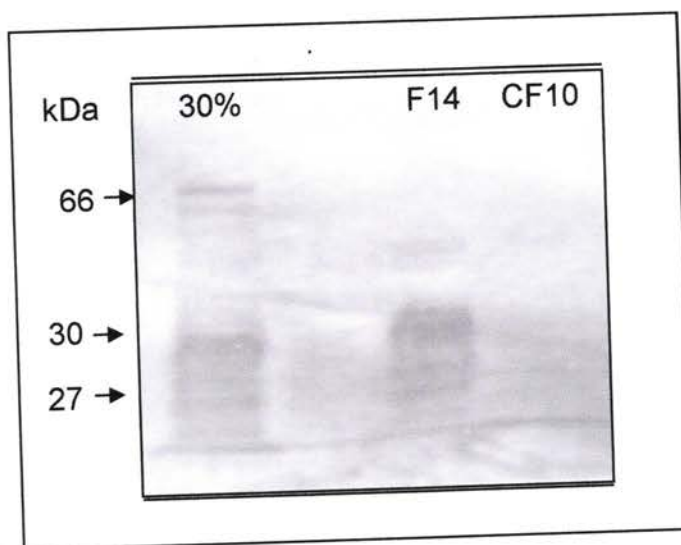
Legenda: a- Painéis A, B e C células MEF^{0/0} tratadas respectivamente com 5, 10, 15 µg/ml de blasticidina, D controle sem tratamento.

Figura 11 - Curva dose-resposta da sensibilidade a blasticidina de células MEF^{0/0}.

Depois de várias tentativas verificamos que a transfecção das construções GFP-PrP^C em MEF^{0/0} apresentaram uma eficiência muito baixa e decidimos prosseguir com outra linhagem. A doutora Suzette A. Priola nos cedeu células CF10 derivadas de cérebro de embrião de camundongos *Prnp*^{0/0}, imortalizadas com pSV3-neo e selecionadas com G418. Sendo assim, iniciamos novas padronizações de transfecção com estas células,

porém antes dos experimentos fizemos uma imunodetecção para confirmar a ausência de PrP^C nestas células, como mostra a Figura 12.

Extrato de CF10, F14 (controle positivo, pois expressa PrP^C), e extrato de cérebro precipitado com 30% de sulfato de amônio foram submetidos a SDS-PAGE 10% seguido por imunodetecção com anticorpo contra PrP^C. Como mostrado na Figura 12, apenas os controles positivos F14 e extrato de encefalo 30% (sulfato de amônio) reagiram contra o anticorpo anti-PrP^C, indicando que a linhagem CF10 é desprovida de PrP^C.



Legenda- Linhagem F14 (controle positivo), extrato de encefalo fração 30% em sulfato de amônio (controle positivo) e linhagem celular CF10.

Figura 12 - Células CF-10 não expressam PrP^C endógeno.

Portanto, seguimos com os ensaios de transfecção na linhagem CF10, uma vez que a mesma é desprovida de PrP^C endógeno, como confirmado através de imunodetecção (Figura 12) e citometria de fluxo (dado não mostrado).

A transfecção pelo método de cálcio como já padronizado para as outras linhagens, mostrou-se bastante tóxica para CF10 (dado não mostrado). A melhor condição de transfecção encontrada foi com lipofectamina 2,5µg e 2µg de DNA em placa de 35mm com 4×10^4 células. As células foram, co-transfectadas com uma concentração 10 vezes menor do vetor que confere resistência a blasticidina. A eficiência de transfecção de CF10 com lipofectamina foi de aproximadamente 10%. Porém, em busca de uma maior eficiência na transfecção de CF10, foram testadas outras abordagens como: eletroporação e effectene (reagente comercial utilizado em transfecções que promete uma maior eficiência, usado juntamente com um tampão *Enhancer*, o Effectene atua formando micelas, englobando o DNA facilitando sua entrada na célula). A eletroporação, cuja metodologia está detalhadamente descrita em material e métodos, não repercutiu numa boa eficiência de transfecção. Desta forma, seria necessário re-padronizar todo o protocolo preexistente para esse tipo celular, o que exigiria muito tempo. Partimos então para uma segunda alternativa que pensava-se ser menos tóxica para a célula: transfectá-la com effectene (Qiagen). Células CF10 foram transfectadas com effectene, conforme material e métodos. Os dados não serão apresentados, pois os resultados não foram satisfatórios. Desta forma, optamos por utilizar uma linhagem celular provinda de

neuroblastoma murino (ATCC CAT Nº CCL-131) a Neuro-2a ou N2a, já que esta apresentou melhor eficiência de transfecção com lipofectamina na concentração de 2,5 µg/µl mas que apresenta expressão de PrP^C endógena.

Além disso, observamos que células SN-56 (neurônios septais imortalizados) apresentam uma eficiência de transfecção semelhante às N2a, mas com a vantagem de apresentarem uma relação nucleo/citoplasma menor que células N2a. Isto permite analisar com mais precisão a distribuição celular das moléculas quimeras GFP/PrP^C.

Portanto, as células SN-56 foram transfectadas transitoriamente e usadas para avaliação da distribuição celular das proteínas mutantes de PrP^C. Já as células N2a foram transfectadas e clones expressando as proteínas de interesse foram isolados e avaliados em ensaios de migração.

Quadro 2 - Linhagens celulares testadas.

Linhagem Celular	Método de Transfecção	Eficiência de Transfecção	Aplicação
Hek 293	Cálcio	40%	Imunodetecção
F14	Lipofectamina	40%	Não utilizada
MEF%	Lipofectamina	10%	Não utilizada
CF10	Todos	5%	Não utilizada
N2a	Lipofectamina	40%	Migração Celular
SN56	Lipofectamina	40%	Sublocalização Celular

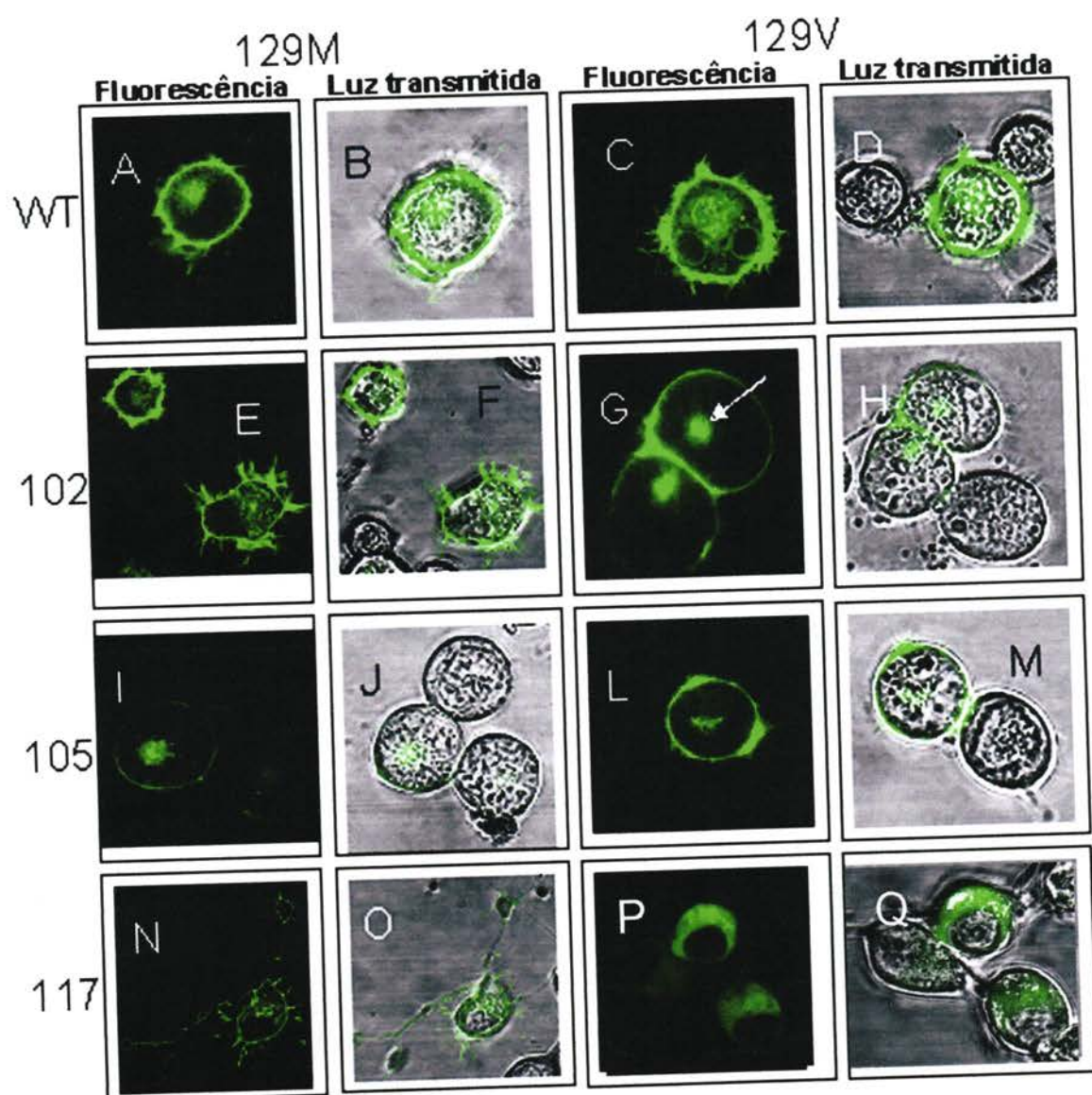
4.3 AVALIAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO SUB-CELULAR DE PrP^C

Células da linhagem SN56 foram transfectadas com as construções de PrP^C e após 2 dias de diferenciação a compartimentalização subcelular das quimeras foi avaliada utilizando um microscópio (Nikon) confocal (Biorad) (Figura 13).

