

**ENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA PRION  
CELULAR E SEUS LIGANTES NOS  
MECANISMOS DE PLASTICIDADE NEURONAL  
E NEUROPROTEÇÃO**

**MARILENE HOHMUTH LOPES**

**Tese apresentada à Fundação Antônio  
Prudente para obtenção do título de Doutor  
em Ciências**

**Área de concentração: Oncologia**

**Orientadora: Dra. Vilma Regina Martins**

**São Paulo  
2005**

## FICHA CATALOGRÁFICA

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

Lopes, Marilene Hohmuth

**Envolvimento da proteína prion celular e seus ligantes nos  
mecanismos de plasticidade neuronal e neuroproteção** / Marilene  
Hohmuth Lopes -- São Paulo, 2005.

122p.

Tese(doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Vilma Regina Martins

Descritores: 1. PLASTICIDADE NEURONAL. 2. PRIONS/biossíntese.  
3. APOPTOSE.

***Amou daquela vez como se fosse a última  
Beijou sua mulher como se fosse a última  
E cada filho seu como se fosse único  
E atravessou a rua com seu passo tímido  
Subiu a construção como se fosse máquina  
Ergueu no patamar quatro paredes sólidas  
Tijolo com tijolo num desenho mágico.....***

***Chico Buarque  
Construção***

## DEDICATÓRIA

***Aos meus pais Maria Emília e Jorge por terem trilhado meu  
caminho com amor e educação***

***Aos meus irmãos Marcy e Jorge pelo carinho e atenção  
durante todas as fases de minha vida***

***Ao meu companheiro de todos os momentos, Sylvio, pelo  
amor, apoio, respeito e incentivo.***

## MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS

À **Dra. Vilma Regina Martins** pela orientação atenciosa, pelos diversos ensinamentos científicos e humanos, pelo comprometimento em ensinar seus alunos, pelas inúmeras oportunidades de trabalho e viagens concedidas, as quais foram de fundamental importância para minha formação científica.

Ao **Professor Ricardo Brentani** pela oportunidade de ter trabalhado sob sua proteção e inspiração.

À amiga **Glaucia** pela amizade sincera, por me fazer acreditar que trabalhar em conjunto só se faz crescer, por compartilhar todos os momentos da minha vida e por sempre me apoiar e me incentivar. Obrigada “Glauciana...”

À amiga **Adriana Mercadante**, a quem tenho enorme admiração, que não só me fez ver a importância da ciência, como me cativou com sua amizade, carinho e sabedoria.

Aos amigos **Silvio Zanata, Angelita Muras e Kil Sun Lee** pela amizade, ótima convivência e pelos ensinamentos.

Ao meu “bebê” **Carolina Lembke** pelo carinho, amizade e por me propiciar o prazer de ensinar.

Aos meus mais novos bebês: **Pamela e Gabriel** pelo carinho e incentivo.

A todos os colegas do laboratório de Biologia Celular e Molecular: **Adriana, Camila, Cinthia, Cleiton, Eliane, Fernanda, Flávia, Michele, Regina, Rosa, Tatiana e Zanith** por compartilharem os momentos de alegrias, “flores”, e tristezas, “cobras”, no cotidiano laboratorial e pela amizade.

Aos **Professores Rafael Linden, Marco Prado, Ivan Izquierdo e alunos** pelas gratificantes colaborações que geraram muitos frutos no trabalho e na amizade.

Aos amigos **Adriana Abalen, Alex Fiorin, Sibebe, Beatriz e Vladimir** pelo carinho, conversas animadas, pelos conselhos e por compartilhar momentos importantes.

Ao **Dr. Luiz Fernando Reis** por acreditar que nossa pós-graduação atingiria a nota máxima e pelas discussões sempre construtivas para meu trabalho.

Aos amigos **Raphael Parmigiani e Patrícia Sávio** pelos momentos de muita alegria, descontração, pelos reagentes emprestados, pelo carinho e pela amizade.

À **Ana Paula Lepique** pelos ensinamentos e pela franca amizade.

Aos colegas do laboratório de Virologia: **Laura, Tatiana, Enrique, Katiana, Lara e Aline** pelas risadas e por compartilhar dos momentos mais felizes da minha vida (Preparativos do casamento...) e pelas conversas descontraídas.

Aos colegas **Roseli, Carlinhos e Myiuki**, pela presteza e profissionalismo durante a execução desta tese.

A todos os funcionários do Instituto Ludwig que direta ou indiretamente contribuíram para realização desta tese, em especial: **Sra. Conceição, Isabel, Léia, Sr. Eudes, Sr. Sampaio, Sr. Luiz, os bioteristas Sr. João, Vanderlei, Ricardo e Eder.**

Aos meus pais, **Maria Emília** (“mamífera”) e **Jorge** pelo carinho e compreensão.

Aos meus queridos irmãos, **Jorge e Marcy** pelo apoio e afeto.

Ao **Sylvio**, pelo companheirismo, incentivo, amor, cooperação e paciência no período em que me dediquei a esta tese.

Aos meus familiares, tios e primos em especial minhas avós **Glória e Margarida**, pelo afeto e incentivo e pelo exemplo de vida.

À **Nadia** e família pela grande e verdadeira amizade.

Aos meus sogros, **Sylvio e Fátima**, por me tratarem como filha e pela amizade sincera.

Às minhas cunhadas **Selma e Silvia**, pelo carinho e por compartilhar de todos os momentos da minha vida.

Aos meus sobrinhos, **Natália** (“Doceira”), **Igor** (“Webdesigner”), **Caio** (“Homem aranha”), **Mateus** (“Garoto enxaqueca”) e **Gustavo** (“meu cientista mirim”) pelo carinho e pela alegria que nós compartilhamos.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP) pelo apoio financeiro.

A **Deus** principalmente, para quem não encontrei palavras para descrever meu muito obrigada!

## RESUMO

Atualmente muitos grupos de pesquisa estão empenhados em desvendar a função da forma celular da proteína prion, PrPc. PrPc é uma isoforma normal da proteína prion infecciosa (PrPsc-proteína prion *scrapie*) relacionada às Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (TSEs), genericamente designadas por doenças priônicas. Uma das maneiras de esclarecer o papel de PrPc é investigar moléculas ligantes e associá-las a fenômenos biológicos. As funções propostas para PrPc vão desde atividade semelhante a superóxido dismutase, proteção contra estresse oxidativo, diferenciação neuronal à sinalização. Em 1997, descrevemos um receptor/ligante para PrPc utilizando o princípio da hidropaticidade complementar. No presente trabalho, apresentamos o isolamento e identificação deste ligante de PrPc como sendo STI1 (“Stress inducible protein 1”), uma co-chaperonina. *In vitro*, a STI1 interage com PrPc de maneira específica, saturável e com alta afinidade ( $K_d=10^{-7}M$ ). *Ex vivo*, a interação entre PrPc e STI1, possui efeito neuroprotetor ao ativar a via de PKA (Proteína quinase dependente de AMPc), além disso, promove crescimento neurítico através da via de MAPK (Proteína quinase ativada por mitógeno) em neurônios do sistema nervoso central. Paralelamente, mostramos que PrPc atua como um ligante de proteínas de matriz extracelular: vitronectina e laminina. A interação entre vitronectina e PrPc leva ao crescimento axonal de células do sistema nervoso periférico. Ao interagir com laminina, PrPc induz formação e manutenção de neuritos e se mostra importante para os mecanismos de consolidação da memória de curta e longa duração, sendo que este processo requer a ativação de vias clássicas de sinalização (PKA/MAPK). Assim, a caracterização das interações PrPc-STI1, PrPc-Vn e PrPc-Ln representa contribuições importantes para a elucidação do papel biológico de PrPc.

## SUMMARY

Nowadays, many research groups are interested in unraveling the role of the cellular prion protein, PrPc, which is the normal isoform of protein associated with the Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs), generically designated prion diseases. Several biological roles for PrPc have been proposed. In 1997, our group described a PrPc receptor/ligand based on the complementary hydrophathy theory. Herein, we showed the identification of the PrPc receptor/ligand as STI1, or Stress inducible protein 1. *In vitro* studies demonstrated that STI1 is a specific, saturable and high affinity ligand for PrPc ( $K_d=10^{-7}M$ ). *Ex vivo*, PrPc-STI1 interaction promoted neurite outgrowth through MAPK (Mitogen activated protein kinase) and showed neuroprotective effects by activating PKA (cAMP-dependent protein kinase) in central nervous system neurons. We also demonstrated that PrPc act as an extracellular matrix protein receptor for vitronectin (Vn) and laminin (Ln). The interaction between Vn and PrPc led to axonal outgrowth in peripheral nervous system. Upon its interaction with Ln, PrPc induced formation and maintenance of neurites and participated in short and long term memory consolidation mechanisms by activating classical signaling pathways (PKA/MAPK). Thus, the characterization of PrPc-STI1, PrPc-Vn and PrPc-Ln interactions represents important contributions for the elucidation of PrPc physiological roles.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Desenho esquemático mostrando as diferenças nas estruturas terciárias de PrPc e PrPsc.
- Figura 2** Descobertas relacionadas a infectividade de TSE e natureza do agente infeccioso.
- Figura 3** Modelos para a conversão de PrPc em PrPsc.
- Figura 4** Tecidos humanos e fluidos corpóreos envolvidos na propagação e transporte de prion.
- Figura 5** Esquema representativo da estrutura gênica de PrPc murino
- Figura 6** Tráfego de PrPc e PrPsc.
- Figura 7** Estrutura gênica de Hop humana.
- Figura 8** Desenho esquemático das proteínas PrPc e STI1, destacando os domínios de ligação mapeados.
- Figura 9** Desenho esquemático dos principais domínios de PrPc e STI1.
- Figura 10** Desenho esquemático dos principais domínios de PrPc e Vn.
- Figura 11** Desenho esquemático dos principais domínios de PrPc e Ln.
- Figura 12** STI1 e PrPc são proteínas expressas em gânglios e nervos Periféricos.
- Figura 13** Presença de STI1 no corpo celular e axônios de neurônios sensoriais
- Figura 14** O complexo STI1-PrPc medeia o crescimento axonal de neurônios sensoriais da raiz dorsal *Prnp*<sup>+/+</sup>.
- Figura 15** Atividade de MAPK em células de gânglios da raiz dorsal de embriões selvagens (*Prnp*<sup>+/+</sup>) e deficientes para *Prnp* (*Prnp*<sup>0/0</sup>).
- Figura 16** Laminina estimula neuritogênese em cultura primária de gânglios da raiz dorsal.
- Figura 17** Ensaio de competição da interação PrPc-STI1 com Ln e o peptídeo da cadeia  $\gamma$ 1 de Ln.
- Figura 18** STI1 promove efeito sinérgico na neuritogênese mediada por laminina em células ganglionares de camundongo *Prnp*<sup>+/+</sup>.

**Figura 19** Crescimento neurítico estimulado por Vn e STI1 em neurônios sensoriais.

**Figura 20** Crescimento axonal estimulado por Vn e Ln.

**Figura 21** Modelo proposto para ilustrar as interações entre as proteínas PrPc, STI1, Vn, Ln e integrinas.

**Figura 22** Modelos alternativos de atuação de STI1, quando solúvel ou integrada à membrana plasmática, na neuritogênese e neuroproteção.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** Panorama de doenças priônicas de humanos e animais.

**Tabela 2** Principais modificações em PrPc (mutações e inserções) associadas à doenças.

**Tabela 3** Complexos multiprotéicos contendo Hop.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>aa</b>	Aminoácidos
<b>AMPC</b>	Adenosina Monofosfato cíclico
<b>BSA</b>	Albumina Sérica Bovina
<b>BSE</b>	Encefalopatia Espongiforme Bovina
<b>CJD</b>	Doença de Creutzfeld-Jakob
<b>com</b>	contagem por minuto
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>DRG</b>	Gânglio da Raiz Dorsal
<b>ECM</b>	Matriz Extracelular
<b>FAK</b>	proteína quinase de adesão focal
<b>FFI</b>	Insônia Familiar Fatal
<b>Fração 55%</b>	Extrato protéico de cérebro precipitado com 55% de sulfato de amônia
<b>GFP</b>	Proteína Fluorescente Verde
<b>GPI</b>	Glicosil-Fosfatidil-Inositol
<b>GSS</b>	Doença de Gerstmann-Sträussler-Scheinker
<b>Hop</b>	“Human Heat Shock Cognate Protein ”
<b>HPRT</b>	Hipoxantina Fosforribosiltransferase
<b>Hsp70</b>	Proteína de Choque Térmico de 70kDa
<b>Hsp90</b>	Proteína de Choque Térmico de 90kDa
<b>ICJD</b>	Doença de Creutzfeld-Jakob Iatrogênica
<b>kb</b>	Kilobases
<b>kd</b>	Constante de Dissociação no Equilíbrio
<b>kDa</b>	kiloDalton
<b>Ln</b>	Laminina
<b>MAPK</b>	Proteína Quinase Ativada por Mitógenos
<b>nCAM</b>	“Neural Cell Adhesion Molecule”
<b>NMR</b>	Ressonância Nuclear Magnética
<b>nNOS</b>	Óxido Nítrico Sintase Neuronal

<b>p53</b>	proteína de 53 kiloDaltons
<b>pb</b>	Pares de Bases
<b>PI3K</b>	Fosfatidil-inositol-3 quinase
<b>PKC</b>	Proteína Quinase C
<b>PKA</b>	Proteína quinase dependente de AMP cíclico
<b>PL</b>	Poli-L-lisina
<b>PrPc</b>	Proteína prion celular
<b>PrPsc</b>	Proteína prion <i>scrapie</i>
<b>PrPres</b>	Proteína prion resistente à proteólise limitada
<b>Prnp</b>	Gene que codifica para a proteína prion celular
<b>RGD</b>	Tripeptídeo arginina - glicina -ácido aspártico
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>sCJD</b>	Doença de Creutzfeld-Jakob Esporádica
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sódio
<b>SDS</b>	PAGE- Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>STI1</b>	“Stress Inducible Protein 1”
<b>TPR</b>	Tetratricopeptídeos
<b>vCJD</b>	Nova variante da doença de Creutzfeld-Jakob
<b>Vn</b>	Vitronectina
<b>TNF</b>	Fator de Necrose Tumoral
<b>TSEs</b>	Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	Prion e suas enfermidades	1
1.1.1	A descoberta de prion	1
1.1.2	Doenças priônicas	8
1.1.2.1	Doenças em animais	9
1.1.2.1.1	<i>scrapie</i>	9
1.1.2.1.2	Encefalopatia Espongiforme Bovina	9
1.1.2.1.3	Demais doenças em animais	10
1.1.2.2	Doenças em humanos	11
1.1.2.2.1	<i>kuru</i>	11
1.1.2.2.2	Doença de Creutzfeldt-Jakob	12
1.1.2.2.3	Gerstmann-Sträussler-Scheinker	14
1.1.2.2.4	Insônia Familiar Fatal	15
1.1.2.2.5	Doenças Psiquiátricas	15
1.1.2.2.6	Epilepsias	16
1.2	Mecanismos de Conversão de PrPc para PrPsc	17
1.3	Vias de disseminação da doença e neuroinvasão	21
1.4	Diagnóstico e Terapia	22
1.5	Biologia de PrPc	25
1.5.1	Do gene a proteína prion celular	25
1.5.2	Expressão e distribuição celular de PrPc	26
1.6	Camundongos deficientes de PrPc	31
1.7	PrPc-Funções Biológicas e seus ligantes	36
1.7.1	Ligantes de PrPc descritos	36
1.7.2	PrPc como ligante de proteínas de matriz extracelular	38
1.7.2.1	Laminina	38
1.7.2.2	Vitronectina	40
1.7.3	Stress Inducible Protein 1 (STI1)	43
1.8	Plasticidade neuronal e memória	51