Como podemos observar PrP^C fusionado a GFP é corretamente endereçado a membrana, e cicla entre esta estrutura e uma região perinuclear previamente mostrada como sendo o complexo de Golgi (Lee et al. 2001) (seta, imagem G, Figura 14).

As mutações nos códons 102 e 105 parecem não exercer nenhum efeito na localização subcelular de PrP^C, que continua sendo corretamente enviado a membrana e acumulando no complexo de Golgi. A mutação no códon 117, quando associada ao códon 129Met, tampouco apresenta alteração na distribuição subcelular. No entanto quando esta última está associada ao códon 129Val, apresenta distribuição completamente alterada, encontrando-se dispersa pelo citoplasma da célula (Figuras 13P e 13Q). Esta alteração da distribuição já sugere, *per se* uma alteração na função da proteína. Além disso, o não endereçamento correto desta proteína ao retículo endoplasmático e Complexo de Golgi deve necessariamente implicar no comprometimento de sua glicosilação.

Avaliamos ainda a expressão de PrP^C nas células transfectadas com os mutantes através de imunodeteção, a fim de confirmarmos sua massa molecular. Para essa análise utilizamos a linhagem HEK293, devido a sua alta eficiência de transfecção.

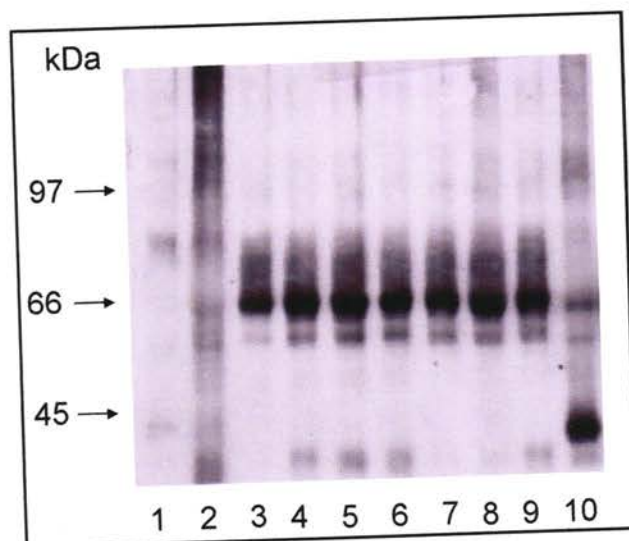


Legenda: Proteínas quimeras GFP-PrP^C transfectadas em SN56. A-B WT/129Met, C-D WT/129Val, E-F 102Leu/129Met, G-H 102Leu/129Val, I-J 105Leu/129Met, L-M 105Leu/129Val, N-O 117Val/129Met, P-Q 117Val/129Val (PrP^C encontra-se disperso no citoplasma). A Seta branca na figura G indica a região perinuclear.

Figura 13 - Imagem em microscopia confocal da sub-localização das proteínas quimeras.

Na Figura 14 pode-se observar que todos os mutantes exceto o 117Val/129Val apresentam-se com a massa molecular semelhante (aproximadamente 66 kDa) devido a fusão com GFP. Já a proteína com mutação no códon 117Val/129Val parece estar sendo degradada, sua

localização no gel está em torno de 45 kDa. Essa alteração na massa molecular pode ser causada por uma degradação da proteína. Que poderia ocorrer devido a localização citoplasmática desta proteína PrP^C mutante e sua possível exposição a maior degradação por processamento proteolítico.



Legenda: Western blot obtido a partir de extratos de células HEK 293 transfectadas com os mutantes de PrP^C e revelado com anticorpo anti-PrP^C policlonal (M235). 1-HEK sem transfectar, 2- HEK GFP, 3- WT/129Met, 4- WT/129Val, 5-102Pro/129Met, 6-102Leu/129Val, 7-105Leu/129Met, 8-105Leu/129Val, 9-117Val/129Met e 10-117Val/129Val.

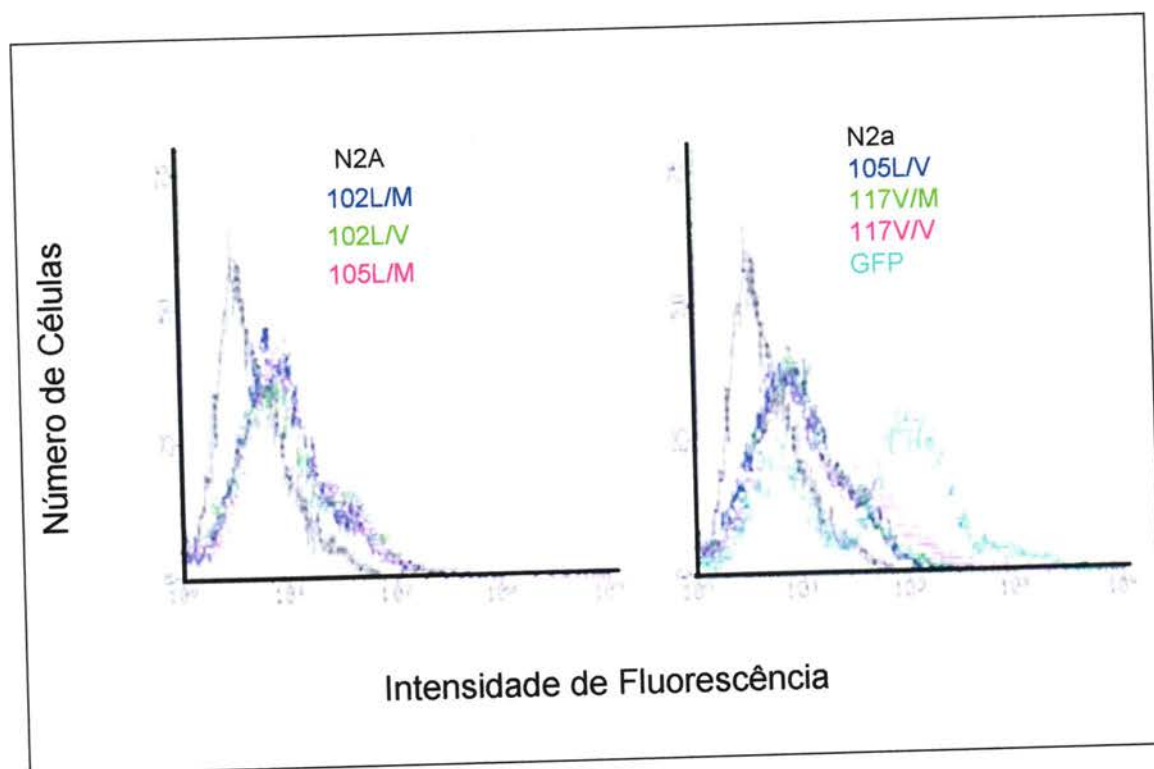
Figura 14 - Western blotting do pool de células HEK 293 transfectadas com os mutantes.

4.4 GERAÇÃO DE CLONES CELULARES DE CÉLULAS N2A TRANSFECTADAS COM pEGFP ASSOCIADO AOS MUTANTES DE PRP^C

As células N2a transfectadas com as quimeras pEGFP-PrP^C tipo selvagem e mutantes e selecionadas com antibiótico (G418), foram

analisadas inicialmente através do ensaio de citometria de fluxo apenas pela fluorescência emitida por GFP. Como observado na Figura 15, todas as células que receberam as construções emitem fluorescência quando comparadas ao controle (célula não transfectada). Conseqüentemente, isso indica que as células expressam tanto PrP^C tipo selvagem como mutantes, uma vez que GFP está sob o mesmo promotor de PrP^C.

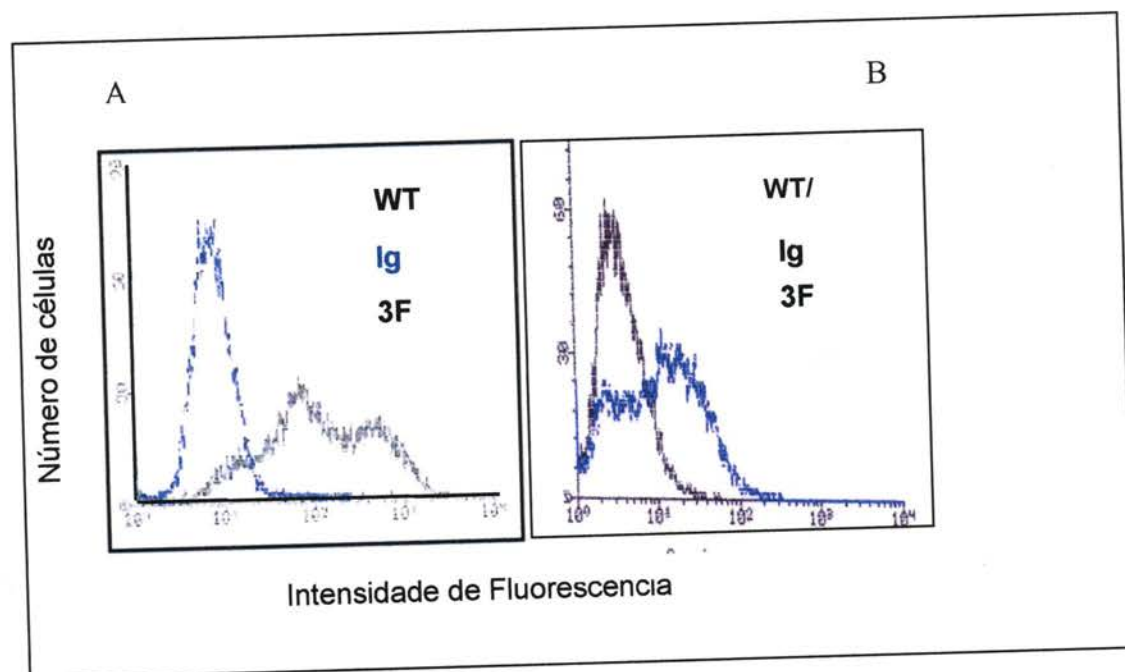
Após verificar que as células N2a transfectadas com as quimeras estavam expressando as construções GFP-PrP^C, confirmamos a expressão de PrP^C através de ensaios de citometria de fluxo utilizando o anticorpo monoclonal anti-PrP^C humano (3F4). Este anticorpo reconhece somente o PrP^C humano, possibilitando o reconhecimento apenas da proteína exógena na superfície celular (PrP^C humano fusionado a GFP) mas não de PrP^C endógeno murino.



Legenda: Histogramas representativos de ensaios de citometria de fluxo mostrando o deslocamento do pico de fluorescência de GFP em relação a célula N2a não transfectada (curva cinza), células transfectadas com **A**-102Leu/129Met, **B**-102Leu/129Val, **C**-105Leu/129Met, **D**-105Leu/129Val e a direita **E**-117Val/129Met, **F**-117Val/129Val e **G**-GFP.

Figura 15 - Expressão das construções GFP-PrP^C nas células N2a.

Na Figura 16 estão representados os histogramas das células transfectadas com o PrP^C tipo selvagem com metionina ou valina no códon polimórfico 129. Podemos notar um deslocamento das curvas que representam a expressão de PrP^C humano (quimeras GFP) nas células transfectadas.

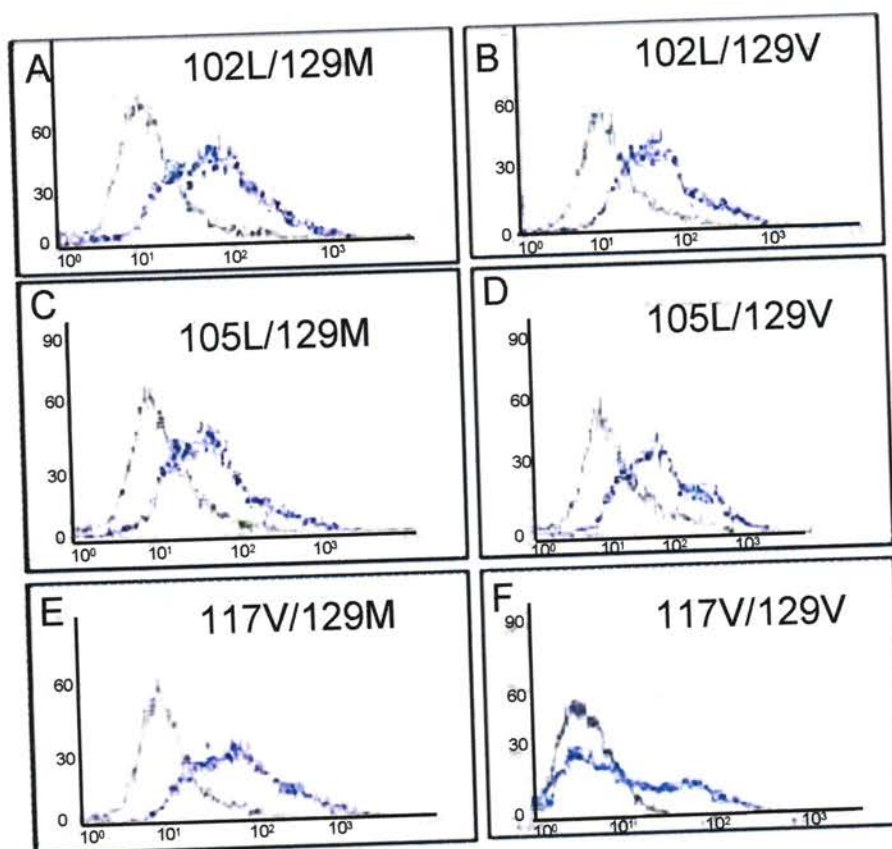


Legenda: As células N2a foram incubadas com IgG Pré Imune (curva azul) ou anticorpo monoclonal anti-PrP^C humano 3F4 (curva cinza). Painei **A**- a quimera pEGFP WT/129Met e painei **B**- WT/129Val.

Figura 16 - Histograma representativo do ensaio de citometria de fluxo.

Já na Figura 17 estão representados os histogramas do ensaio de citometria de fluxo das células transfectadas com as construções pEGFP-PrP^C contendo as mutações selecionadas, em combinação com as duas variantes do alelo polimórfico 129. Como podemos notar as células expressando os mutantes tiveram o pico de fluorescência deslocado, indicando sua expressão na superfície celular.

Durante a análise das células transfectadas, observamos que a população de células era bastante heterogênea quanto a expressão de PrP^C.

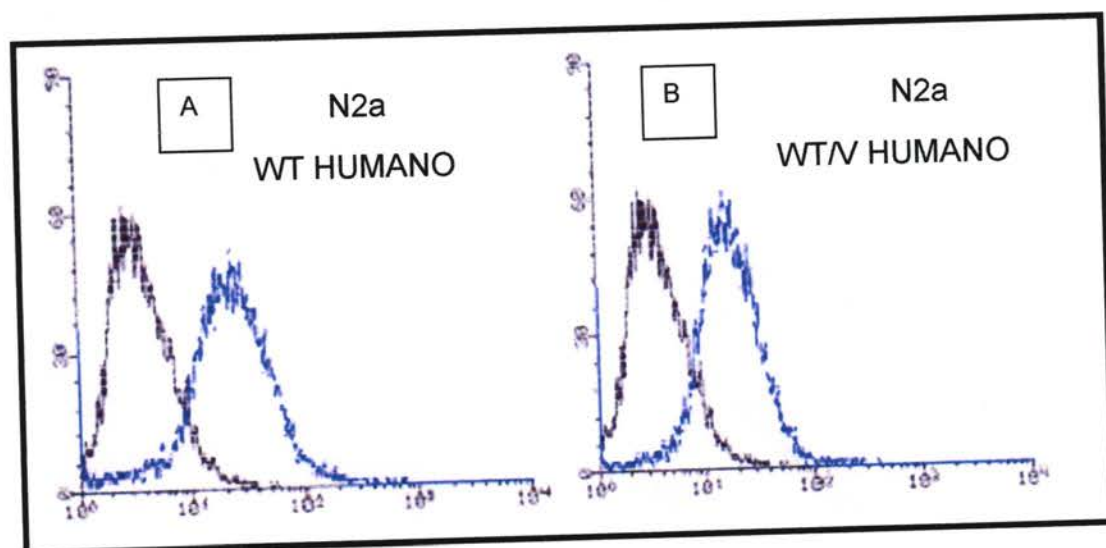


Legenda: As células foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-PrP^C humano 3F4 (curva azul), mostrando o deslocamento do pico de fluorescência em relação ao controle negativo IgG (curva cinza). Em A-102Leu/129Met, B-102Leu/129Val, C-105Leu/129Met, D-105Leu/129Val, E-117Val/129Met e F-117Val/129Val.