<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>55</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>60</b>
3.1	Cultura Primária de neurônios sensoriais de gânglios da raiz dorsal	60
3.2	Ensaio de Imunohistoquímica	61
3.3	Ensaio de Imunofluorescência	62
3.4	Ensaio de Atividade de p44/42 MAPK	63
3.5	Ensaio de competição da interação PrPc-STI1 com laminina e o decapeptídeo (RNIAEIIKDI) da cadeia $\gamma$ 1 de laminina	64
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	
4.1	Artigo intitulado: <i>Stress inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion protein that triggers neuroprotection</i> (Anexo I).	
4.2	Manuscrito intitulado: <i>Interaction of cellular prion protein and stress inducible protein 1 promotes neurite outgrowth and neuroprotection through distinct signaling pathways</i> (Anexo II).	
4.3	Manuscrito intitulado: <i>Cellular prion is a vitronectin receptor supporting axonal growth: redundancy mediated by integrins</i> (Anexo III)	
4.4	Manuscrito intitulado: <i>Cellular prion interaction with laminin mediates memory consolidation by PKA and MAPK</i> (Anexo IV)	
4.5	Papel do complexo multi-protéico formado por PrPc, STI1, laminina e vitronectina no crescimento axonal de neurônios periféricos	72
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>91</b>

## **ANEXOS**

**Anexo I** Artigo intitulado: *Stress inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion protein that triggers neuroprotection.*

**Anexo II** Manuscrito intitulado: *Interaction of cellular prion protein and stress inducible protein 1 promotes neurite outgrowth and neuroprotection through distinct signaling pathways.*

**Anexo III** Manuscrito intitulado: *Cellular prion is a vitronectin receptor supporting axonal growth: redundancy mediated by integrins.*

**Anexo IV** Manuscrito intitulado: *Cellular prion interaction with laminin mediates memory consolidation by PKA and MAPK.*

## PREFÁCIO

A partir do momento que se identificou um agente infeccioso protéico e desprovido de ácido nucléico, os prions (“proteinaceous infectious particle”), instalou-se um grande alvoroço no meio científico. Até a descoberta dos prions, acreditava-se que doenças infecciosas só podiam ser causadas por microorganismos que contêm ácidos nucléicos (DNA ou RNA), como bactérias, vírus e protozoários. Assim, o advento prion rompeu o “Dogma Central da Biologia Molecular” e nos últimos anos a pesquisa sobre prions e doenças relacionadas encontra-se em evidência.

As encefalopatias espongiformes - doenças neurológicas que levam a demência, distúrbios motores e outras disfunções - são causadas por mudanças na conformação da proteína prion celular (PrPc) existente no cérebro, por mecanismos ainda desconhecidos. A forma modificada denominada de prion pode ser transmitida e, uma vez no cérebro, altera a proteína normal e forma agregados insolúveis.

Uma vez que, a presença de PrPc é absolutamente necessária para a ocorrência da doença, muitos grupos de pesquisa vêm tentando não só elucidar o mecanismo de conversão de PrPc para prions e a propagação da doença, mas também investigando as funções biológicas de PrPc.

Nosso grupo de pesquisa está entre aqueles que visam investigar os papéis biológicos para PrPc. Nesse sentido, ao longo dos últimos anos, nosso grupo vem caracterizando diferentes ligantes para PrPc e relacionando estas interações com fenômenos biológicos.

Assim, o presente trabalho relatará os principais resultados obtidos ao longo de quase cinco anos de estudo no laboratório especializado em pesquisa sobre a biologia de PrPc.

Logo que me integrei ao grupo, o mesmo acabara de caracterizar um provável ligante de PrPc usando a hidropaticidade complementar. Assim, foi-me atribuída a tarefa de comprovar, através de ensaios bioquímicos, a interação entre PrPc e seu ligante STI1, durante meu projeto de mestrado. No transcorrer deste projeto, resultados de suma importância foram obtidos e incluídos ao trabalho publicado pelo grupo intitulado “*Stress inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion protein that triggers neuroprotection*” (ZANATA et al. 2002 – Anexo I).

Aproximadamente dois anos depois, requisitei a mudança de nível e iniciei o projeto de doutorado, tendo como principal objetivo, avaliar a importância biológica da interação entre PrPc e STI1 em modelos de diferenciação neuronal e neuroproteção. Resultados obtidos durante esse projeto resultaram no manuscrito “*Interaction of cellular prion protein and stress inducible protein 1 promotes neurite outgrowth and neuroprotection through distinct signaling pathways*” (Lopes et al. manuscrito em Anexo – Anexo II).

Concomitantemente ao meu projeto, participei de diferentes trabalhos que tinham como foco principal pesquisar a função de PrPc quando associado às proteínas da matriz extracelular, laminina e vitronectina.

Um dos trabalhos aponta para o envolvimento de vitronectina e PrPc no crescimento axonal de neurônios sensoriais o qual está concluído no manuscrito

*“Cellular prion is a vitronectin receptor supporting axonal growth: redundancy mediated by integrins”* (Hajj et al. manuscrito em Anexo-Anexo III).

O outro estudo mostra a participação de PrPc e laminina no processo de consolidação da memória, descrito no manuscrito *“Cellular prion interaction with laminin mediates memory consolidation by PKA and MAPK”* (Coitinho et al. manuscrito em Anexo – Anexo IV).

No entanto, apresentaremos a seguir uma revisão de dados da literatura relevantes para o melhor esclarecimento e entendimento do presente trabalho. Primeiramente, introduziremos ao leitor prions e suas enfermidades (1.1), destacando os mecanismos de conversão propostos (1.2), as vias de disseminação (1.3), diagnóstico e tratamento da doença (1.4). Em seguida, ressaltaremos a biologia de PrPc (1.5) apresentando seus ligantes e suas funções biológicas (1.6, 1.7 e 1.8).

Uma vez que, a maioria dos resultados gerados diretamente a partir do meu projeto, assim como aqueles dos quais participei mais indiretamente, encontram-se publicados ou já em forma de manuscrito para publicação decidimos anexá-los (Anexos I, II, III e IV) para facilitar a leitura da tese. Além disso, apresentaremos também alguns resultados relevantes para o contexto do estudo, que não se encontram em formato de manuscrito, obtidos em colaboração com outro membro do nosso grupo. A metodologia aplicada nesses experimentos e os dados propriamente ditos serão inseridos nos itens material e métodos (3) e resultados (4.5).

Por fim, a conexão entre PrPc e seus ligantes nos diversos modelos avaliados será abordada na forma de conclusões (5).

# 1 INTRODUÇÃO

---

## 1.1 PRION E SUAS ENFERMIDADES

### 1.1.1 A descoberta de prion

Ao longo de vários anos, diversos grupos de pesquisa se empenharam no isolamento e na caracterização do agente etiológico de um determinado grupo de doenças denominadas de encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs).

A transmissibilidade de TSEs foi acidentalmente demonstrada em 1937. Na época, o tratamento contra um vírus comum foi realizado em uma população de ovelhas que foi inoculada com um extrato de cérebro tratado com formalina desconhecidamente derivado de um animal infectado com *scrapie* (doença neurodegenerativa que atinge ovelhas e cabras). Dois anos após, aproximadamente 10% do rebanho desenvolveu *scrapie*. Subsequentemente, o *scrapie* foi experimentalmente transmitido para ovelhas e camundongos (CUILLE et al. 1939; CHANDLER 1961). Em humanos, a propagação de *kuru* entre as tribos da Nova Guiné foi atribuída a hábitos canibais. Isto foi demonstrado em 1966 por um estudo pioneiro de GAJDUSEK e ZIGAS (1957) com a transmissão do *kuru* para macacos (GAJDUSEK et al. 1966). Seguiram-se então observações da transmissão de Creutzfeldt Jakob disease (CJD) e Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) para animais (ver maiores detalhes no item 1.2.2) (GIBBS Jr. et al. 1968; MASTERS et al. 1981).

Devido ao longo período de incubação entre o tempo de exposição ao patógeno e o início dos sintomas, foi inicialmente proposto que o agente infeccioso se tratava de um vírus lento (CHO 1976). Investigações subsequentes entretanto, indicaram que o agente responsável por essas doenças era substancialmente diferente de vírus e outros agentes convencionais. ALPER et al. (1967) e colegas descreveram que o agente responsável por *scrapie* era extremamente resistente a tratamentos que normalmente destroem ácidos nucléicos como luz ultravioleta e radiação ionizante (ALPER et al. 1967). Estes resultados, juntamente com achados prévios destes autores que mostravam que era necessário uma massa molecular mínima para infectividade ( $2 \times 10^5$ Da), excluíram vírus e qualquer outro tipo de agente infeccioso conhecido na época, levando a hipóteses alternativas (ALPER et al. 1966). Uma delas, era que o agente infeccioso poderia ser um virino - uma molécula informacional muito pequena encapsulada dentro de um envoltório protéico (KIMBERLIN 1982). O tamanho pequeno do ácido nucléico e o envoltório protéico vedado de um virino poderiam explicar a resistência destes aos procedimentos que normalmente destroem os ácidos nucléicos. Embora esta hipótese possa explicar muitas das observações experimentais, 30 anos de pesquisas não identificaram consistentemente ácidos nucléicos associados com a partícula infecciosa das TSEs (PRUSINER 1998). Em 1967, um artigo visionário de GRIFFITH (1967) introduziu, pela primeira vez, a possibilidade de que o material responsável pela transmissão da doença pudesse ser uma proteína com a surpreendente capacidade de se “replicar” no organismo, sem o envolvimento de material genético. Isto lançou a hipótese denominada de “protein only”- do inglês

somente proteína, para a propagação das TSEs. Subsequentemente, PRUSINER alcunhou o termo prion (“proteinaceous infectious protein”) para salientar a natureza protéica das partículas infecciosas causadoras das TSEs.

O passo crucial no entendimento da natureza do novo agente infeccioso, foi o isolamento do material infeccioso (BOLTON et al. 1982) a partir de cérebros de animais infectados. O material purificado mostrou-se altamente insolúvel, com características típicas de amilóide (coloração pelo vermelho de Congo e PAS e birrefringência sob microscopia de luz polarizada). Posteriormente, foi extraído de cérebros de pacientes portadores de CJD, material semelhante- do ponto de vista bioquímico e microscópico (PRUSINER et al. 1983).

Agentes que modificam proteínas (como proteases, SDS, sais caotrópicos e fenol) foram capazes de inativar a infecção no material purificado, enquanto que agentes modificadores de ácidos nucléicos (nuclease e irradiação por luz ultravioleta) não apresentaram a mesma capacidade de inativação da infecção. Portanto, esses achados sugeriram fortemente a composição exclusivamente protéica do agente infeccioso envolvido com *scrapie* e com as demais doenças relacionadas (PRUSINER et al. 1983).

As partículas infecciosas purificadas foram utilizadas na produção de anticorpos e curiosamente os mesmos reconheceram uma proteína de 33-35kDa (kilodaltons), presente tanto em cérebro de animais normais como em animais infectados (OESCH et al. 1985; MEYER et al. 1986). Com a ajuda destes anticorpos foi possível isolar uma proteína constituinte do agente infeccioso. A análise química da extremidade amino-terminal desta proteína, permitiu a síntese de peptídeos, os quais foram utilizados como antígenos na produção de

anticorpos policlonais em coelhos (MEYER et al. 1986). Tais anticorpos reagiram com a mesma proteína de 33-35kDa (MEYER et al. 1986), sugerindo assim que a proteína presente nas partículas infecciosas do *scrapie* era um componente do cérebro de animais sadios, não infectados.

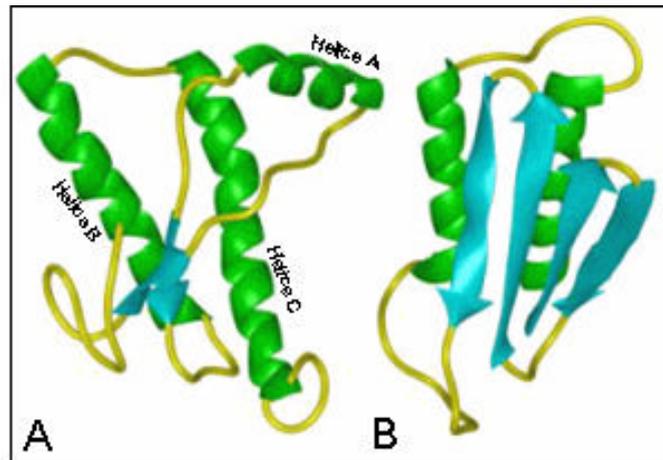
Curiosamente, em extratos purificados de cérebro de animais infectados, o anticorpo reconheceu uma proteína com peso molecular de 27-30kDa. Denominada de PrP27-30, descobriu-se mais tarde que essa forma era resultante do tratamento com proteases durante a purificação, posteriormente denominado de PrPres (Proteína prion resistente à proteólise limitada). A remoção, por proteólise parcial, dos primeiros 67 resíduos da extremidade amino-terminal da proteína extraída de cérebros de animais infectados por *scrapie* ou de pacientes com CJD ou GSS, reduz seu peso molecular de 33-35kDa para 27-30kDa (OESCH et al. 1985). Através da solubilização das partículas infecciosas, GABIZON et al. (1988), demonstraram que essa resistência à degradação por proteases não é uma consequência da formação das placas amilóides, mas sim uma característica intrínseca da proteína infecciosa.

O sequenciamento dos resíduos da porção amino-terminal de PrP27-30 possibilitou a síntese de oligonucleotídeos degenerados e a clonagem de um gene, a partir de bibliotecas de cDNA de hamsters normais e infectados (BASLER et al. 1986). Esse fato comprovou que a partícula infecciosa é realmente codificada por um gene do hospedeiro, o qual se encontra no braço curto do cromossomo 20 do homem e no cromossomo 2 de camundongo (CHESEBRO et al. 1985; OESCH et al. 1985). A ordem cronológica das

principais descobertas na pesquisa sobre prions é encontrado na Figura 2 (Adaptada de SOTO e CASTILLA 2004; AGUZZI e POLYMENIDOU 2004).

Diante desses achados, foi possível confirmar que a proteína presente nos agregados insolúveis de cérebros de animais ou pacientes infectados é formada a partir de uma proteína precursora expressa normalmente nas células. A isoforma infecciosa foi denominada de “**Proteína Prion Scrapie**” ou **PrPsc** e a isoforma celular normal foi denominada de “**Proteína Prion Celular**” ou **PrPc**.