Figura 17 - Histograma representativo dos ensaios de citometria de fluxo

Há um deslocamento indicando que há células expressando a proteína mutante, mas também há células com níveis muito baixos de expressão. Com o intuito de selecionar somente as células com maior quantidade das proteínas mutantes, optamos por isolar clones celulares através de diluição seriada. Sendo assim, partindo de células transfectadas e selecionadas com G418, foram feitas diluições seriadas para a obtenção de aproximadamente 150 células que foram depositadas em placas de 96 poços, sempre sob seleção positiva com o antibiótico G418. Após o plaqueamento, os poços foram analisados ao microscópio e aqueles que

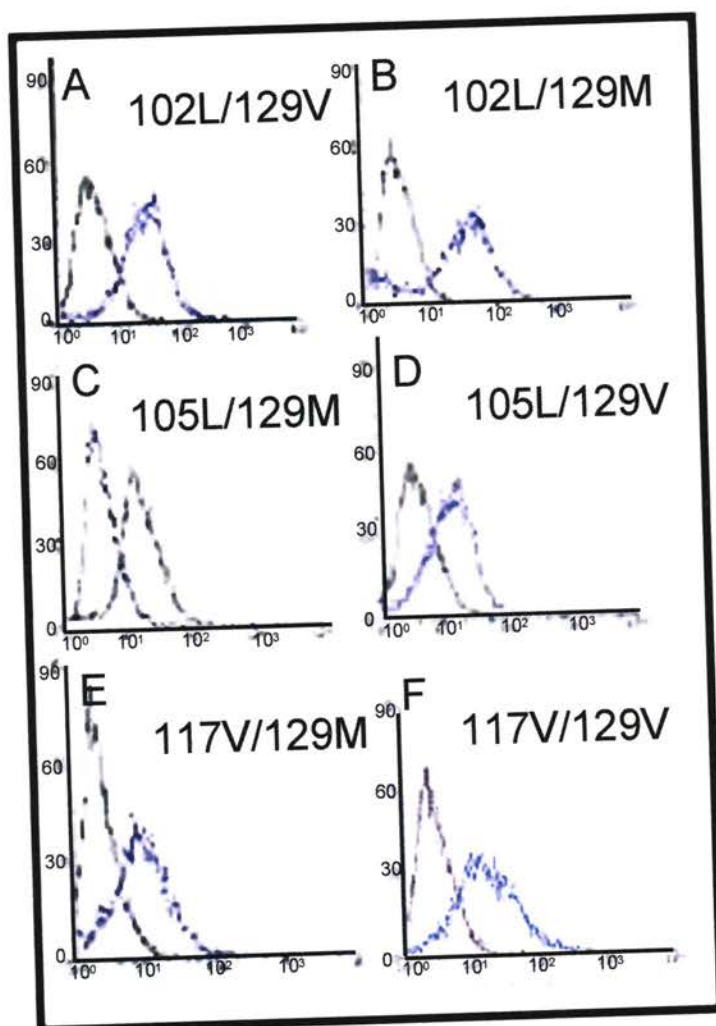
apresentavam apenas uma célula foram marcados e tiveram a multiplicação celular acompanhada. Quando as células atingiram a confluência foram transferidas para poços de 15mm e posteriormente para garrafas de cultura celular de 25cm². Estas células foram então analisadas por citometria de fluxo para a fluorescência de GFP.



Legenda: Histograma representativo de ensaios de citometria de fluxo com a leitura apenas da fluorescência de GFP. Mostrando o deslocamento do pico de fluorescência (curva azul) com relação a N2a não transfectada. Painel A clone pEGFP PrP^C WT/129Met e painel B pEGFP- PrP^C WT/129Val.

Figura 18 - Clones de células N2a transfectadas com PrP^C (polimorfismos no codon 129).

A Figura 18 apresenta os histogramas obtidos pela citometria de fluxo de dois clones de células transfectadas com PrP^C tipo selvagem contendo metionina ou valina no códon 129., derivados de clones isolados por diluição limitante.



Legenda: Histograma representativo de ensaios de citometria de fluxo com leitura apenas da fluorescência de GFP. Deslocamento do pico de fluorescência das células que expressam os mutantes (curva azul) em relação a N2a não transfectada (curva cinza).

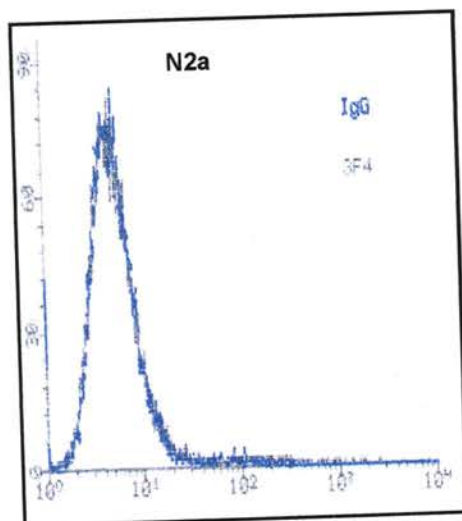
Figura 19 - Clones das células transfectadas com PrP^C (GFP ou mutações nos codons 102, 105 e 117).

A Figura 19 apresenta os histogramas obtidos por citometria de fluxo de seis clones de células transfectadas com PrP^C apresentando as mutações nos códons 102, 105 e 117 em associação ao polimorfismo no

códon 129. Cabe ressaltar que após a seleção clonal a expressão das quimeras se manteve homogênea.

Foram selecionados e analisados, um total de 110 clones. Destes, alguns dos que apresentavam fluorescência de GFP semelhante foram selecionados para a realização do experimento de migração. Dos clones analisados, obtivemos 26 com expressão adequada das quimeras.

Para nos certificarmos quanto a expressão dos mutantes na superfície celular dos clones foi realizada um segundo ensaio de citometria de fluxo com o anticorpo 3F4 que reconhece a proteína PrP^C humana, (Figuras 20 e 21).



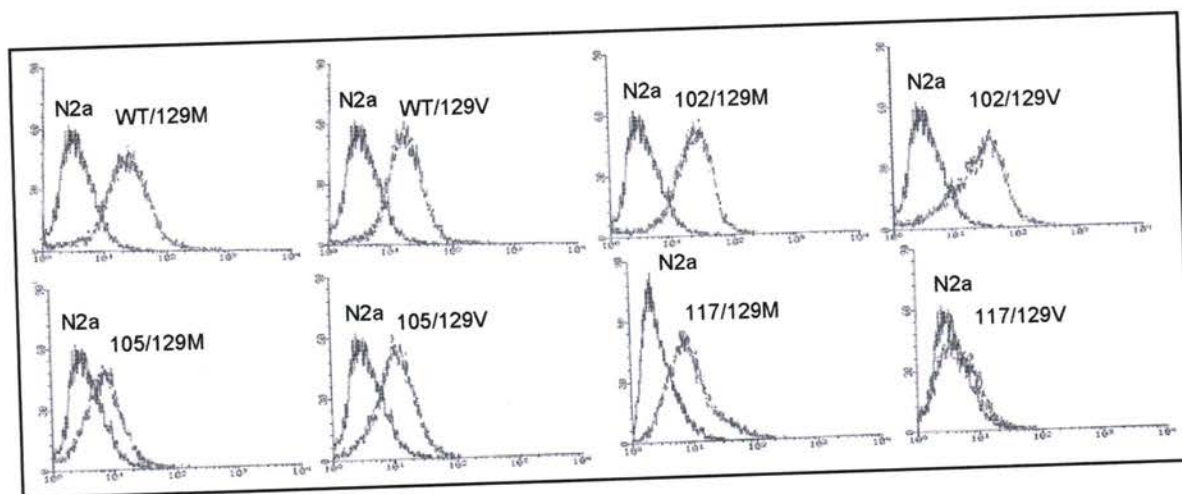
Legenda: PrP^C endógeno (camundongo) não é reconhecimento de pelo anticorpo 3F4.

Figura 20 - Expressão de PrP^C em células N2a.

Para avaliar a expressão de PrP^C (endógeno mais ectópico) entre os clones testamos um anticorpo que reconhecesse tanto a proteína endógena (PrP^C murino) quanto a proteína exógena (PrP^C humano). Desta forma

poderíamos estimar quanto de PrP^C total há na superfície celular e o quanto de PrP^C foi acrescentado a célula.

O anticorpo escolhido foi o policlonal (M235) que produzimos em nosso laboratório inoculando PrP^C recombinante em camundongos deficientes para o gene de PrP^C (ZANATA et al. 2002). Como controle do reconhecimento do anticorpo utilizamos o anticorpo 3F4.

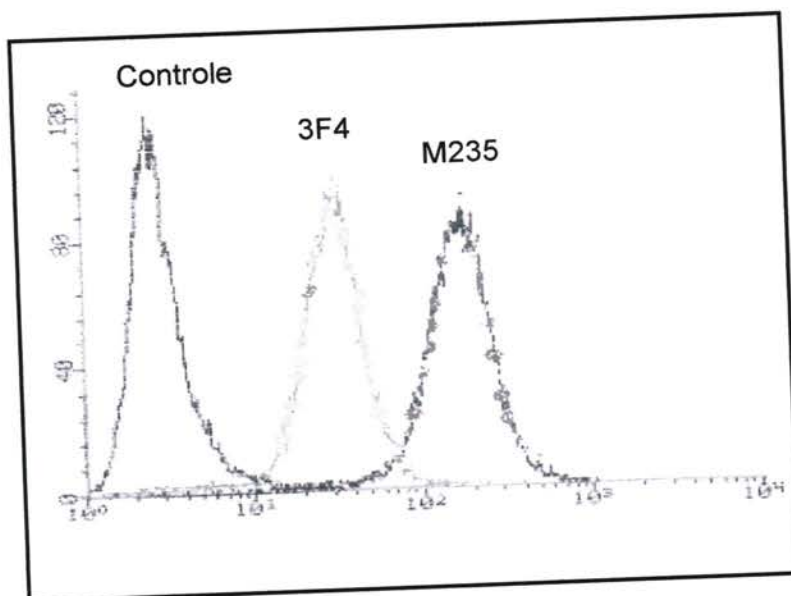


Legenda: Histograma representativo do ensaio de citometria de fluxo com o anticorpo 3F4 para avaliar a expressão de PrP^C exógeno. N2a- célula controle, WT/129Met, WT/129Val, 102Leu/129Met, 102Leu/129Val, 105Leu/129Met, 105Leu/129Val, 117Val/129Met e 117Val/129Val.

Figura 21 - Citometria de fluxo dos clones de N2a com o anticorpo 3F4.

Pode-se observar na Figura 22 onde foram testadas células HEK 293, derivadas de rim de embrião humano), que o anticorpo policlonal (M235) apresentou um deslocamento maior do que o anticorpo monoclonal 3F4. Indicando que o anticorpo M235 reconhece tanto a proteína PrP^C de camundongo como a proteína ectópica humana. Cabe ressaltar que foi

realizada uma curva de titulação para ambos anticorpos e o melhor título foi representado nas Figuras 20, 21 e 22.



Legenda: Teste em células humanas HEK 293 para avaliar se o anticorpo policlonal M235 reconhece PrP^C humano à semelhança do anticorpo monoclonal 3F4. O gráfico demonstra que o M235 apresenta um deslocamento de fluorescência maior que o anticorpo 3F4 e que portanto além de reconhecer a PrP^C de camundongo também reconhece a PrP^C humana.

Figura 22 - Anticorpo policlonal M235 reconhece PrP^C humano.

Com esse resultado, prosseguimos os experimentos quantitativos da expressão de PrP^C nos clones isolados usando o anticorpo M235. A vantagem do seu uso neste estudo se dá devido a capacidade deste anticorpo em reconhecer tanto a proteína endógena quanto ectópica, permitindo realizar análises comparativas e determinar valores de expressão relativa da proteína PrP^C humana.

4.5 ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO DE PRPC NOS CLONES DE CÉLULAS N2A TRANSFECTADAS COM OS MUTANTES DE PRPC

Inicialmente foi avaliado um clone de células N2a por mutação de interesse (denominados clones #1). Os valores de fluorescência média para cada clone obtidos a partir de dois ensaios independentes estão colocados na Tabela 1. O valor de fluorescência para o clone de células N2a que recebeu o vetor vazio (apenas o vetor de expressão de GFP) foi considerado igual a 1 e os outros valores são relativos a este. Podemos observar que os clones expressam no máximo 3 vezes mais proteína ectópica do que endógena. Este é um ponto positivo uma vez que uma superexpressão da proteína ectópica pode causar alterações na funcionabilidade celular. Por outro lado, há clones como o Leu105/129Met e o Val117/129Val cuja expressão da proteína PrP^C é semelhante ao da célula que recebeu apenas o vetor vazio, portanto que não expressa PrP^C ectópico.

Tabela 1 - Média de intensidade de fluorescência dos Clones #1 através de citometria de fluxo.

Média de intensidade de Fluorescência									
	GFP	WT	WT/V	102	102V	105	105V	117	117V
Ensaio 1	60,43	97,34	119,7	187,69	128,64	61,4	129,8	82,49	57,25
Valor Relativo 1 GFP	1	1,61	1,97	3,11	2,13	1,02	2,15	1,37	0,95
Ensaio 2	14,2	31,62	50,03	32,2	57,23	22,47	38,2	31,06	11,86
Valor relativo 2 GFP	1	2,23	3,52	2,27	4,03	1,58	2,69	2,19	0,84

Valores (média de intensidade de fluorescência) de dois ensaios independentes.



Um segundo grupo de clones (clones #2) foi também avaliado por citometria de fluxo para quantificação da expressão de PrP^C onde foram quantificadas as intensidades de fluorescência (valor médio de intensidade de fluorescência dos eventos lidos) fornecida pelo programa BD CellQuest Pro. A Tabela 2 mostra estas quantificações bem como os valores relativos de expressão de PrP^C em comparação com as células N2a que receberam o vetor vazio. Este último clone (N2a-GFP) é diferente daquele usado como controle na Tabela 1. Para este segundo grupo de clones pode-se verificar a expressão ectópica de PrP^C quando comparados ao clone apenas com GFP, com excessão dada aos clones WT e ao 117Val/129Val.

Tabela 2 - Média de intensidade de fluorescência dos Clones #2 através de citometria de fluxo.

Média de intensidade de Fluorescência

	N2a	GFP	WT	WT/V	102	102V	105	105V	117	117V
Ensaio 1	51,63	42,64	29,47	146,66	111,66	190,19	74,44	90,9	39,83	39,16
Valor Relativo 1 WT	1,21	1	0,69	3,43	2,61	4,46	1,74	2,13	0,93	0,92
Ensaio 2	83,27	68,18	69,02	188,12	217,91	191,34	103,11	159,75	95,72	72,32
Valor relativo 2 WT	1,22	1	1,01	2,75	3,19	2,80	1,51	2,34	1,40	1,06

Valores (média de intensidade de fluorescência) de dois ensaios independentes.

A expressão de PrP^C não foi alterada quando as células N2a receberam o vetor vazio e expressaram apenas a proteína GFP (células transfectadas apenas com o vetor vazio), indicando que esta proteína não interfere nas concentrações endógenas de PrP^C. Por outro lado, o mutante

117Val 129Val tanto do grupo de clones #1 (tabela 1) como do grupo #2 (Tabela 2) não apresentam aumento de PrP^C na superfície celular. Este fato pode ser explicado por este mutante ficar retido no citoplasma (Figura 13, figura 19F) e apresentar uma alta degradação (Figura 14).

4.6 ENSAIOS DE MIGRAÇÃO CÉLULAR À VITRONECTINA DOS CLONES DE N2A EXPRESSANDO PRP^C MUTANTES

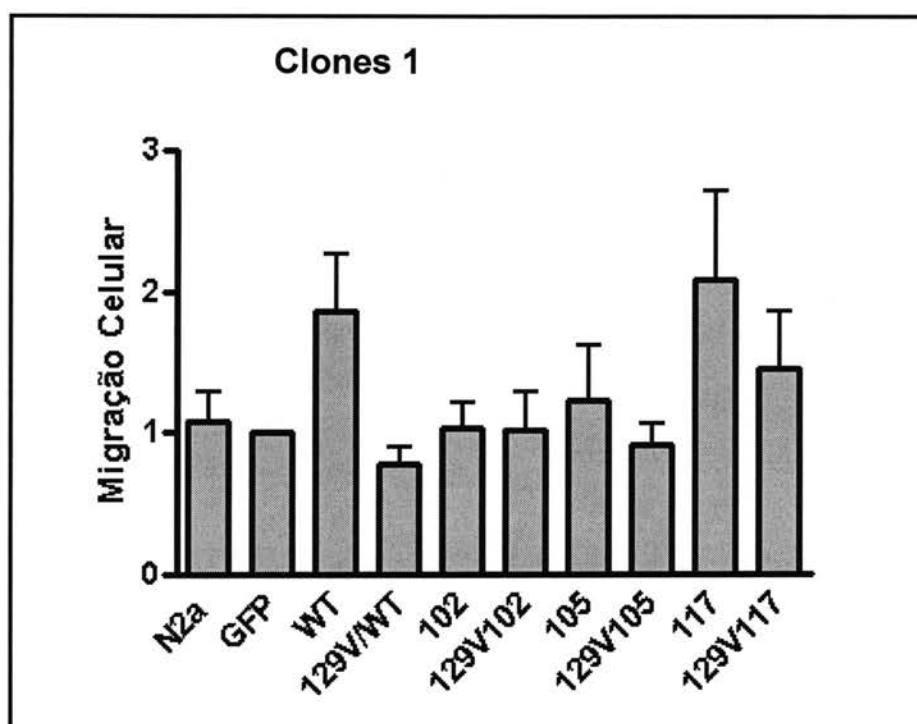
A Figura 23 mostra resultados de ensaios independentes de migração celular à vitronectina do primeiro grupo de clones isolado contendo cada uma das mutações WT/129Met, WT/129Val, 102LeuL/129Met, 102Leu/129Val, 105Leu/129Met, 105Leu/129Val, 117Val/129Met, 117Val/129Val e clones com vetor vazio (GFP).

Os resultados de todos os ensaios foram normalizados em relação aos clones GFP. Este parece ser o melhor controle uma vez que leva em conta a possibilidade da expressão de GFP interferir na migração celular.

Não houve diferença de migração das células à vitronectina quando os clones com os mutantes de PrP^C foram comparados com aquele expressando a proteína normal (Figura 23).