PrPc e PrPsc possuem a mesma sequência de aminoácidos e diferem apenas em suas propriedades físico-químicas (TURK et al. 1988). Enquanto o PrPc é solúvel e susceptível à ação de proteases, sua forma anormal, o PrPsc apresenta-se muito insolúvel e resistente à proteólise limitada (MEYER et al. 1986). Estas propriedades de PrPsc favorecem a formação de agregados insolúveis que se depositam lenta e progressivamente em várias regiões do sistema nervoso, causando a morte celular. Estudos de espectroscopia foram capazes de revelar as estruturas secundárias dessas duas isoformas. Verificou-se que o PrPc tem um perfil característico de proteínas em  $\alpha$ -hélices, ao passo que o PrPsc possui muito mais estruturas  $\beta$ -pregueadas (PAN et al. 1993) (Figura 1).



**Legenda:** A, PrPc possui três regiões em  $\alpha$ -hélices (verde) em sua estrutura:  $\alpha$ -hélice A (resíduos 144-157),  $\alpha$ -hélice B (resíduos 172-193) e  $\alpha$ -hélice C (resíduos 200-227), e duas regiões em folha  $\beta$ -pregueada (azul) em sua estrutura nos resíduos 129-134 e 159-165. B, PrPsc mostra-se rica em folha  $\beta$ -pregueada (azul) e pobre em  $\alpha$ -hélice (verde).

**Figura 1** - Desenho esquemático mostrando as diferenças nas estruturas terciárias de PrPc e PrPsc.

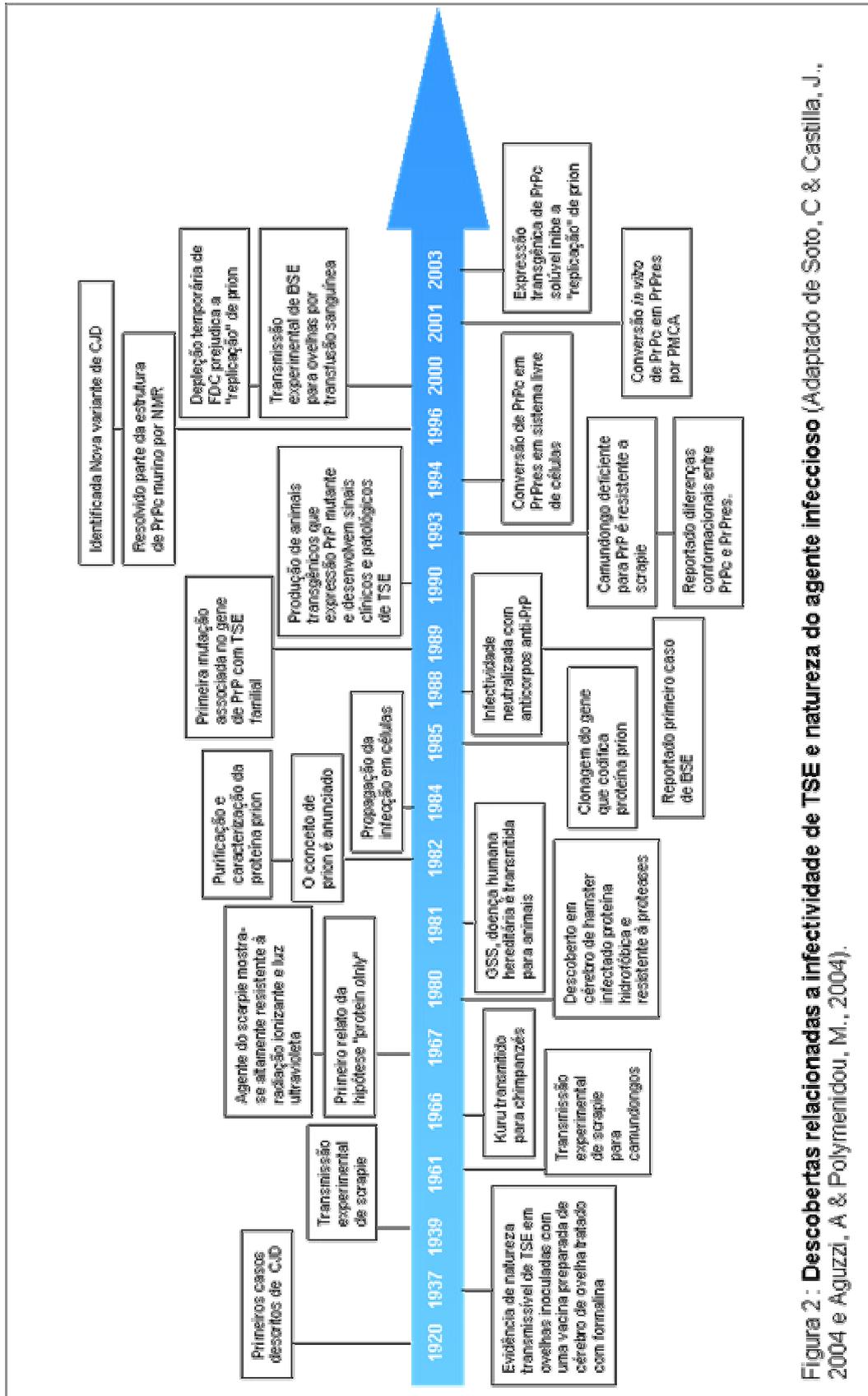


Figura 2: Descobertas relacionadas a infectividade de TSE e natureza do agente infeccioso (Adaptado de Soto, C & Castilla, J., 2004 e Aguzzi, A & Polymeridou, M., 2004).

### 1.1.2 Doenças priônicas

A proteína prion tem sido o centro de intensa pesquisa devido a sua implicação em Encefalopatas Espongiformes Transmissíveis (TSEs) que afetam tanto homens como animais (PRUSINER 1998). A Tabela 1 apresenta as principais doenças priônicas e sua etiologia em homens e animais.

**Tabela 1** - Panorama de doenças priônicas de humanos e animais.

<b>Doenças Priônicas</b>	<b>Hospedeiro natural</b>	<b>Etiologia</b>
<i>Scrapie</i>	Cabras e ovelhas	Infecção, natural: modo de transmissão obscuro
BSE	Gados	Infecção: Ingestão de alimento contaminado - <i>scrapie</i>
“Chronic Wasting Disease”	Cervos e antílopes	Infecção, natural: modo de transmissão obscuro
“Transmissible Mink Encephalopathy”	Martas	Origem desconhecida
“Feline Spongiform Encephalopathy”	Felinos	Infecção: Ingestão de alimento contaminado-BSE
<i>kuru</i>	Humanos	Infecção: Ingestão, ritual canibalístico
CJD esporádica (sCJD)	Humanos	Desconhecida (mutação somática <i>Prnp</i> ?)
CJD familiar (fCJD)	Humanos	Familiar (mutação <i>Prnp</i> linhagem germinativa)
CJD iatrogênica (iCJD)	Humanos	Infecção: Procedimento cirúrgico, hormônio do crescimento
CJD nova variante (vCJD)	Humanos	Infecção: Ingestão de alimentos contaminados -BSE- transfusão sanguínea
GSS	Humanos	Familiar (mutação <i>Prnp</i> linhagem germinativa)
Insônia Familiar Fatal	Humanos	Familiar (mutação <i>Prnp</i> linhagem germinativa)

### 1.1.2.1 Doenças em animais

#### 1.1.2.1.1 *Scrapie*

A doença *scrapie* foi descrita há mais de 250 anos como uma doença neurodegenerativa que afeta cabras e ovelhas. Os animais acometidos por essa doença apresentam excitabilidade, coceira, ataxia e paralisia. Após o aparecimento dos sintomas, o curso da doença até a morte do animal é muito curto (NARANG 1987 e 1996).

O *scrapie* é incurável e fatal em 100% dos casos, assim como todas as demais doenças priônicas. As principais características histopatológicas encontradas no tecido nervoso do animal afetado por *scrapie* são: áreas com extensa formação de vacúolos, gliose, intensa perda de células neuronais e ainda depósitos amilóides (WELLS e WILESMITH 1995).

#### 1.1.2.1.2 Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE)

A BSE, também conhecida como “doença da vaca louca”, é uma doença neurodegenerativa causada por prions que, afeta o gado bovino. A epidemia de BSE surgiu em meados da década de 80 sendo causada provavelmente pela contaminação por *scrapie* da ração usada na alimentação do gado, a qual era preparada a partir de víceras de carneiros, ovelhas, gado, porcos e galinhas. No final da década de 70, uma modificação no preparo da ração, resultou na não eliminação das partículas de prion que eram então ingeridas pelo gado (WILESMITH et al. 1991). Deste fato resultou uma epidemia de BSE na Inglaterra na década de 80, com aproximadamente 400.000 animais acometidos (WELLS e WILESMITH 1995).

Posteriormente, alguns estudos confirmaram a infecção do gado por via oral, através da transmissão de BSE para camundongos e também para o gado bovino pela alimentação (PRUSINER 1991).

As alterações histopatológicas observadas na BSE são semelhantes às do *scrapie* e estão restritas ao sistema nervoso central. Observa-se vacuolização da substância cinzenta e do neuropilo e perda neuronal. A formação de placas amilóides não é característica dessa doença, sendo os acúmulos de prion detectados através de imunohistoquímica (WELLS e WILESMITH 1995).

#### **1.1.2.1.3 Demais doenças em animais**

Além de *scrapie*, que atinge cabras e ovelhas e BSE que afeta bovinos, doenças semelhantes são causadas por prions em outras espécies de animais, como no visão (Encefalopatia Transmissível do Visão), nos cervos e antílopes selvagens (“Chronic Wasting disease”), em gatos domésticos e grandes felinos (“Transmissible Feline Encephalopathy”) e em martas em cativeiro (“Transmissible Mink Encephalopathy”).

Gatos domésticos e grandes felinos em cativeiro são afetados por doenças priônicas decorrentes de alimentação com carcaças de animais contaminados, enquanto martas, antílopes e cervos são acometidos por encefalopatias de origem desconhecida, sendo que estas doenças têm ocorrência natural na população, assim como o *scrapie* (SIGURDSON e MILLER 2003).

### 1.1.2.2 Doenças em humanos

#### 1.1.2.2.1 *Kuru*

As TSEs possuem caráter adquirido, esporádico ou hereditário. Entre as doenças priônicas humanas adquiridas a primeira a ser descrita foi o *kuru*.

O *kuru* é uma doença neurológica que, na década de 50, atingiu nativos do grupo linguístico Fore e também algumas tribos vizinhas, na Papua Nova Guiné. Várias evidências indicam que o *kuru* se disseminou nessas tribos devido a prática de rituais canibalísticos, principalmente por mulheres e crianças, que consumiam as vísceras e o cérebro de seus parentes mortos (GAJDUSEK e ZIGAS 1957; MATHEWS et al. 1968). A não identificação de mutações relacionadas com essa doença leva a crer que, provavelmente, a origem dessa epidemia esteja na ingestão de vísceras de algum portador de CJD, durante a prática canibal (GAJDUSEK 1977).

O curso clínico da doença é rápido (de 3 a 6 meses após o aparecimento dos primeiros sintomas), caracterizando-se por ataxia progressiva acompanhada de tremores no corpo todo (o significado da palavra "*kuru*" no dialeto Fore é tremer), agressividade, perda de locomoção e de controle musculare.

Os aspectos histopatológicos do *kuru* mostram-se como alterações espongiiformes, astrogliose e deposição de placas amilóides na maioria dos casos, principalmente no cerebelo e no sistema extra-piramidal (GAJDUSEK e ZIGAS 1957; KLATZO et al. 1959).

Uma redução na incidência do *kuru* só ocorreu quando, por volta da década de 60, o canibalismo foi extinto nessas tribos (PRUSINER 1993).

### 1.1.2.2 Doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD)

O *kuru* só foi associado à outras doenças neurodegenerativas, como CJD e GSS, quando as últimas mostraram seu caráter infeccioso.

A doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), assim denominada pois os primeiros casos desta enfermidade foram descritos por CREUTZFELDT em 1920 e por JAKOB em 1921. Esta pode possuir aspecto esporádico, adquirido ou hereditário, sendo a última forma responsável por aproximadamente 15% dos casos (MASTERS et al. 1981).

CJD afeta igualmente homens e mulheres com idade média de 60 anos. Os sintomas mais comuns são desordens visuais, perda de memória e movimentos mioclônicos. Uma em cada 1 milhão de pessoas por ano é diagnosticada com CJD, sendo que 80% dos pacientes morrem cerca de 12 meses após o aparecimento dos primeiros sintomas, enquanto que os demais exibem um longo curso clínico (RICHARDSON e MASTERS 1995).

As alterações histopatológicas no cérebro de pacientes portadores de CJD são: morte neuronal, gliose e alterações espongiiformes (MASTERS e RICHARDSON 1978). Depósitos de amiloide são encontrados em menos de 10% dos casos (LANTOS et al. 1992).

As formas adquiridas de CJD caracterizam-se pela transmissão iatrogênica, que inclui transplante de córnea, administração de hormônio de crescimento retirado da glândula pituitária de cadáveres de indivíduos portadores desta doença, transplante de dura-mater, administração de gonadotrofinas provenientes de extratos de hipófise humana e esterilização imprópria de eletrodos e materiais cirúrgicos (LANG et al. 1998; CROES et al.

2001). Os casos de CJD iatrôgenica (iCJD) foram relatados no mundo todo (COLLINGE et al. 1991) inclusive no Brasil (CABOCLO et al. 2002). Mais recentemente, foi sugerida a possibilidade da transmissão de CJD por transfusão de sangue ou hemoderivados (PEDEN et al. 2004; LLEWELYN et al. 2004).

Na CJD hereditária ou familiar (fCJD), a mutação mais frequente (60%) no gene que codifica para PrP<sup>c</sup> ocorre no códon 200 e está associada à forma mais típica da doença (BROWN 1992; GOLDFARB et al. 1994). Mutações em outros códons também podem ocorrer (Tabela 2).

Uma nova variante de CJD (vCJD) foi relatada em indivíduos do Reino Unido e da França em 1996. Provavelmente esses indivíduos desenvolveram a doença por ingestão de carne derivada de gado infectado com BSE. O grupo de COLLINGE et al. em 1996, demonstrou que as moléculas infecciosas provenientes desses pacientes tinham características bioquímicas, no que se refere à glicosilação da molécula, semelhantes às aquelas causadoras de BSE. De fato, evidências de transmissão de BSE para humanos através de modelos experimentais em animais confirmaram a transmissão de CJD por via oral (PRUSINER et al. 1985; BONS et al. 1999; SCOTT et al. 1999; ASANTE et al. 2002b; HERZOG et al. 2004).

A forma mais comum entre as TSEs de humanos, com uma incidência de um a dois casos por ano em 1 milhão de indivíduos, é a forma esporádica ou espontânea de CJD (sCJD), assim chamada por acreditar-se em conversões espontâneas da proteína prion celular para a forma infecciosa, pois nesses casos não foi possível associá-la a mutação genética, exposição ao agente

infeccioso ou a qualquer outro fator de risco conhecido (WILL 2003). Foi sugerido que uma mutação somática no gene que codifica PrPc (*Prnp*) pudesse gerar um acúmulo de PrPsc mas ainda não existem dados experimentais que apoiem essa hipótese.