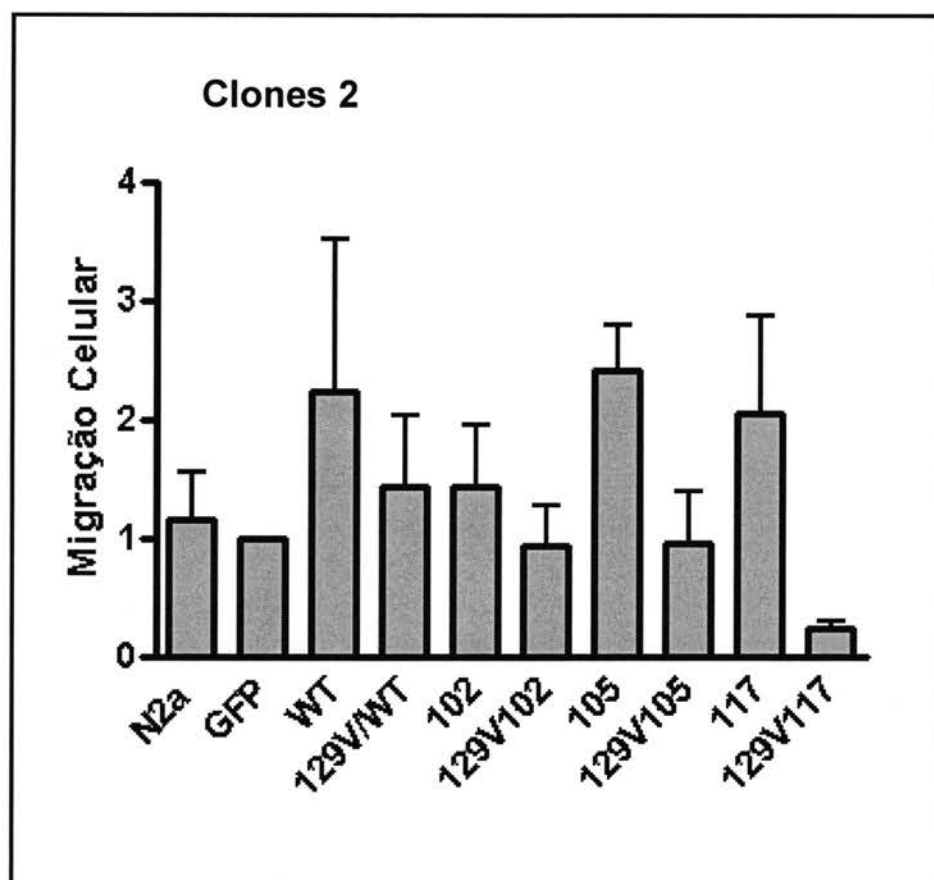
O mesmo experimento de migração à vitronectina foi realizado para o grupo de clones #2 e novamente não houve diferença entre eles (figura 24). Também foi realizado o teste Mann-Whitney para a comparação das médias independentes entre os clones 1 e clones 2, que mostrou não haver diferença estatística entre estes valores (Figura 25). Isso indica que os resultados obtidos não foram dados por efeitos clonais entre as células.

Portanto, estes dados apontam que mutações nos aminoácidos 102, 105 e 117, localizados dentro do sítio de interação de PrP^C a vitronectina, combinadas com o polimorfismo 129Met ou 129Val em PrP^C não alteram a capacidade das células de migração à vitronectina.



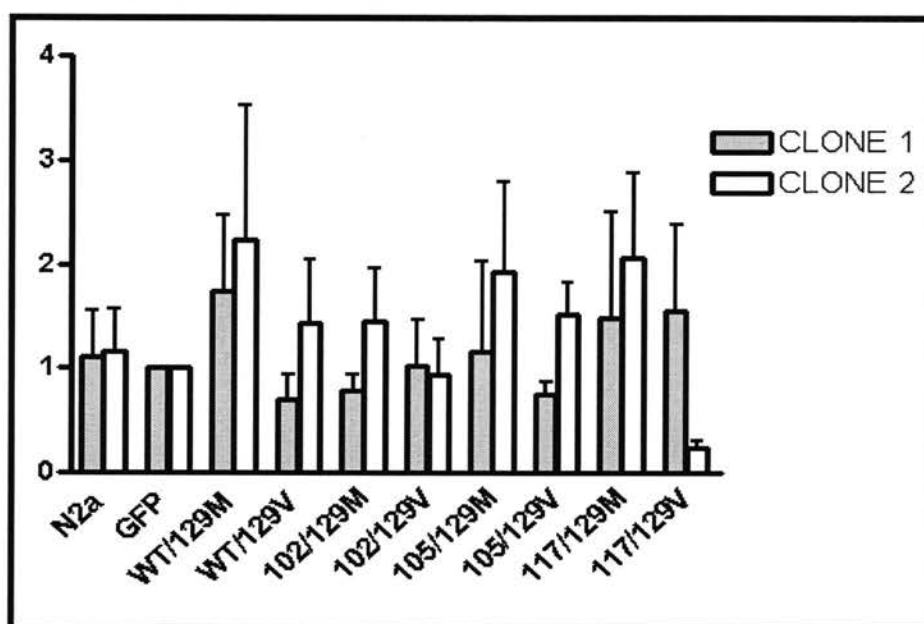
Legenda: Gráficos representativos de 6 ensaios independentes de migração celular com os clones N2a (controle de célula sem transfectar), GFP (controle de célula transfectada apenas com o vetor GFP), WT/129Met, WT/129Val, 102Leu/129Met, 102Leu/129Val, 105Leu/129Met, 105Leu/129Val, 117Val/129Met, 117Val/129Val. A migração do clone transfectado apenas com GFP foi considerada igual a um e o valor dos clones é relativo a este. Análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla Tukey-HSD. Considerou-se uma diferença estatisticamente significativa quando $p < 0,05$ em relação a migração dos clones que expressam PrP^C WT.

Figura 23 - Ensaio de migração à vitronectina com os clones N2a #1.



Legenda: Gráficos representativos de 3 ensaios independentes de migração celular com os clones N2a (controle de célula sem transfectar), GFP (controle de célula transfectada apenas com o vetor GFP), WT/129Met, WT/129Val, 102Leu/129Met, 102Leu/129Val, 105Leu/129Met, 105Leu/129Val, 117Val/129Met, 117Val/129Val. A migração do clone transfectado apenas com GFP foi considerada igual a um e o valor dos clones é relativo a este. Análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla Tukey-HSD. Considerou-se uma diferença estatisticamente significativa quando $p < 0,05$ em relação a migração dos clones que expressam PrP^C WT.

Figura 24 - Ensaio de migração à vitronectina com os clones N2a #2.



Legenda: N2a (controle de célula sem transfectar), GFP (controle de célula transfectada apenas com o vetor GFP), WT/129Met, WT/129Val, 102Leu/129Met, 102Leu/129Val, 105Leu/129Met, 105Leu/129Val, 117Val/129Met, 117Val/129Val. Comparação entre médias independentes pelo teste Mann-Whitney. Considerou-se uma diferença estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

Figura 25 - Gráfico comparativo dos valores relativos de migração à vitronectina dos clones N2a #1 e #2.

4.7 ENSAIOS DE MIGRAÇÃO CELULAR À STI1 DOS CLONES DE N2A EXPRESSANDO PRP^C MUTANTES

O presente trabalho previa a realização de ensaios de migração à STI1 uma vez que estes mutantes estão inseridos dentro ou muito próximos ao sítio de PrP^C que liga esta proteína. Entretanto, nenhuma capacidade migratória das células foi observada quando se usava STI1 em ensaios de haptotaxia. Portanto, esta abordagem ficou impossibilitada no presente trabalho.

5 DISCUSSÃO

Inúmeros trabalhos sobre mutações no gene de PrP^C já foram publicados, porém, a grande maioria destes referem-se ao fenótipo das doenças de prion, biossíntese e processamento das proteínas mutadas. Uma das hipóteses, que é largamente aceita é que o acúmulo de PrP^{Sc} ou de uma forma tóxica da molécula de prion seja a principal causadora da doença (HETZ et al. 2003). A natureza da partícula tóxica ainda é alvo de grande discussão (SILVEIRA et al. 2005).

Entretanto, dois fatos importantes devem ser levados em conta: a descrição de que em algumas formas das doenças por prions há degeneração neuronal sem que se detecte depósitos de PrP^{Sc} (DORANDEU et al. 1998; GRAY et al. 1999; CHRÉTIEN et al. 1999), e o número crescente de descrições de funções celulares de PrP^C (MARTINS et al. 2002). Portanto, reforçando a hipótese de que a perda de função de PrP^C pode contribuir para a patogênese desta doença.

Uma vez que existem formas da doença causadas por mutações específicas no gene *PRNP*, fica evidente que verificar a perda de função nestas moléculas é uma abordagem bastante promissora.

Neste estudo foram geradas construções GFP- PrP^C apresentando as mutações Pro102Leu, Pro105Leu e Ala117Val combinadas com os polimorfismos 129Met ou 129Val, sendo que todas estas formas mutantes estão relacionadas a GSS. Estas mutações localizam-se no sítio de ligação a STI1 e a Vitronectina.