#### **1.1.2.2.3 Doença de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)**

GSS é uma doença rara do sistema nervoso, autossômica dominante, caracterizada principalmente por anormalidades motoras e intelectuais. Foi descrita pela primeira vez em uma família de Viena, por GERSTMANN, em 1928 e GHETTI et al. em 1995. Sintomas como ataxia cerebelar, tremores severos, dificuldades de locomoção, distúrbios da fala, irritabilidade, comportamento descontrolado e redução da capacidade intelectual são comuns nos indivíduos portadores de GSS. Deposição de placas amilóides de PrPsc em determinadas regiões do cérebro de pacientes é um achado constante em GSS (KITAMOTO et al. 1993). Em alguns casos também se encontra degeneração espongiiforme no sistema nervoso central.

Assim como para CJD hereditária, foram identificadas várias mutações *Prnp* associadas a GSS (Tabela 2).

#### **1.1.2.2.4 Insônia Familiar Fatal (FFI)**

Descrita pela primeira vez em 1986 por LUGARESI et al. A FFI manifesta-se em média aos 48 anos de idade e causa distúrbios do sono, do sistema endócrino e motor. A FFI está associada a uma mutação no códon 178 de *Prnp*, que leva a substituição de um aminoácido de ácido aspártico para asparagina.

Essa mesma mutação já havia sido detectada anteriormente em pacientes com CJD, entretanto, as diferentes manifestações clínicas parecem estar associadas a um polimorfismo no códon 129: a presença do resíduo de valina nessa posição determina o fenótipo de CJD, enquanto que a presença do resíduo de metionina ocorre nos pacientes com FFI (MEDORI et al. 1992). Outra mutação no resíduo 200 de *Prnp*, que leva a substituição de um aminoácido de glutamina para lisina também está associada a FFI.

#### **1.1.2.2.5 Doenças psiquiátricas**

A manifestação de alguns sintomas psiquiátricos nas doenças causadas por prions, levantaram a possibilidade de que mutações em *Prnp* também podem estar relacionadas na etiologia de doenças psiquiátricas. De fato, SAMATA et al. (1997), identificaram uma variante alélica no códon 171 no gene de PrPc em indivíduos pertencentes a uma família com alta incidência de doença esquizoafetiva ou esquizofrênica, demonstrando, pela primeira vez, a associação desse tipo de doença com PrPc.

#### **1.1.2.2.6 Epilepsias**

Recentemente, WALZ et al. (2003) e WALZ et al. (2004) demonstraram uma alta frequência da variante alélica de PrPc (Asn171Ser) em epilepsias do lobo temporal mesial relacionadas a esclerose hipocampal e a mal-formações do desenvolvimento cortical.

**Tabela 2** - Principais modificações em PrPc (mutações e inserções) associadas à doenças.

<b>Códons</b>	<b>Mudanças em PrPc</b>	<b>Doenças associadas</b>	<b>Referências</b>
51-90	Inserção de 48 a 216 pb	CJD/GSS	Goldfarb et al. 1993)
102	Pro/Leu	GSS	(Doh-ura et al. 1989)
105	Pro/Leu	GSS	(Yamada et al. 1993)
117	Ala/Val	GSS	(Doh-ura et al. 1989)
131	Gly/Val	GSS	(Panegyres et al. 2001)
145	Tyr/STOP	GSS	(Ghetti et al. 1996)
171	Asn/Ser	Esquizofrenia	(Samaia et al. 1997)
178	Asp/Asn	FFI/CJD	(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	Thr/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/FFI	(Inoue et al. 1994)
202	Asp/Asn	GSS	(Piccardo et al. 1998)
208	Arg/His	CJD	(Mastrianni et al. 1996)
210	Val/Ile	CJD	(Pocchiarri 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. 1992)
232	Met/Arg	CJD	(Kitamoto et al. 1993)

**Fonte:** CASTRO (2004)

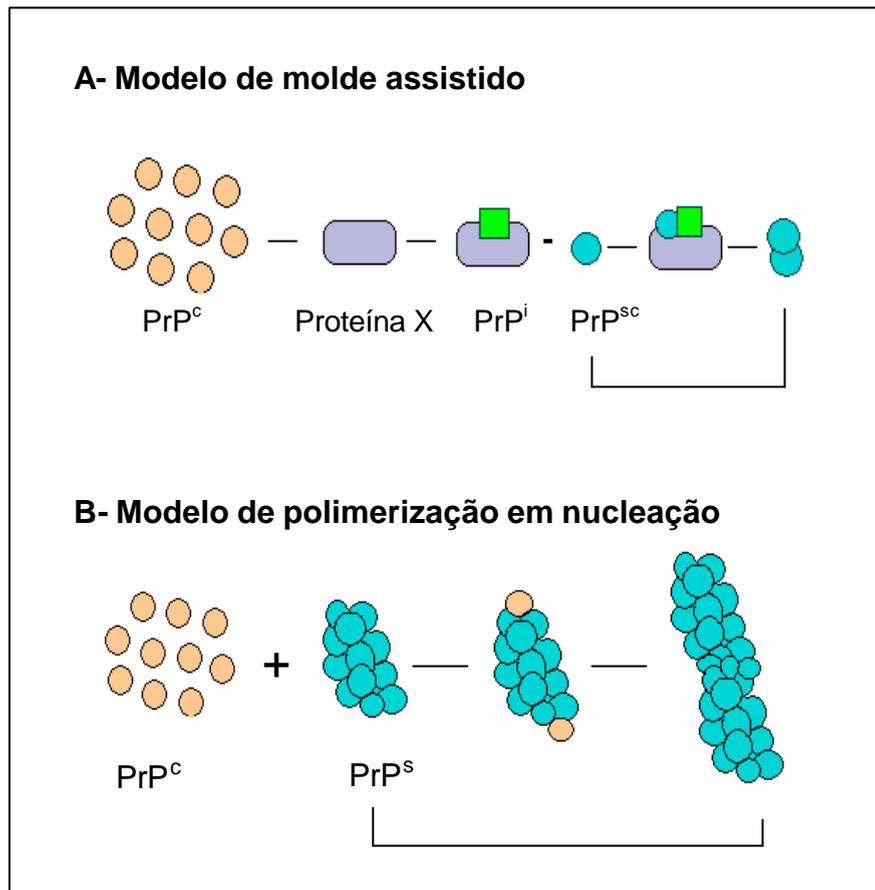
## 1.2 MECANISMO DE CONVERSÃO DE PrPc PARA PrPsc

O mecanismo patogênico das TSEs envolve a conversão de PrPc na forma patogênica, que é insolúvel em detergentes não-iônicos e parcialmente resistente à proteases. A participação de PrPc é absolutamente necessária para a infecção, uma vez que animais deficientes para o gene de PrPc são totalmente resistentes à infecção (BUELER et al. 1992). O evento central na conversão de PrPc para PrPsc é a mudança conformacional da estrutura predominantemente alfa-helicoidal de PrPc para a uma estrutura rica em folhas beta (PRUSINER 1998).

Existem duas hipóteses para a conversão conformacional de PrPc em PrPsc. A primeira delas denominada modelo de molde assistido, postula que a interação entre PrPsc (introduzido exógenamente) e PrPc (endógeno) induz a conversão de PrPc em PrPsc. Para isso uma outra proteína, denominada de proteína X, auxiliaria na formação de um estado intermediário entre PrPc e PrPsc. Uma alta barreira de energia pode prevenir a conversão espontânea de PrPc em PrPsc (Figura 3A) (AGUZZI e POLYMENIDOU 2004).

A segunda, denominada de modelo de polimerização de nucleação, propõem que PrPc e PrPsc estão em um equilíbrio termodinâmico reversível. PrPsc monoméricos podem ser recrutados e eventualmente agregar-se formando placas semelhantes a amilóides. A fragmentação de agregados de PrPsc aumenta o número de núcleos de agregados, que podem recrutar outros PrPsc e assim resultar em uma replicação exponencial do agente (Figura 3B) (COME et al. 1993).

Para testar estas hipóteses, é necessário conhecer as características estruturais de ambas as proteínas PrPc e PrPsc. A estrutura de PrPc tem sido intensivamente estudada com métodos de alta resolução, como cristalografia e ressonância magnética nuclear (NMR) (WUTHRICH e RIEK 2001). Em estudos de NMR RIEK et al. (1996) resolveram a estrutura de PrPc de camundongo recombinante (23-231) e mostraram que o segmento polipeptídico amino-terminal (23-120) é flexível e desordenado e a região carboxi-terminal possui uma estrutura globular (alfa-hélice e folha  $\beta$ ). Já a determinação da estrutura de PrPsc torna-se prejudicada devido a insolubilidade dos agregados (CAUGHEY 1991; CAUGHEY et al. 2001).



**Legenda:** A, no modelo de molde assistido, a principal etapa é a formação de um estado intermediário de PrPc (PrP<sup>i</sup>) quando interagido, por exemplo, com uma chaperonina molecular (proteína X). Este intermediário pode interagir com PrPsc (monomérico ou oligomérico), o qual atua como um molde para sua conversão; B, já no modelo de polimerização em nucleação, PrPsc é um pequeno oligômero que age como uma semente recrutando, convertendo e estabilizando PrPc para a forma infecciosa.

**Figura 3** - Modelos para conversão de PrPc em PrPsc.

Um dos principais problemas que intrigam a biologia de PrPc é a dificuldade de gerar o agente infeccioso *in vitro*.

PrPsc isolado de cérebros de animais infectados induz a conversão de PrPc em uma isoforma resistente a proteases, denominada PrPres, que pode ser produzida em cultura celular e em sistema livre de células (KIRBY et al. 2003).

Um novo sistema de conversão *in vitro* tem sido desenvolvido para converter grandes quantidades de PrPc em PrPres usando pequenas quantidades de PrPsc. Este sistema chamado de “Protein misfolding cyclic amplification” (PMCA), consiste na quebra de grandes agregados PrPsc formando pequenas unidades, que podem agir como unidades infecciosas e converter PrPc de homogenatos de cérebro normais em PrPsc (KIRBY et al. 2003).

Recentemente, foi demonstrado que fibrilas montadas a partir de fragmentos de proteína prion recombinante (resíduos 89-230) foram capazes de induzir TSE quando injetadas em camundongos transgênicos que superexpressam a mesma sequência de PrP (89-230) (LEGNAME et al. 2004).

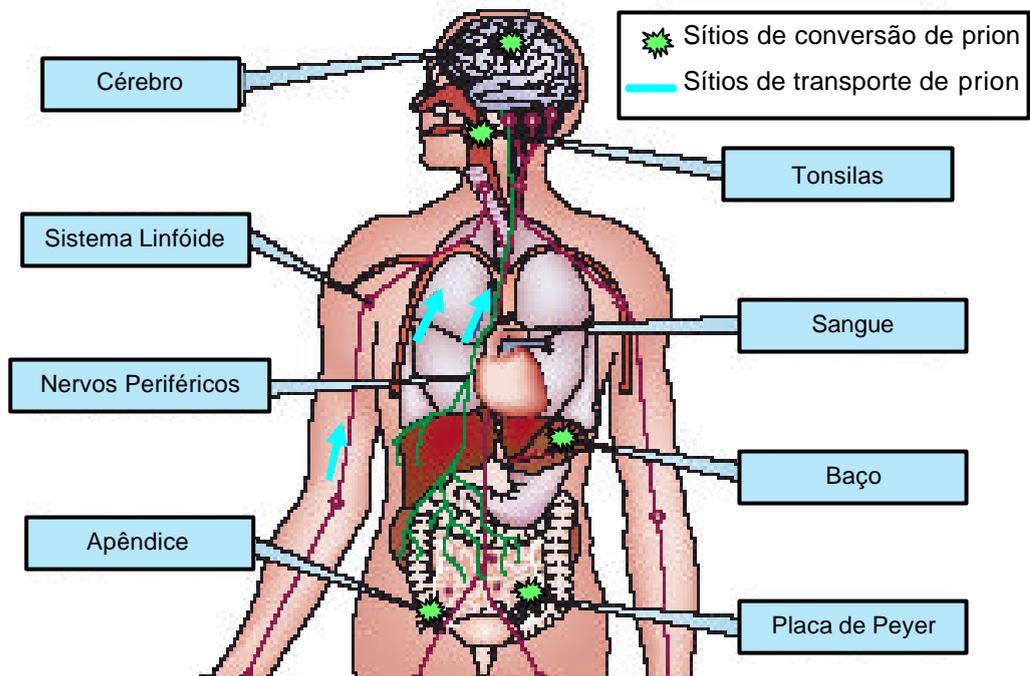
Embora inúmeros estudos tenham estabelecido a conversão de PrPc em PrPsc como o evento patogênico central da doença priônica a participação de outros fatores celulares na conversão de PrPc é ainda desconhecida.

SUPATTAPONE et al. (2001), DELEAULT et al. (2003) e KIRBY et al. (2003) demonstraram que moléculas específicas de RNA codificadas pelo hospedeiro estimulam a amplificação de PrPres *in vitro*. Este dado fornece evidências que outros fatores, como RNA, podem ter um papel na patogênese das doenças de prion.

Especula-se ainda que chaperoninas possam regular a transição conformacional de PrPc para PrPsc (DEBBURMAN et al. 1997; ZAHN 1999).

### 1.3 VIAS DE DISSEMINAÇÃO DA DOENÇA E NEUROINVASÃO

Sabe-se que o agente infeccioso pode converter PrPc no sistema nervoso central, mas em algumas formas da doença os prions “replicam-se” e acumulam-se primeiramente em tecido linfóide (AGUZZI et al. 2003). O agente infeccioso ingerido oralmente pode ser absorvido pelo intestino e encontrar a corrente sanguínea, na qual é transportado para os órgãos linfóides, neste tecido ocorre a primeira etapa de “replicação” e acumulação de prions antes que estes sejam transportados para o cérebro através dos nervos periféricos. Esta via tem sido proposta baseada em estudos de infectividade de vários órgãos (AGUZZI et al. 2003; KIMBERLIN e WALKER 1989). Além disso, estudos recentes usando técnicas de perfusão e depleção capilar em animais injetados com PrPsc purificado sugeriram que prions podem alcançar o cérebro diretamente, através da transposição da barreira hemato-encefálica (BANKS et al. 2004). Considerando as rotas pelo qual o agente infeccioso alcança o cérebro, parece claro que prions podem estar associados com vários tecidos periféricos e fluidos biológicos (Figura 4).



**Fonte:** Desenho esquemático adaptado de SOTO (2004).

**Legenda:** Prions ingeridos oralmente podem ser absorvidos no intestino, principalmente nas placas de Peyer, e transportados para os fluidos linfático e sanguíneo. Após a etapa de “replicação” periférica no baço, apêndice, tonsilas ou outros tecidos linfóides, os prions podem ser transportados para o cérebro principalmente pelos nervos periféricos. Penetração direta cruzando a barreira hemato encefálica é também possível.

**Figura 4** - Tecidos humanos e fluidos corpóreos envolvidos na propagação e transporte de prion.

## 1.4 DIAGNÓSTICO E TERAPIA

Até o presente momento não existe um diagnóstico *pré-mortem* preciso para TSEs. Em humanos o diagnóstico é baseado em exames clínicos. O diagnóstico definitivo pode somente ser feito *pós-mortem* por análises histológicas de cérebro observando as mudanças espongiiformes, astrogliose e

placas amilóides (embora essas placas não sejam consistentemente semelhantes em todas TSEs). Embora a biópsia cerebral tenha sido usada para estabelecer um diagnóstico definitivo, seu alto custo e invasividade são fatores determinantes para que os pacientes se recusem a realizar o exame ou que estes sejam questionados eticamente. Além disso, a biópsia cerebral gera resultados falso-negativos, nos casos em que a amostra tecidual não representa a área do cérebro infectada.

O diagnóstico clínico para sCJD é baseado em uma combinação de sinais clínicos como: demência multi-focal progressiva, mioclonia, sinais cerebelares e visuais juntamente com um eletroencefalograma (EEG) com complexos (1-2 ciclos/segundo) periódicos característicos. Um importante aspecto para diagnosticar sCJD, e distingui-la de doença de Alzheimer e outras demências, é a rápida progressão de sintomas clínicos e o curto período da doença, que é frequentemente menor que dois anos. Técnicas de imagem, como ressonância magnética são usadas geralmente para excluir outras enfermidades (COLLINS et al. 2000; INGROSSO et al. 2002; BRATOSIEWICZ et al. 1999).

A manifestação clínica de fCJD é muito similar à sCJD. Para estabelecer o diagnóstico de fCJD é realizado uma triagem genética para mutações em *Prnp* precedida de um acompanhamento na história familiar (BRATOSIEWICZ et al. 1999). vCJD inicialmente aparece como uma desordem neuropsiquiátrica progressiva que é caracterizada por sintomas de ansiedade, depressão e ilusão. Esta é combinada com ataxia, mioclonia e demencia. vCJD é diferenciada de sCJD pela duração da doença (frequentemente mais que 6 meses) e análise de EEG (vCJD não apresenta o padrão atípico que é observado em sCJD)

(COULTHARD et al. 1999). Além disso, como muitos casos de vCJD têm mostrado positividade para o teste de coloração para PrPres em tecido linfóide (tonsilas e apêndice), uma biópsia pode ajudar no diagnóstico (SOTO 2004).

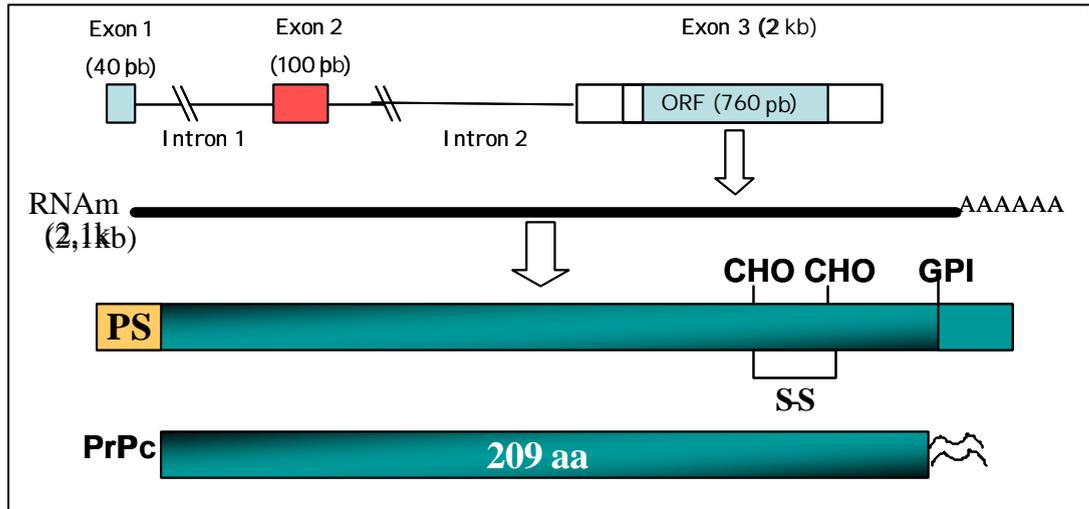
Já GSS é uma doença hereditária de padrão dominante com 100% de penetrância caracterizada por demência, ataxia, convulsões e um longo período de incubação (cinco a oito anos) (BOELLAARD et al. 1999; GHETTI et al. 1995). O diagnóstico é estabelecido por exames clínicos e triagem genética para mutações em *Prnp*. FFI também é uma doença hereditária dominante ligada a mutações em *Prnp*. Entretanto, o principal sinal clínico associado com FFI é a insônia, que é seguida por mioclonia, alucinação, ataxia e demência (CORTELLI et al. 1999).

No momento ainda não há disponível terapia para doenças priônicas, embora abordagens promissoras tenham sido exploradas. Diversas substâncias parecem possuir propriedades de cura para prion *in vitro*, incluindo Vermelho Congo (CAUGHEY e RACE 1992), anfotericina B, antraciclinas (TAGLIAVINI et al. 1997), poliânions sulfatados (CAUGHEY e RAYMOND 1993), porfirinas (PRIOLA et al. 1999), poliaminas (SUPATTAPONE et al. 2001), peptídeos (SOTO et al. 2000), curcumina (CAUGHEY et al. 2003) e mais recentemente pequenas moléculas de RNA de interferência (DAUDE et al. 2003). No entanto, nenhum destes componentes tem provado eficácia efetiva em testes *in vivo*.

## 1.5 BIOLOGIA DE PrPc

### 1.5.1 Do gene à proteína prion celular

O gene que codifica PrPc (denominado de *Prnp*) contém 3 exons em camundongos e ratos (cromossomo 2) e dois exons em humanos (cromossomo 20), sendo que no terceiro e no segundo exons respectivamente, está contida toda a fase aberta de leitura da proteína, sendo assim, *Prnp* não sofre “splicing” alternativo. Uma vez codificada, a proteína apresenta aproximadamente 250 aminoácidos (27kDa), com um peptídeo sinalizador na extremidade amino-terminal que é clivado no retículo endoplasmático durante a biossíntese de PrPc. Um peptídeo hidrofóbico na porção carboxi-terminal também é removido durante a adição de uma âncora de GPI (glicosil-fosfatidil-inositol). Além disso, outras modificações pós-traducionais ocorrem na molécula como: adição de oligossacarídeos N-ligados em regiões consenso (asparaginas nas posições 180 e 196) e formação de uma ponte dissulfeto intramolecular entre os resíduos de cisteína 179 e 214 (Figura 5).



**Legenda:** O exon 3 localizado no cromossomo 2 de camundongo contém toda a fase aberta de leitura que produz um transcrito de 2,1Kb que codifica para uma proteína de aproximadamente 27kDa. CHO são sítios de glicosilação nos resíduos 180 e 196. Ponte dissulfeto (S-S) formada nos resíduos (179 e 214). PS, peptídeo sinal (22 aminoácidos) e GPI, glicosil fosfatidil inositol.

**Figura 5** - Esquema representativo da estrutura gênica de PrPc murino.

### 1.5.2 Expressão e distribuição celular de PrPc

PrPc é constitutivamente expresso em diferentes tecidos de animais adultos (BASLER et al. 1986) e suas concentrações são altamente reguladas durante o desenvolvimento e pelo fator de crescimento de nervos (NGF) (MANSON et al. 1992; GRANER et al. 2000a). Nosso grupo também demonstrou que a atividade do promotor de PrPc é altamente dependente da estrutura da cromatina (CABRAL et al. 2002).

A expressão do mRNA de PrPc parece ser variável durante as fases do desenvolvimento embrionário como mostrado por vários trabalhos realizados através de hibridização *in situ* (MCKINLEY et al. 1987; MOBLEY et al. 1988; MANSON et al. 1992; HARRIS et al. 1993). No camundongo o RNA mensageiro de PrPc pode ser detectado no tubo neural a partir do décimo terceiro dia de

vida uterina, aumentando de quantidade após o nascimento. Também foi encontrado nas células de Purkinje, no hipocampo, na medula espinhal, em gânglios periféricos e nervos (MCKINLEY et al. 1987).

Publicações recentes, no entanto, apontam uma atividade do promotor de PrPc a partir do dia 12,5 no cérebro e medula (ASANTE et al. 2002a), além disso, encontrou-se expressão do mRNA de PrPc a partir de E9, 5 em cérebro e medula espinhal (MIELE et al. 2003). Após o nascimento a expressão da proteína aumenta até um pico de expressão no dia 14 pós-natal. Dependendo da região do cérebro, estes níveis se mantêm ou diminuem no animal adulto; no bulbo olfatório e no hipocampo a expressão é mantida alta, enquanto que no córtex esta diminui (SALES et al. 2002). A expressão também é diferencial de acordo com o tipo neuronal, enquanto neurônios gabaérgicos expressam grandes quantidades de PrPc, neurônios dopaminérgicos não expressam praticamente nada. Esta regulação parece ocorrer ao nível pós-transcricional, já que o RNA mensageiro aparece bastante abundante na maioria dos neurônios (FORD et al. 2002a). No animal adulto, além do cérebro, PrPc foi visto em nervos periféricos, gânglios simpáticos e células componentes do sistema imune, como células dendríticas (FORD et al. 2002b).

Em relação a localização subcelular, a proteína foi vista em membranas celulares pré-sinápticas (HERMS et al. 1999), em axônios em crescimento (SALES et al. 2002) e no citosol de alguns tipos neuronais (MIRONOV et al. 2003).

A internalização de PrPc da membrana plasmática ocorre constitutivamente em cultura celular e na grande maioria das vezes a proteína recicla e retorna

para a membrana plasmática sem ser degradada (SHYNG et al. 1993). Este processo é relacionado com a disponibilidade da proteína na superfície celular e envolve vias de internalização que podem ser críticas para a função fisiológica de PrPc. Desta forma, o tráfego e a localização específica de PrPc podem oferecer condições favoráveis para interação com outros ligantes e/ou com PrPsc propiciando a conversão em moléculas infecciosas.

O tráfego de PrPc parece ser um evento celular complexo e pode envolver mais que um mecanismo de internalização como cavéola e vesículas encapadas por clatrina (Figura 6) (PRADO et al. 2004). Experimentos iniciais mostraram a presença de PrPc em organelas endocíticas (SHYNG et al. 1993) e um possível envolvimento de vesículas encapadas por clatrina (SHYNG et al. 1994). Entretanto, PETERS et al. (2003) afirmaram que a internalização de PrPc se dá por cavéola. Além disso, foi mostrado que o cobre é capaz de estimular a endocitose de PrPc de aves e de mamíferos (LEE et al. 2001; PERERA e HOOPER 2001; BROWN e HARRIS 2003). Foi sugerido ainda que a ligação de cobre a PrPc (item 1.71) poderia alterar a conformação do mesmo de tal maneira que aumentaria a sua afinidade por um possível receptor (PAULY e HARRIS 1998).

É importante ressaltar que algumas mutações em *Prnp*, relacionadas às doenças priônicas, são capazes de alterar o tráfego e/ou a localização da proteína. Foi proposto que a mutação do resíduo de alanina 117 para valina, que ocorre em GSS, pudesse estimular a produção de uma molécula transmembrânica de PrPc e que essa biogênese anormal seria um componente chave para a neurodegeneração (HEGDE et al. 1998). As substituições dos

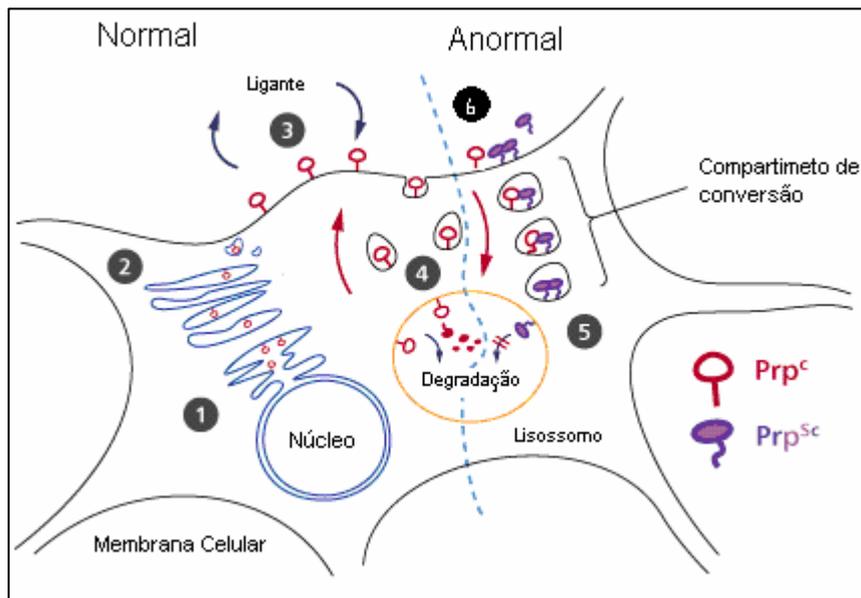
resíduos de PrPc (E200K e D178N) relacionadas com as doenças de CJD e FFI causam anomalias na distribuição de PrPc (NEGRO et al. 2001). Outras mutações, que introduzem um novo códon de terminação produzindo PrPc truncado, resultam na translocação da proteína para o núcleo (LORENZ et al. 2002). Assim, o enovelamento errôneo, bem como o desvio da trajetória normal tomada por PrPc mutantes pode ser um fator importante para a patogênese, sugerindo mais uma vez que o tráfego de PrPc está intimamente relacionado com a sua função fisiológica.

PrPc se mostra presente em domínios especializados de membrana plasmática ricos em esfingolipídios e colesterol denominados de “rafts”. Dados recentes indicam que a região N-terminal de PrPc (resíduos 23-90) atua como um sítio determinante da localização de PrPc em “rafts” (WALMSLEY et al. 2003). Nestes domínios grande parte de proteínas ancoradas via GPI encontram-se acumuladas e podem sofrer um mecanismo de internalização semelhante a cavéola (MADORE et al. 1999).

Dados recentes do nosso grupo mostram que a molécula de PrPc trafega através de complexo de Golgi, membrana plasmática e endossomos de reciclagem precoces. Além disso, a dinamina, uma GTPase envolvida na excisão de vesículas endocíticas, participa nos passos iniciais da internalização de PrPc (MAGALHÃES et al. 2002).

No que se refere a conversão de PrPc em PrPsc, alguns estudos propõem diferentes compartimentos celulares envolvidos no processo. Foi demonstrado que o transporte retrógrado de PrPc para o retículo endoplasmático estimula a formação de PrPsc nas células infectadas por prion

(BERANGER et al. 2002), dando suporte aos estudos anteriores que sugerem que a conversão de PrPc para PrPsc dá-se após a internalização de PrPc nos compartimentos intracelulares (MCKINLEY et al. 1991; ARNOLD et al. 1995). Por outro lado, foi proposto que a conversão de PrPc para PrPsc pode ocorrer na membrana plasmática dentro dos “rafts”, onde normalmente as moléculas de PrPc estão agrupadas (KANEKO et al. 1997). Além disso, BARON et al. (2002) mostraram que a conversão de PrPc para PrPsc pode ocorrer em um sistema livre de células, contendo somente uma preparação de domínios de membrana ricos em colesterol e uma fração microsomal. O fator essencial para que ocorra a conversão nesse sistema é que o inóculo de PrPsc esteja contido em uma membrana contígua àquela de PrPc. Interessantemente, foi mostrado que PrPc pode ser transferido de uma célula para outra, nas condições em que a proteína quinase C esteja ativada e que as células doadoras e receptoras estejam em contato físico (LIU et al. 2002). Assim, o mecanismo de conversão parece ocorrer tanto em compartimentos intracelulares como na membrana plasmática.