Nossos resultados mostraram que as construções GFP- PrP^C do tipo selvagem 129Met/WT e 129Val/WT assim como os mutantes 129Met/102Leu, 129Val/102Leu, 129Met/105Leu, 129Val/105Leu e 129Met/117Val estão localizadas corretamente na membrana plasmática e na região perinuclear. Já o mutante 129Val/117Val apresentou-se disperso pelo citoplasma da célula.

A alteração na compartimentalização celular do mutante 117 é um dado inédito na literatura. É de particular interesse o fato deste mutante só ter sua compartimentalização alterada quando associado ao polimorfismo 129Val. Este dado é extremamente relevante e a modificação ocorrida deve alterar a função fisiológica de PrP^C, apesar de não termos observado nada específico com relação à migração em vitronectina.

Há dados na literatura que mostram que mesmo o PrP^C tipo selvagem pode ser ocasionalmente retido no citosol mas não se sabe se esta compartimentalização tem alguma função fisiológica. Não há um consenso se a forma citoplasmática de PrP^C é ou não tóxica e se isso pode ser associado com alguma patogênese neuronal (MA e LINDQUIST 2001; MA et al. 2002; MIRONOV et al. 2003; FIORITI et al. 2005; CAMPANA et al. 2006; ORSI et al. 2006; WANG et al. 2006). De fato, em cultura de neurônios humanos PrP^C citosólico não é tóxico e pode contrariamente ter funções anti-apoptóticas (ROUCOU et al. 2003).

Nossos dados indicam que a presença da proteína no citoplasma não parece ser tóxica uma vez que as células proliferam normalmente e sua aderência a placa de cultura não foi alterada.

Por outro lado, é bastante conhecido que o polimorfismo do codon129 no gene *PRNP* podem afetar a susceptibilidade a doença, porém o mecanismo preciso pelo qual isto ocorre ainda não foi estabelecido (ALPEROVITCH et al. 1999). O códon 129 no gene *PRNP* pode afetar o fenótipo clínico-patológico de CJD e Insonia Familiar Fatal (CORTELLI et al. 1999). O genótipo Met129Met aumenta a susceptibilidade à doenças por prions (VALLERON et al. 2001) enquanto Val129Val protege contra a BSE e vCJD (WADSWORTH et al. 2004).

O endereçamento incorreto de PrP^C ao retículo endoplasmático e Complexo de Golgi deve necessariamente implicar no comprometimento de sua glicosilação. Na literatura há muitos trabalhos que estudam 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 (ROGERS et al. 1990; DEARMOND et al. 1997; LEHMANN e HARRIS 1997). Mas a forma não glicosilada já foi detectada na superfície de diferentes linhagens celulares quando transfectadas com alguns 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.

Nossos dados sugerem que não há uma variação importante no padrão de glicosilação dos mutantes estudados. Mas deve-se salientar, no entanto, que as nossas observações sobre o padrão de glicosilação são apenas circunstanciais, uma vez que não foi realizado nenhum ensaio

enzimático de deglicosilação específico a fim de nos certificarmos 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.

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. Destas foram selecionados clones através do método de diluição limitante. Estes clones foram utilizados nos ensaios de migração celular.

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, a polimerização de actina direciona uma protusão da membrana, que é estabilizada pela ligação à matriz extracelular (MEC). O conceito de haptotaxia foi estabelecido há muitos anos e reflete a motilidade direcional ou projeção de células 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).

Os estímulos migratórios utilizados neste trabalho foram a Vitronectina e STI1, respectivamente uma glicoproteína multifuncional relacionada a processos metabólicos como adesão e migração celular entre outros (SEGER e SHALTIEL 2000) e uma co-chaperonina relacionada a processos de neuroproteção (CHIARINI et al. 2002; ZANATA et al. 2002). O

sítio de ligação de vitronectina e STI1 à PrP^C estão embricados (aas 106 a 128 na molécula de camundongo) e as mutações de PrP^C estudadas neste trabalho estão inseridas ou muito próximas a este domínio. Portanto, nossa idéia inicial era que estas proteínas mutantes apresentassem uma alteração na interação com vitronectina ou STI1 afetando a resposta celular desencadeada por cada um destes complexos.

Uma observação importante com relação aos clones gerados é que não há superexpressão da proteína selvagem e nem das mutantes de PrP^C. Consideramos isso vantajoso uma vez que a superexpressão de qualquer proteína pode levar a um desbalanço celular e a resultados que poderiam não refletir nos mecanismos fisiológicos de PrP^C.

Não foram detectadas diferenças nos experimentos de migração realizados com o estímulo de Vitronectina a partir de dois clones diferentes expressando a proteína tipo selvagem ou as mutantes combinadas aos polimorfismos em 129. Indicando portanto, que estes resultados não foram ocasionados por diferenças clonais.

Chamou nossa atenção que a expressão de mais moléculas de PrP^C do tipo selvagem (GFP-PrP^C), nas células que já expressavam PrP^C endógeno (N2A), não foi capaz de alterar as taxas de migração. Isso pode significar que PrP^C tenha uma menor participação nos processos de migração quando comparado a outros ligantes de vitronectina, como as integrinas. Além disso, é possível que as vias de sinalização responsáveis por tal fenômeno estejam saturadas com a presença por exemplo de de integrinas e do próprio PrP^C endógeno.

Os experimentos de migração por haptotaxia usando STI1 mostraram que esta proteína não tem atividade atraente. Uma possibilidade é que quando aderida a um substrato STI1 oculte o sítio de ligação a PrP^C. Vale ressaltar que em todos os experimentos abordados pelo grupo STI1 sempre foi usada na forma solúvel. Estudos futuros abordarão outras atividades do complexo PrP^C-STI1 como sobrevivência e diferenciação celulares nos mutantes de PrP^C.

Vale ressaltar que nosso grupo mostrou que outros mutantes de PrP^C, localizados no sítio de interação com laminina (códon 171 e 178) apresentaram deficiência na migração celular quando esta molécula da matriz extracelular foi usada em ensaios de haptotaxia (MACHADO 2007). Portanto, parece que ensaios específicos devem ser usados para abordar cada um destes mutantes e seu respectivo ligante.

Desta forma, este trabalho contribuiu de forma importante na geração de ferramentas importantes para continuação destes estudos além de apontar que ensaios biológicos diferentes deverão ser usados na tentativa de identificar a perda de função de proteínas mutantes de PrP^C.

6 CONCLUSÕES

- ✓ As construções GFP-PrP^C 129Met, GFP-PrP^C 129Val, GFP-PrP^C 102Leu/129Met; GFP-PrP^C 102Leu/129Val; GFP-PrP^C 105Leu/129Met; GFP-PrP^C 105Leu/129Val; GFP-PrP^C 117Val/129Met foram corretamente endereçadas à membrana plasmática e apresentam uma massa molecular de cerca de 60KDa.
- ✓ A construção GFP-PrP^C 117Val/129Val fica retida no citoplasma celular e a forma predominante detectada em ensaios de western blotting tem uma massa molecular de cerca de 45KDa.
- ✓ Células N2A transfectadas com as quimeras GFP-PrP^C 129Met, GFP-PrP^C 129Val, GFP-PrP^C 102Leu/129Met; GFP-PrP^C 102Leu/129Val; GFP-PrP^C 105Leu/129Met; GFP-PrP^C 105Leu/129Val; GFP-PrP^C 117Val/129Met e GFP-PrP^C 117Val/129Val não apresentam alteração na migração celular desencadeada por vitronectina.
- ✓ STI1 não foi capaz de induzir migração celular quando usada em ensaios de haptotaxia.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alperovitch A, Zerr I, Pocchiari M, et al. Codon 129 prion protein genotype and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. **Lancet** 1999; 353:1673-4.

Arnold AS, Laporte V, Dumont S, et al. Comparing reagents for efficient transfection of human primary myoblasts: Fugene 6, Effectene and ExGen 500. **Fundam Clin Pharmacol** 2006; 20:81-9.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley & Sons; 1994. The polymerase chain reaction; p.15.0.3-15.8.8.

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

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

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

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; 119:433-42.

Carter SB. Haptotaxis and the mechanism of cell motility. **Nature** 1967; 213:256-60.

Cervenakova L, Bueteftisch C, Lee HS, et al. Novel PRNP sequence variant associated with familial encephalopathy. **Am J Med Genet** 1999; 88: 653-6.

Chen ZL, Indyk JA, Strickland S. The hippocampal laminin matrix is dynamic and critical for neuronal survival. **Mol Biol Cell** 2003; 14:2665-76.

Chesebro B, Race R, Wehrly K, et al. Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. **Nature** 1985; 315:331-3.

Chrétien F, Dorandeu A, Adle-Biassette H, et al. A process of programmed cell death as a mechanisms of neuronal death in prion diseases. **Clin Exp Pathol** 1999; 47:181-91.

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

Cortelli P, Gambetti P, Montagna P, Lugaresi E. Fatal familial insomnia: clinical features and molecular genetics. **J Sleep Res** 1999; 8 (Suppl 1):23-9.