**Fonte:** Adaptada do site [www.chemsoc.org/.../2002/jones\\_apr02\\_box.gif](http://www.chemsoc.org/.../2002/jones_apr02_box.gif)

**Legenda:** Em condições normais, PrPc é sintetizado no retículo endoplasmático e sofre modificações pós-traducionais no lúmen deste (1). Após a síntese, a proteína é endereçada para a membrana plasmática atravessando o complexo de Golgi (2). Quando em contato ou não com um ligante (3) PrPc é internado podendo trafegar através do Golgi, endossomos iniciais e de reciclagem e ainda podendo ser encaminhado para degradação em lisossomos (4). Em condições anormais, é sugerido que PrPc, quando em contato com PrPsc em compartimentos intracelulares (5) ou na superfície celular (6), seja convertido em PrPsc. Devido a sua insolubilidade, PrPsc torna-se resistente à degradação e seu acúmulo acarreta em morte celular. O pontilhado azul separa as condições normais e anormais no diagrama acima.

**Figura 6** - Tráfego de PrPc e PrPsc.

## 1.6 CAMUNDONGOS DEFICIENTES DE *Prnp*

Várias abordagens foram conduzidas para a geração de animais transgênicos onde o gene de PrPc foi removido, na tentativa de gerar modelos para o estudo não só da patogênese e transmissão das doenças priônicas, mas também para esclarecer a importância biológica de PrPc.

Todas as cepas de animais deficientes para *Prnp* apresentaram-se completamente resistentes à infecção por prions, confirmando que PrPc é absolutamente necessário para o processo de infecção (BUELER et al. 1992; MANSON et al. 1994; MALLUCCI et al. 2002 e 2003).

Entretanto, no que se referem às funções fisiológicas de PrPc, os resultados mostrados por esses animais ainda são contraditórios.

O grupo do Prof. Charles Weissmann, gerou a primeira linhagem de camundongos, denominada de Zurich-I ou *Prnp*<sup>0/0</sup>, na qual somente a região codificadora de *Prnp* (resíduos 4-187) foi substituída por um marcador de seleção (neomicina) (BUELER et al. 1992). A segunda linhagem de camundongos deficientes para *Prnp*, designada Edinburgh *Prnp*<sup>-/-</sup>, foi gerada por MANSON et al. (1994) empregando a estratégia de inserir um marcador de seleção (neomicina) em um único sítio *Kpn I* contido na fase aberta de leitura de *Prnp*, interrompendo a região codificadora de *Prnp*.

Os animais Zurich-I *Prnp*<sup>0/0</sup>, não apresentaram nenhuma anormalidade severa (BUELER et al. 1993). Entretanto, outros grupos mostraram que estes camundongos (MOORE et al. 1999) possuíam uma diminuição da LTP ("long term potentiation") no hipocampo e uma alteração no ritmo circadiano (TOBLER et al. 1996).

Nosso grupo descreveu que animais Zurich-I *Prnp*<sup>0/0</sup> (BUELER et al. 1992) são mais sensíveis a drogas convulsivantes (WALZ et al. 2002) e possuem atividade locomotora alterada (ROESLER et al. 1999). Além disso, descrevemos que a consolidação das memórias de curta e longa duração apresenta-se

prejudicadas em animais *Prnp*<sup>0/0</sup> idosos, quando comparadas com animais tipo selvagem da mesma idade (COITINHO et al. 2003).

KUWAHARA et al. (1999) mostraram uma morte celular exacerbada em linhagens neuronais imortalizadas obtidas a partir de animais deficientes para *Prnp*. Contrariamente, um outro estudo mostra que culturas primárias neuronais provenientes de animais Zurich-I *Prnp*<sup>0/0</sup> são mais resistentes a apoptose induzida por estaurosporina devido a diminuição de atividade e expressão de caspase 3, p53 e aumento de expressão de Mdm-2 (PAITEL et al. 2004).

Outras três cepas de camundongos deficientes para PrPc foram geradas (*Prnp*<sup>-/-</sup> Nagazaki, Rcm0 e *Prnp*<sup>-/-</sup> Zurich II) com extensas deleções na seqüência que flanqueia a região codificadora de *Prnp*.

No camundongo *Prnp*<sup>-/-</sup> Nagazaki, não só a região codificadora de *Prnp*, mas também 0,9 kb do intron 2 a 5' da região não codificadora, e 0,45 kb da região 3' não codificadora de *Prnp* foram deletadas e substituídas por um marcador de seleção (neomicina) (SAKAGUSHI et al. 1996). Nos camundongos *Prnp*<sup>-/-</sup> Zurich II e Rcm0 a região codificadora de *Prnp* e a seqüência que flanqueia a última foram substituídas por uma seqüência *loxP* e um cassete HPRT (Fosforribosiltransferase hipoxantina) respectivamente (SILVERMAN et al. 2000 e ROSSI et al. 2000). Contrariamente, aos camundongos produzidos por BUELER e MANSON, aqueles com extensivas deleções em *Prnp* (*Prnp*<sup>-/-</sup> Nagazaki, Rcm0 e *Prnp*<sup>-/-</sup> Zurich II) desenvolveram distúrbios motores (ataxia) e diminuição acentuada da camada de células de Purkinje no cerebelo (SAKAGUCHI et al. 1996; MOORE et al. 1999; MONTRASIO et al. 2001). Este

fenótipo foi atribuído originalmente à ausência de PrPc, porque a introdução de um *Prnp* transgênico abolia a neurodegeneração nesses animais.

A discrepância de fenótipos entre diferentes animais deficientes para *Prnp* foi posteriormente solucionada, quando WESTAWAY et al. (MOORE et al. 1999) sequenciaram a região a jusante de *Prnp*. Neste domínio, foi descoberta a seqüência codificadora de uma proteína com homologia a PrPc denominada de Doppel (Dpl) (“downstream of the *Prnp* locus”). Dpl é uma proteína N-glicosilada, ancorada via GPI, normalmente expressa em diferentes tecidos, mas não em cérebro pós-natal (SILVERMAN et al. 2000). Sua função fisiológica ainda é desconhecida, mas sua ausência causa esterilidade em camundongos machos (BEHRENS et al. 2002). Nas linhagens de camundongos deficientes para *Prnp* que desenvolvem ataxia, um “splicing” intergênico faz com que o gene de Dpl fique sob controle do promotor de *Prnp*, provavelmente devido à deleção de uma seqüência do intron 2 de *Prnp* que inclui seu sítio acceptor de “splicing”, levando a expressão de altas concentrações de Dpl no cérebro (MOORE et al. 1999).

O início da ataxia e perda de células de Purkinje dependem diretamente do aumento de Dpl no sistema nervoso central de camundongos deficientes para PrPc, assim a neurodegeneração nesses animais é resultado de uma atividade neurotóxica de Dpl (MOORE et al. 2001; ROSSI et al. 2001). Para estabelecer o papel de Dpl no fenótipo neurodegenerativo em camundongos com extensivas deleções de *Prnp*, o grupo de Adriano Aguzzi interrompeu o gene de Dpl em camundongos Zurich II. Esses animais deletados duplamente para Dpl e *Prnp* não desenvolveram ataxia, confirmando que este fenótipo é causado por Dpl e não pela retirada de PrPc (GENOUD et al. 2004). Entretanto, o mecanismo

molecular pelo qual a superexpressão de Dpl no cérebro induz a degeneração cerebelar continua sob investigação.

Em 2002, COLLINGE et al. gerou uma linhagem de camundongos duplo transgênicos usando o sistema de Cre/LoxP, a fim de examinar os efeitos da depleção pós-natal de PrPc na sobrevivência neuronal e função no cérebro adulto (MALLUCCI et al. 2002). Cre, uma recombinase de bacteriófago (SAUER 2002) sob controle do promotor de neurofilamento H, medeia a deleção de PrPc apenas em neurônios de animais transgênicos (Cre/LoxP) após 9 semanas de idade. Esses animais permaneceram saudáveis sem evidências de neurodegeneração ou outras mudanças histopatológicas por mais de 15 meses após a recombinação. Entretanto, em uma avaliação neurofisiológica os animais mostraram uma redução significativa de potenciais de hiperpolarização tardia em células CA1 do hipocampo, sugerindo um papel direto para PrPc na modulação de excitabilidade neuronal. O mesmo grupo demonstrou que esses animais, “knockout” condicionais para *Prnp* neuronal, quando infectados por prion, apresentaram reversão da espongiose, da perda neuronal e da progressão clínica da doença. Assim, esses resultados sugerem que a propagação de PrPsc não neuronal não é neurotóxica, mas sim patogênica (MALLUCCI et al. 2002 e 2003).

Juntos esses resultados sugerem que o fenótipo apresentado pelos animais deletados para *Prnp* não é totalmente normal, mas que algo mais grosseiro possa ser evitado por mecanismos compensatórios causados por proteínas redundantes a PrPc (BUELER et al. 1992).

## 1.7 PrPc: FUNÇÕES BIOLÓGICAS E SEUS LIGANTES

### 1.7.1 Ligantes de PrPc descritos

Como PrPc é extremamente conservado evolutivamente (GABRIEL et al. 1992), sugere-se que tenha função celular importante. Atualmente, muitos grupos de pesquisa vêm trabalhando com diferentes modelos com a finalidade de entender a função biológica de PrPc. Por exemplo, foi proposto que o receptor de laminina de 66kDa interaja com PrPc e participe da sua internalização (GAUCZYNSKI et al. 2001). Recentemente, foi mostrado que este receptor é requerido para a propagação de PrPsc em células neuronais infectadas com *scrapie* (LEUCHT et al. 2003). PrPc interage também com plasminogênio e modula sua atividade (ELLIS et al. 2002).

Além disso, é sabido que PrPc associa-se a íons cobre na região dos aminoácidos 51-89, onde há cinco repetições de um domínio de oito aminoácidos (“octarepeats”), sendo esta ligação importante na estabilização estrutural da molécula (MIURA et al. 1996; BROWN et al. 1997a). Recentemente foi mostrado que a capacidade de ligação a cobre radiotivamente marcado na membrana celular era diretamente dependente da concentração de PrPc (RACHIDI et al. 2003).

O cobre é um elemento importante para várias enzimas envolvidas com a proteção contra estresse oxidativo e, de fato, foi observado que PrPc possui uma atividade semelhante a da enzima superóxido dismutase (BROWN e BESINGER 1998). Foi mostrado também que PrPc participa na modulação da ativação de plasminogênio tecidual de maneira dependente de íons cobre

(ELLIS et al. 2002). Além disso, células de animais deficientes para PrPc são mais sensíveis a radicais livres que células normais (BROWN et al. 1997b e 2002). Esta observação complementada pelo fato de que a reintrodução do gene de PrPc reverte o fenótipo de sensibilidade (VASSALLO e HERMS 2003), sugerem que PrPc faça parte de um sistema de proteção contra o estresse oxidativo. Este, no entanto, é um ponto controverso e recentemente foi visto que animais deficientes para PrPc ou que super-expressam PrPc não possuem nenhuma alteração na atividade de SOD (HUTTER et al. 2003).

Além destas já descritas aqui, inúmeras moléculas foram identificadas como sendo ligantes ou receptores de PrPc, tais como Aplp1, Nrf2 (YEHIELY et al. 1997), glicosaminoglicanas (GONZALEZ-IGLESIAS et al. 2002), N-CAM (SCHMITT-ULMS et al. 2001), distroglicana (KESHET et al. 2000), heparina, heparan sulfato (WARNER et al. 2002) entre outras (LEE et al. 2003).

Além disso, PrPc recombinante interage especificamente com sequências de ácido nucléico (DNA) que convertem a isoforma celular para conformação rica em folhas  $\beta$ -pregueadas (CORDEIRO et al. 2001). Contudo, a maioria dessas interações não trouxe novas informações em relação à função celular de PrPc, devido à falta de demonstração de um evento fisiológico associado.

Existem evidências que sugerem que PrPc poderia ser uma molécula de sinalização. Por exemplo, MOUILLET-RICHARD et al. (2000) mostraram que PrPc pode sinalizar ativando Fyn quinase em uma linhagem celular capaz de se diferenciar em neurônio. Outras moléculas importantes para os processos de sinalização neuronal, tais como, sinapsina Ib e Grb2, foram identificadas como ligantes de PrPc (SPIELHAUPTER e SCHATZL 2001). PrPc bovino também é

capaz de interagir fortemente com a subunidade catalítica de proteína caseína kinase, aumentando a atividade de fosfotransferase desta enzima (MEGGIO et al. 2000).

Recentemente, foi descrito o envolvimento de PrPc no estímulo de vias de sinalização de Fyn quinase, fosfatidil-inositol-3 quinase (PI3K), proteína quinase dependente de cAMP (PKA) e proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), em cultura de células granulares do cerebelo, o que resultou em crescimento neurítico (CHEN S et al. 2003).

## **1.7.2 PrPc como ligante de proteínas de matriz extracelular**

### **1.7.2.1 Laminina**

Algumas interações demonstradas pelo nosso grupo foram de fundamental importância no conhecimento sobre o papel fisiológico de PrPc.

Uma delas é a interação específica e de alta afinidade entre PrPc e laminina (Ln) (GRANER et al. 2000a e b).

Nosso grupo, além de mostrar a alta especificidade e afinidade entre PrPc e laminina, mostrou que o complexo PrPc-Ln medeia neuritogênese, tanto em células PC-12 quanto em células de cultura primária de hipocampo de ratos e camundongos (GRANER et al. 2000a e b). O sítio de ligação de Ln ao PrPc é o decapeptídeo (RNIAEIKDI) situado na região carboxi-terminal da cadeia  $\gamma 1$  de Ln (GRANER et al. 2000a e b) e o domínio de PrPc onde Ln se liga compreende os aminoácidos 173-183 (COITINHO et al. 2003, Anexo 4).

Laminina é a principal proteína não colagênica da matriz extracelular e é importante para um grande número de processos biológicos, como por exemplo

embriogênese, formação de tecidos, fenômenos imunológicos entre outros. Laminina é constituída de três cadeias,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , que se arranjam em forma em cruz, com os braços mais longos de cada cadeia formando uma hélice (BECK et al. 1990). Até o presente momento foram descritos 5 tipos diferentes de cadeias  $\alpha$ , três de cadeia  $\beta$  e 3 de cadeia  $\gamma$  o que possibilita a formação de 45 potenciais tipos diferentes desta molécula, até hoje apenas 15 tipos já foram demonstrados *in vitro* e *in vivo* (COLOGNATO e YURCHENCO 2000). No hipocampo, a forma predominante é laminina 10, composta por  $\alpha5\beta1\gamma1$  (INDYK et al. 2003).

Durante o desenvolvimento, do sistema nervoso periférico, há expressão proeminente de várias de cadeias de Ln no trajeto a ser seguido pelos axônios em crescimento, sendo a cadeia  $\gamma1$  presente em todos os momentos (LENTZ et al. 1997). Em gânglios da raiz dorsal adultos há uma alta expressão da subunidade  $\gamma1$  (LE BEAU et al. 1994), que aumenta após lesões (LE BEAU et al. 1995).

O papel desta proteína no sistema nervoso é extremamente vasto e muito bem documentado (LUCKENBILL-EDDS 1997). A sobrevivência neuronal (CHEN e STRICKLAND 1997; CHEN e STRICKLAND 2003; CHEN et al. 2003) e o crescimento neurítico são promovidos por laminina e podem ser vistos tanto em neurônios centrais quanto em periféricos (MANTHORPE et al. 1983; LIESI et al. 2001).

Os principais receptores celulares para laminina são as integrinas, sendo várias as combinações de sub-unidades capazes da ligação em laminina como por exemplo,  $\alpha1\beta1$  (TOMASELLI et al. 1990),  $\alpha3\beta?$  (GEHLSSEN et al. 1992; TASHIRO et al. 1999; SHANG et al. 2001),  $\alpha6\beta1$  (SONNENBERG et al. 1991),

$\alpha V\beta 3$  (SASAKI e TIMPL 2001). Além disso, a maioria dos trabalhos mapeia o domínio de ligação a integrinas na subunidade  $\alpha$  de laminina, porém este não inclui o peptídeo RGD, conhecido por ser responsável pela ligação de fibronectina ou vitronectina às integrinas. Por outro lado também foi descrita a ligação de  $\alpha V\beta 3$  ou  $\alpha 5\beta 1$  na cadeia  $\gamma 1$  da laminina (PONCE et al. 2001).

No braço longo da cadeia  $\gamma 1$  também há um domínio ativo que participa na indução de crescimento de neuritos, na migração neuronal e na regeneração do sistema nervoso (LIESI et al. 2001; LIEBKIND et al. 2003; WIKSTEN et al. 2003). Este é o domínio de laminina responsável pela ligação a PrPc, como demonstrado nos trabalhos do grupo (GRANER et al. 2000a e b).

### 1.7.2.2 Vitronectina

Diante dos dados anteriores do grupo, que demonstram a interação de PrPc com Ln (GRANER et al. 2000a e b), decidimos investigar se a interação de PrPc com outra proteína de matriz extracelular, vitronectina (Vn) também poderia exercer algum papel biológico no sistema nervoso. Estes resultados fazem parte da tese e serão relatados no item resultados (4.4-Anexo 4)

Vn é uma glicoproteína abundante no sangue em diversos tecidos, que está envolvida em vários processos biológicos tais como adesão celular, mecanismo de defesa humoral e invasão celular (PREISSNER 1991).

VN foi purificada a partir de soro em 1967, por HOLMES, e denominada “serum-spreading factor” por ser capaz de provocar adesão celular, de modo semelhante à fibronectina (PREISSNER 1991). Com o desenvolvimento de anticorpos específicos tornou-se possível verificar a presença de Vn em músculo

esquelético, rins, tecido conjuntivo e membranas fetais (HAYMAN et al. 1983). A maior parte da Vn encontrada no plasma é proveniente do fígado, mas células do músculo liso arterial e glioblastomas também são capazes de produzi-la e secretá-la. Foi detectada sua presença também em plaquetas, macrófagos (PREISSNER 1991) e células do sistema nervoso, como astrócitos e neurônios, principalmente células de Purkinje (MARTINEZ-MORALES et al. 1995; SEIFFERT 1997; MARTINEZ-MORALES et al. 1997; WALKER e MCGEER 1998). Também foi descrita em áreas de fibrose e necrose em vários tecidos, incluindo doenças do sistema nervoso (SEIFFERT 1997).

A fase aberta de leitura do gene de Vn codifica para uma proteína de 459 aminoácidos e peso molecular aparente de 75 kDa. Um peptídeo sinal de 19 aminoácidos sinaliza a secreção de Vn para o meio extracelular e três sítios consenso são sinais de glicosilação, sendo que os açúcares podem contribuir com cerca de 30% da massa da proteína. A vitronectina humana possui cerca de 80% de homologia com coelho e camundongo (SCHVARTZ et al. 1999). A molécula inteira de Vn nunca foi cristalizada e sua estrutura secundária foi proposta recentemente por XU et al. (2001).

Há duas formas de Vn presentes no sangue: uma única cadeia polipeptídica de 75 kDa, e outra de duas cadeias de 65 e 10kDa interligadas por uma ponte dissulfeto (Cys<sup>274</sup>-Cys<sup>453</sup>). A forma predominante de Vn na circulação é a forma monomérica. A proteína em sua forma nativa praticamente não apresenta sulfidrilas livres, enquanto a forma desnaturada apresenta duas, de modo que a desnaturação aumenta a tendência de formação de pontes dissulfeto entre moléculas e, conseqüente oligomerização. Acredita-se que esta

seja a forma da proteína preferencialmente encontrada na matriz extracelular (PREISSNER 1991; ZHUANG et al. 1996a e b).

Assim como a fibronectina, Vn possui múltiplos sítios ativos: um sítio de ligação a integrinas, um sítio de ligação a glicosaminoglicanos e um sítio de ligação ao complexo trombina-antitrombina (SUZUKI et al. 1985; RUOSLAHTI e PIERSCHBACHER 1987).

A primeira função biológica atribuída à Vn foi sua capacidade de provocar adesão celular, configurando-se na principal proteína de adesão presente no soro, sendo capaz de substituí-lo no papel de indutor da adesão (HAYMAN et al. 1983). Esta propriedade advém tanto da ligação com heparina quanto da interação do domínio RGD com integrinas. As integrinas ligam-se às proteínas de matriz e formam “clusters” na membrana celular, o que leva à interação com proteínas de citoesqueleto e ao mesmo tempo dispara cascatas de sinalização intracelulares. A ligação de uma proteína de matriz a diferentes integrinas depende do tipo e do ambiente celular e faz com que diferentes cascatas de sinalização possam emergir a partir da ligação de uma molécula, levando a célula a processos metabólicos distintos. Por outro lado, uma mesma integrina pode ligar-se a mais de uma proteína de matriz, resultando em perda de especificidade e redundância (HYNES 1992; GIANCOTTI e RUOSLAHTI 1999; HYNES 2002).

No que diz respeito à sua ligação com integrinas, Vn é capaz de promover o espraiamento celular de maneira dependente de  $\alpha_v\beta_3$  e mediada pela via de MAPK (ROBERTS et al. 2003).

Apesar de suas importantes funções no organismo, camundongos deficientes do gene da Vn possuem fenótipo normal, não apresentando nenhum distúrbio de crescimento ou fertilidade. A teoria mais aceita é de que este fato seria devido à redundância na ligação com integrinas, que na ausência de Vn poderiam estar sendo ativadas por outras proteínas de matriz (ZHENG et al. 1995).

São de particular interesse as propriedades neurotróficas da Vn. A aderência celular e a expansão de neuritos foi observada tanto em linhagem celular (GRABHAM et al. 1992) quanto em culturas primárias de células nervosas de retina (MARTINEZ-MORALES et al. 1995), tubo neural (MARTINEZ-MORALES et al. 1997) e células de Purkinje do cerebelo (WALKER e MCGEER 1998).

### **1.7.3 STI1 (“Stress inducible protein 1)**

A importância da internalização de PrPc para o processo infeccioso levou a sugerir a existência de uma proteína receptora/ligante de PrPc que fosse responsável por sua internalização, por possível transdução de sinal e ainda, pela entrada do agente PrPsc e que participasse na infecção celular (SHYNG et al. 1995).

Assim, na tentativa de caracterizar um receptor para PrPc, nosso grupo baseou-se em alguns dados da literatura. Sabe-se que o peptídeo 106-126 do PrPc humano é capaz de reproduzir em culturas de células, alguns efeitos do PrPsc, sendo neurotóxico e formando agregados insolúveis com características de material amilóide (FORLONI et al. 1993). Um peptídeo menor,

correspondente aos resíduos 106-114, também de PrPc humano, não se mostrou neurotóxico (FORLONI et al. 1993). SHYNG et al. (1994) através da construção de proteínas mutantes, demonstraram que a seqüência 117-135 do PrPc de galinha é necessária para a endocitose dessa proteína através de vesículas de clatrina. Essa seqüência corresponde aos resíduos 105-122 do PrPc humano. Deve-se enfatizar também que este peptídeo está contido em uma região altamente conservada entre a proteína prion celular de várias espécies (GABRIEL et al. 1992).

De posse destes dados, especulamos que a base para essa neurotoxicidade seletiva residia no fato do peptídeo 106-126 conter o sítio de ligação ao possível receptor celular capaz de internalizar PrPsc e induzir sinais tóxicos. Assim, fundamentados na teoria da hidropaticidade complementar, (BRENTANI 1988; BLALOCK 1990) que propõe que peptídeos codificados por fitas complementares do DNA são capazes de interagir entre si, deduzimos uma seqüência teórica de um peptídeo - HVATKAPHHGPCRSSA - a partir da seqüência de nucleotídeos complementares àquela que codifica o peptídeo 114-129 do PrPc humano. De acordo com a teoria da hidropaticidade complementar, o peptídeo deduzido deve apresentar a mesma conformação do sítio de ligação de uma proteína receptora do PrPc e do PrPsc. Esse peptídeo foi sintetizado e utilizado na imunização de camundongos. O anticorpo contra esse peptídeo reconhece, em "immuno-blotting" de preparações de membrana plasmática purificada de cérebro de camundongos, uma proteína de 66kDa que liga PrPc. Experimentos de imunofluorescência e de microscopia confocal, realizados em culturas primárias de neurônio, mostraram que o soro anti-peptídeo

complementar reconhece um antígeno na membrana celular. Além desses resultados esse mesmo soro e o peptídeo complementar, usado na sua produção, são capazes de bloquear *ex vivo*, os efeitos neurotóxicos mediados pelo peptídeo 106-126 (MARTINS et al. 1997).

Portanto, nossos achados sugeriam fortemente a existência de um receptor/ligante para prion que poderia ser responsável não só pela internalização dessas proteínas, como também deveria mediar alguma resposta celular ao se associar à PrPc (MARTINS et al. 1997).

Através de uma combinação de experimentos bioquímicos conseguimos identificar e caracterizar a proteína denominada STI1 ("stress inducible protein 1") como o receptor/ligante de PrPc (detalhes no Anexo II- ZANATA et al. 2002).

STI1 ou Hop ("Hsp70/Hsp90 Organizing protein") é uma co-chaperonina capaz de se associar diretamente com proteínas de choque térmico de 70 e 90 kDa (SMITH et al. 1993; SCHUMACHER et al. 1994; CHANG et al. 1997).

Chaperoninas moleculares são uma família de proteínas que auxiliam na conformação estrutural de outras proteínas em condições fisiológicas ou de estresse. A principal família de chaperoninas moleculares são as proteínas de choque térmico (Hsps) que são classificadas de acordo com sua massa molecular em kDa. Recentemente, inúmeras evidências mostram o envolvimento de co-chaperoninas na regulação de chaperoninas, particularmente Hsp70 e 90.

STI1 foi primeiramente identificada em *Saccharomyces cerevisiae* durante um estudo genético que visava identificar fatores que induzissem a expressão gênica de proteínas de choque térmico (NICOLET e CRAIG 1989).

Homólogos de STI1 têm sido identificados em humanos, camundongos, insetos, leveduras, plantas, parasitas e vírus (HONORE et al. 1992; JOSHI et al. 1993; HERNANDEZ et al. 1995; BLATCH et al. 1997; WEBB et al. 1997; DEMAND et al. 1998; ADAMS et al. 2000; CARLTON et al. 2002; WOOD et al. 2002; ZHANG et al. 2003). O genoma humano contém uma cópia do gene que codifica STI1 no cromossomo 11q13.1 e este contém 14 exons. Interessantemente, o gene de STI1 é flanqueado por genes que codificam Hsp40 e vários genes relacionados a câncer (Figura 7). Já no genoma murino o gene que codifica STI1 está localizado no cromossomo 19 contendo também 14 exons. O transcrito de STI1 humano, assim como o murino, contém aproximadamente 2,079 pares de bases que codificam para uma seqüência de 543 aminoácidos resultando em peso molecular aparente de kDa (Figura 7).

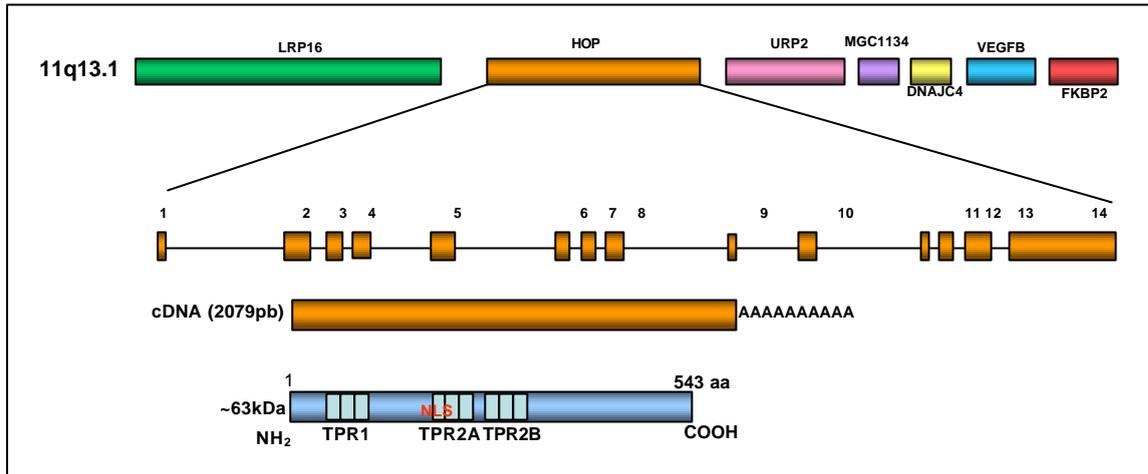
Estruturalmente, homólogos da proteína STI1 são definidos pela presença de motivos de tetratricopeptídeos repetidos (TPR). O então chamado motivo TPR, é uma seqüência de 34 aminoácidos degenerados, presentes em um grande número de proteínas. O domínio TPR é capaz de formar um módulo estrutural que direciona interações entre proteínas, e tem sido adaptado para diferentes funções de interações protéicas (BLATCH e LASSLE 1999). Proteínas que contém motivos TPR participam do controle do ciclo celular, transcrição, auxiliam na conformação protéica, transporte e translocação, transdução de sinal, metabolismo de glicose, liberação de neurotransmissor e “splicing” de RNA (SIKORSKI et al. 1990; GOEBL e YANAGIDA 1991; DAS et al. 1998; BLATCH e LASSLE 1999).