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

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

Dearmond SJ, Sanches H, Yehily F, et al. Selective neuronal targeting in prion disease. **Neuron** 1997; 19:1337-48.

Del Bo R, Comi GP, Giorda R, et al. The 129 codon polymorphism of the prion protein gene influences earlier cognitive performance in Down syndrome subjects. **J Neurol** 2003; 250:688-92.

DeMarco ML, Daggett V. Local environmental effects on the structure of the prion protein. **C R Biol** 2005; 328:847-62.

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 GSS. **Biochem Biophys Res Commun** 1989; 163:974-9.

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

Ermonval M, Mouillet-Richard S, Codogno P, Kellermann O, Botti J. Evolving views in prion glycosylation: functional and pathological implications. **Biochimie** 2003; 85:33-45.

Finckh U, Muller-Thomset T, Mann U et al. High prevalence of pathogenic mutation in patients with early onset dementia detected by sequence analyses of four different genes. **Am J Hum Genet** 2000; 66:110-7.

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

Flechsigg E, Hegyi I, Enari M, Schwarz P, Collinge J, Weissmann C. Transmission of scrapie by steel-surface-bound prions. **Mol Med** 2001; 7:679-84.

Ford MJ, Burton LJ, Graham CH, et al. A marked disparity between the expression of prion protein and its message by neurones of the CNS. **Neuroscience** 2002; 111:533-51.

Ghetti B, Piccardo P, Spillantini MG, et al. Vascular variant of prion protein cerebral amyloidosis with tau-positive neurofibrillary tangles: the phenotype

of the stop codon 145 mutation in PRNP. **Proc Natl Acad Sci USA** 1996; 93:744-8.

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

Gray F, Chrétien F, Adle-Biassette H, et al. Neuronal apoptosis in Creutzfeldt-Jakob disease. **J Neuropathol Exp Neurol** 1999; 58:321-8.

Goldfarb LG, Brown P, McCombie WR, et al. Transmissible familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with five, seven, and eight extra octapeptide coding repeats in the PRNP gene. **Proc Natl Acad Sci USA** 1991; 88:10926-30.

Goldfarb LG, Brown P, Little BW, et al. A new (two-repeat) octapeptide coding insert mutation in Creutzfeldt-Jakob disease. **Neurology** 1993; 43:2392-4.

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

Hajj GNM. **A proteína prion celular e seus ligantes-Vitronectina, STI1 e Laminina- nos mecanismos de plasticidade neuronal**. São Paulo; 2004. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Hajj GN, Lopes MH, Mercadante AF, et al. Cellular prion protein interaction with vitronectin supports axonal growth and is compensated by integrins. **J Cell Sci** 2007; 120:1915-26.

Hayman EG, Pierschbacher MD, Ohgren Y, Ruoslahti E. Serum spreading factor (vitronectin) is present at the cell surface and tissues. **Proc Natl Acad Sci USA** 1983; 80:4003-7.

Hermes J, Tings T, Gall S, et al. Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. **J Neuroscience** 1999; 19:8866-75.

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

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

Hsiao K, Baker HF, Crow TJ, et al. Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. **Nature** 1989; 338:342-5.

Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell** 2002; 110:673-87.

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

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

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; 81:2555-63.

Landemberger MC. **The role of cellular prion in models of experimental seizure and evaluation of PRNP gene polymorphisms in patients with**

epilepsy. São Paulo; 2006. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Lang CJG, Heckmann JG, Neundorfer B. Creutzfeldt-Jakob disease via dural and corneal transplants. **J Neurological Sc** 1998; 160:128-39.

Lawson VA, Collins SJ, Masters CL and Hill AF. Prion Protein glycosylation. **J Neurochem** 93. 793-801, 2005.

Lehmann S, Harris DA. Blockade of glycosylation promotes acquisition or scrapie properties by the prion protein in culture cells. **J Biol Chem** 1997; 272:21479-87.

Linden R, Martins VR, Prado A M, Cammarola M, Isquierdo I A, Brentani R R, Physiology of Prion Protein, **Physiol Rev**, *in press*.

Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RSG, et al. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. **Lancet** 2004; 363:417-21.

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

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

Ma J, Lindquist S. Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001; 98:4955-60.

Ma J, Wollmann R, Lindquist S. Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. **Science** 2002; 298:1781-5.

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

Martins VR, Brentani RR. The biology of the celular prion protein. **Neurochem Int** 2002; 41:353-5.

Mastrianni JA, Iannicola C, Myers RM, DeArmond S, Prusiner SB. Mutation of the prion protein gene at codon 208 in familial Creutzfeldt-Jakob disease. **Neurology** 1996; 47:1305-12.

Medori R, Montagna P, Tritschler HJ, et al. Fatal familial insomnia - a 2Nd kindred with mutation of prion protein gene at codon-178. **Neurology** 1992; 42:669-70.

Mironov A, Latawiec D, Wille H, et al. Cytosolic prion protein in neurons. **J Neuroscience** 2003; 23:7183-93.

Muras GA. **Avaliação da participação de PrPc em fenômenos associados a tumorigênese experimental**. São Paulo; 2005. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Neuendorf E, Weber A, Saalmueller A, et al. 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; 279:53306-16.

Nitrini R, Rosemberg S, Passos-Bueno MR et al. Familial spongiform encephalopathy associated with a novel prion protein gene mutation. **Ann Neurol** 1997; 42:138-46.

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

Orsi A, Fioriti L, Chiesa R, Sitia R. Conditions of endoplasmic reticulum stress favor the accumulation of cytosolic prion protein. **J Biol Chem** 2006; 281:30431-8.

Papassotiropoulos A, Wollmer MA, Aguzzi A, Hock C, Nitsch RM, de Quervain DJ. The prion gene is associated with human long-term memory. **Hum Mol Genet** 2005; 14:2241-6.

Piccardo P, Dlouhy SR, Lievens PM, et al. Phenotypic variability of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease is associated with prion protein heterogeneity. **J Neuropathol Exp Neurol** 1998; 57:979-88.

Peoc'h K, Manivet P, Beaudry P, et al. Identification of three novel mutations (E196K, V203I, E211Q) in the prion protein gene (PRNP) in inherited prion diseases with Creutzfeldt-Jakob disease phenotype. **Hum Mutat** 2000; 15:482.

Pocchiari M, Salvatore M, Cutruzzola F, et al. A new point mutation of the prion protein gene in Creutzfeldt-Jakob disease. **Ann Neurol** 1993; 34:802-7.

Prusiner SB, Torchia M, Westaway D. Molecular-biology and genetics of prions - implications for sheep scrapie, mad cows and the bse epidemic. **Cornell Veterinarian** 1991; 81:85-101.

Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. **Science** 1982; 216:136-44.

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

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

Riek R, Hornemann S, Wider G, Glockshuber R, Wuthrich K. NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). **FEBS Lett** 1997; 413:282-8.

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.

Roucou X, Guo Q, Zhang Y, Goodyer CG, LeBlanc AC. Cytosolic prion protein is not toxic and protects against Bax-mediated cell death in human primary neurons. **J Biol Chem** 2003; 278:40877-81.

Sales N, Hassig R, Rodolfo K, et al. Developmental expression of the cellular prion protein in elongating axons. **Eur J Neuroscience** 2002; 15:1163-77.

Salès N, Hässig R, Rodolfo K, Di Giamberardino L, Traiffort E, Ruat M, Frétier P, Moya KL. Developmental expression of the cellular prion protein in elongating axons **Eur J Neurosci.** 2002 -1163-77.

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

Seger D, Shaltiel S. Evidence showing that the two-chain form of vitronectin is produced in the liver by a selective furin cleavage. **FEBS Lett** 2000; 480:169-74.

Silveira JR, Raymond GJ, Hughson AG, et al. The most infectious prion protein particles. **Nature** 2005; 437:257-61.

Valleron AJ, Boelle PY, Will R, Cesbron JY. Estimation of epidemic size and incubation time based on age characteristics of vCJD in the United Kingdom. **Science** 2001; 294:1726-8.

Yamada M, Itoh Y, Fujigasaki H, et al. A missense mutation at codon 105 with codon 129 polymorphism of the prion protein gene in a new variant of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. **Neurology** 1993; 43:2723-4.

Wadsworth JD, Asante EA, Desbruslais M, et al. Human prion protein with valine 129 prevents expression of variant CJD phenotype. **Science** 2004; 306:1793-6.

Wang Y, Qiao XY, Zhao CB, Gao X, Yao ZW, Qi L, Lu CZ. Report on the first Chinese family with Gerstmann-Straussler-Scheinker disease manifesting the codon 102 mutation in the prion protein gene. **Neuropathology** 2006; 26:429-32.

Will RG. Acquired prion disease: iatrogenic CJD, variant CJD, Kuru. **Br Med Bull** 2003; 66:255-65.

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

Zuegg J, Gready JE. Molecular dynamics simulation of human prion protein including both N-linked oligosaccharides and the GPI anchor. **Glycobiology** 2000; 10:959-74.