Estudos de modelagem e cristalografia revelam que a STI1 humana contém 9 motivos TPR arranjados em três domínios, os quais tem sido denominados de TPR1, TPR2A e TPR2B, sendo que cada um compreende três motivos TPR (SCHEUFLEER et al. 2000; VAN DER SPUY et al. 2000). A cristalização da extremidade N-terminal de TPR1 e o domínio central de TPR2A complexado à Hsp70 e Hsp90 tem sido resolvida (SCHEUFLEER et al. 2000), entretanto, a estrutura do TPR2B ainda não foi elucidada (Figura 7).

STI1 participa da maturação de receptores do hormônio esteróide e dados recentes indicam que STI1 não apenas liga Hsp70 e Hsp90, mas também modula a atividade dessas chaperoninas (GROSS e HESSEFORT 1996; OWENS-GRILLO et al. 1996; CHANG et al. 1997; WEGELE et al. 2003).

Além disso, STI1 está envolvida em inúmeros complexos independentes de Hsp 90 (Tabela 3).

A distribuição subcelular de STI1 é predominantemente citoplasmática. Entretanto uma pequena fração nuclear tem sido observada, implicando a existência de um processo de importação de STI1 para o núcleo (LASSLE et al. 1997; LONGSHAW et al. 2004).



**Legenda:** O gene de Hop está localizado no cromossomo 11q13.1 e é flanqueado pelos genes LRP16, URP2, MGC1134, DNAJC4, VEGFB e FKBP2. O gene de STI1 contém 14 exons (1-14-barras verticais) separados por introns (barras horizontais). O fragmento de cDNA (2079pb) codifica para uma proteína de 543 aminoácidos (aa), que consiste de 3 motivos TPR (TPR1, TPR2A e TPR2B) e um sinal de localização nuclear (NLS). As extremidades N-terminal (NH<sub>2</sub>) e C-terminal (COOH) estão indicadas.

**Figura 7** - Estrutura gênica de Hop humana.

**Tabela 3** - Complexos multiprotéicos contendo Hop.

Processo celular	Complexo protéico	Localização	Função	Referências
Transcrição	Complexo HSF1 ("heat shock transcription factor)	Núcleo	Oligomerização de HSF1	(Bharadwaj et al. 1999)
	Coativador OCA-S/GAPDH	Núcleo	Maquinaria transcricional Histona H2B	(Zheng et al. 2003)
Conformação proteica	Complexo Gcn2	Citoplasma	Maturação e regulação da proteína quinase Gcn2	(Donze e Picard 1999)
	Complexo Hsp104	Citoplasma	Resolubilização de agregados protéicos	(Glover e Lindquist 1998) (Abbas-Terki et al. 2001)
	Complexo de chaperoninas CDC37	Citoplasma	Conformação de proteína quinases	(Abbas-Terki et al. 2002)
	Complexo Hsc70	Citoplasma	Conformação de proteína quinases	(Scholz et al. 2001)
Conformação proteica e translocação	Complexos com proteína prion	Citoplasma e membrana plasmática	Recrutando e curando prions	(Kryndushkin et al. 2002) e (Martins et al. 1997; Zanata et al. 2002)
Replicação viral	Complexo transcriptase reversa do vírus da hepatite B	Citoplasma e núcleo	Ativação da transcriptase reversa do vírus da hepatite B	(Wang et al. 2002)
Transdução de sinal	Complexo EcR/USP	Citoplasma e núcleo	Ativação de receptores "ecdysone" (EcR) e RXR(USP) de <i>Drosófila</i>	(Arbeitman e Hogness 2000)
Divisão celular	20S complexo ciclossomal	Núcleo	Destruição de ciclina mitótica e separação de cromátides irmãs durante a mitose	(Yamashita et al. 1996)

Interessantemente, modelos de estudo em leveduras abaixo descritos, apontam para a participação de chaperonina e co-chaperonina (Hsp104 e STI1 respectivamente) na cura de prion de levedura. Indiretamente, STI1 pode participar do mecanismo de conversão de PrP<sup>c</sup> para PrP<sup>sc</sup>. Várias evidências

indicam que a conversão de PrP<sup>C</sup> para PrP<sup>Sc</sup> seja mediada por chaperoninas (WELCH e GAMBETTI 1998).

Existem várias proteínas de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) que podem sofrer conversão estrutural semelhante à proteína prion. A mais estudada das proteínas prion de levedura é o fator de terminação de tradução (Sup35), o qual está relacionado ao determinante [PSI<sup>+</sup>] (BRADLEY et al. 2002). Este é a isoforma infecciosa de Sup35 que se propaga por recrutamento da isoforma solúvel de Sup35 formando um agregado de maneira análoga a prions de mamíferos (MASON 2000). O estado de “prion-like” de Sup35 é caracterizado por sua agregação, formação de fibras amilóide e parcial inativação, que culmina na formação do fenótipo supressor [PSI<sup>+</sup>] (PATINO et al. 1996).

As chaperoninas moleculares, Hsp104, Hsp60 e GroEL (chaperonina bacteriana homóloga a Hsp60 eucariótica) têm sido implicadas em participar de transições conformacionais de PrP<sup>C</sup> para sua isoforma resistente a proteases em levedura (EDENHOFER et al. 1996; JIN et al. 2000; STOCKEL e HARTL 2001). Interessantemente, a superexpressão de STI1 de levedura e chaperoninas podem interferir com a propagação e manifestação de prion de levedura [PSI<sup>+</sup>] (KRYNDUSHKIN et al. 2002). Além disso, Hsp104, a mais importante chaperonina de levedura, é estritamente requerida para a propagação de [PSI<sup>+</sup>] e foi identificada como um ligante de STI1 de levedura (ABBAS-TERKI et al. 2001). Assim, estes dados derivados de experimentos em levedura sugerem um importante papel para chaperoninas e co-chaperoninas, neste caso STI1, na propagação de prion.

Diante desses dados, podemos notar que várias evidências sugerem que STI1 não é simplesmente um adaptador para Hsp70 e Hsp90, pois sua interação com diferentes complexos protéicos revela que essa molécula pode participar de distintos fenômenos biológicos. No entanto, ainda é necessário muita pesquisa para que possamos entender a (s) função (ões) molecular (es) e celular (es) de STI1.

## **1.8 PLASTICIDADE NEURONAL E MEMÓRIA**

Como já descrito anteriormente, alterações na proteína PrPc levam ao surgimento de muitas doenças neurodegenerativas. Além disso, seus ligantes de matriz extracelular, Ln e Vn, também exercem grande impacto sobre o tecido nervoso. Desta forma, os neurônios constituem um modelo de estudo muito interessante e apropriado para observar o papel biológico da interação entre PrPc e seus ligantes. Entretanto, como há vários tipos neuronais distintos, a relação entre estas moléculas e os eventos desencadeados por elas podem variar com o tipo neuronal estudado.

Os neurônios são a unidade básica do sistema nervoso e podem ser classificados de diversas maneiras diferentes, mas todas seguem a mesma arquitetura básica, com quatro regiões morfológicamente definidas: o corpo celular, os dendritos, o axônio e os terminais pré-sinápticos. O corpo celular é o centro metabólico da célula, onde se localiza o núcleo e o retículo endoplasmático. Este pode emitir dois tipos de prolongamentos: os dendritos e um axônio. Os dendritos, processos mais curtos que os axônios, ramificam-se

muito e são a principal via para o neurônio receber os estímulos enviados por outras células. Já o axônio, apresenta-se como uma protrusão longa e delgada do corpo celular com pouca ou nenhuma arborização e é responsável por conduzir os sinais elétricos para outras células. Próximo à sua extremidade, o axônio divide-se em ramificações menores que fazem o contato com outro neurônio, esta região é denominada de sinapse. Os sinais são transmitidos à outra célula pelos terminais das ramificações do axônio, que são denominados terminais pré-sinápticos (KANDEL et al. 2000).

O principal método de classificação dos neurônios leva em conta o número e forma dos processos que a célula emite. De acordo com este critério, os neurônios podem ser classificados em unipolar, bipolar e multipolar. Os neurônios unipolares são os mais simples e possuem somente um processo principal que se divide, sendo uma ramificação responsável por emitir e a outra por receber os impulsos elétricos. Este tipo de neurônio está presente em invertebrados e em vertebrados encontra-se no sistema nervoso autônomo.

Os neurônios bipolares possuem dois processos, um dendrito e um axônio, e representam a maioria das células sensoriais. Os neurônios mecanorreceptores transmitem sensações como toque, pressão e dor para a medula espinhal, são de um tipo denominado pseudo-unipolar. O corpo celular fica localizado nos gânglios da raiz dorsal e se desenvolve inicialmente como um neurônio bi-polar, mas durante o desenvolvimento os dois processos fundem-se para formar um só axônio saindo do corpo celular. Este axônio, depois se ramifica em duas partes, a primeira vai para a periferia (pele e juntas) e recebe

informações desses locais, a segunda segue para a medula espinhal transmitindo os impulsos recebidos.

Os neurônios multipolares são a maioria no sistema nervoso de vertebrados, possuem um axônio e muitos dendritos que surgem do corpo celular. Eles variam muito na forma, comprimento do axônio e número de dendritos, que normalmente varia com o número de conexões sinápticas do neurônio. As células piramidais do hipocampo e as células de Purkinje no cerebelo são bons exemplos de células multipolares (KANDEL et al. 2000).

Durante o desenvolvimento, neurônios tornam-se organizados em redes funcionais através do crescimento de axônios e dendritos, coletivamente denominados de neuritos. Eles conectam-se uns com os outros por sinapses que são críticas para a comunicação entre as células.

Os axônios possuem maneiras de se auto-orientarem e encontrarem o alvo apropriado durante o desenvolvimento. Existem três tipos de processos envolvidos na orientação e direcionamento do crescimento axonal:

- os axônios em crescimento interagem diretamente com moléculas na superfície de células e matriz extracelular. Estas interações físicas atraem os axônios para o crescimento em certas direções e repelem do crescimento em outras;
- moléculas atrativas ou repelentes para crescimento axonal também podem ser secretadas, difundidas ou liberadas por tecidos;
- finalmente marcadores de superfície ou moléculas de reconhecimento em células alvo, parecem direcionar os axônios para uma região apropriada do tecido específico para formar as sinapses.

Uma estrutura importante na plasticidade neuronal, é o cone de crescimento, uma região na extremidade de axônios e neuritos altamente dinâmica, que avança, retrai e muda de direção constantemente. Em outras palavras, o cone de crescimento parece tatear o ambiente que o circunda, decidindo onde pode ou não crescer.

Várias evidências indicam que, depois do aprendizado, a formação da memória requer mudanças estruturais no sistema nervoso.

Essas modificações estruturais, criadas por transformações fisiológicas na transmissão sináptica, transitórias ou permanentes, além de, mudanças rápidas em moléculas de citoesqueleto e adesão pós-aprendizado, contribuem para vários processos cognitivos, em particular para a memória de curta duração (“short-term memory”). Já mudanças tardias, que dependem da síntese de proteínas *de novo* e estabilização das transformações sinápticas são requeridas para a persistência, por exemplo, de memória de longa duração (“long-term memory”) (LAMPRECHT e LEDOUX 2004).

Deste modo, o entendimento das funções de PrPc e seus ligantes no processo de plasticidade neuronal é muito importante para que se esclareça o papel biológico desta molécula. Obviamente, só entendendo o funcionamento desta molécula, será possível desenhar abordagens terapêuticas para doenças neurodegenerativas causadas por prions.

Além disso, outras doenças podem estar relacionadas com a perda de função de PrPc e só iremos conhecer suas possíveis causas assim que o papel biológico de PrPc estiver desvendado.

## 2 OBJETIVOS

---

### Os principais objetivos do projeto central são:

- Caracterizar bioquimicamente a interação entre PrPc e STI1;

**Abordagem:** Ensaio de ligação onde a proteína PrPc será imobilizada em poços de poliestireno e incubada com concentrações crescentes de STI1 marcada com  $^{125}\text{I}$ . A constante de dissociação ( $K_d$ ) será calculada pelo método de SCATCHARD (1949).

- Mapear os domínios de ligação em entre PrPc e STI1;

**Abordagem:** A ligação de PrPc-STI1 (como descrito acima) será competida com peptídeos sintéticos da molécula de STI1 e PrPc. Assim que o sítio de interação for determinado em ambas moléculas, proteínas STI1 e PrPc recombinantes mutantes para o domínio de interação serão construídas, expressas e purificadas. Estas serão usadas como controle do mapeamento de domínios de interação entre as moléculas.

- Estabelecer o papel biológico da interação entre PrPc e STI1 em modelos de diferenciação neuronal do sistema nervoso central;

**Abordagem:** Ensaio de neuritogênese com células de cultura primária de hipocampo de embriões de camundongos selvagens e deficientes para PrPc utilizando proteínas, anticorpos e peptídeos de interesse;

- Avaliar o papel neuroprotetor de STI1 em neurônios hipocampais;

**Abordagem:** A morte celular será induzida por estaurosporina em culturas primárias de neurônios hipocampais selvagens e deficientes para PrPc seguido de avaliação do efeito de STI1 na proteção contra morte celular.

- Determinar as vias de sinalização deflagradas por STI1 em modelos de neuritogênese e neuroproteção;

**Abordagem:** Atividade e fosforilação de MAPK será avaliada em culturas hipocampais provenientes de animais selvagens e deficientes para PrPc quando tratadas com STI1. Além disso, inibidores específicos para diferentes vias de sinalização celular (PKA, PKC e MAPK) serão pré-incubados em culturas primárias de neurônios hipocampais selvagens e deficientes para PrPc seguido da avaliação do efeito desencadeado por STI1.

- Determinar o papel fisiológico da interação entre PrPc e STI1 em modelos de crescimento axonal de neurônios do sistema nervoso periférico;

**Abordagem:** Culturas de explantes ganglionares da espinha dorsal de embriões de camundongos selvagens e deficientes para PrPc serão desafiadas com anticorpos específicos, proteínas recombinantes e peptídeos de interesse.

- Avaliar a participação da STI1 na interação PrPc-Laminina;

**Abordagem:** Será utilizada STI1 como competidor no ensaio de ligação PrPc-Laminina.

- Verificar em ensaios de neuritogênese o papel de Ln na interação PrPc-STI1 em modelos de crescimento axonal do Sistema Nervoso Periférico;

**Abordagem:** Culturas ganglionares de camundongos selvagens e deficientes para PrPc serão incubadas com STI1 e laminina.

**Os principais objetivos dos projetos colaborativos são:**

- Caracterizar bioquimicamente a interação entre PrPc e Vn;

**Abordagem:** Ensaio de ligação onde a proteína PrPc será imobilizada em poços de poliestireno e incubada com concentrações crescentes de Vn marcada com  $^{125}\text{I}$ . A constante de dissociação ( $K_d$ ) será calculada pelo método de SCATCHARD (1949).

- Mapear os domínios de ligação em ambas moléculas;

**Abordagem:** A ligação de PrPc-Vn será competida com peptídeos sintéticos da molécula de Vn e PrPc. Assim que o sítio de interação for determinado em ambas moléculas, PrPc recombinantes mutantes para o domínio de interação serão construídas, expressas e purificadas.

- Verificar a significância biológica da interação PrPc e vitronectina em neurônios de gânglios da raiz dorsal;

**Abordagem:** Cultura de explantes ganglionares da espinha dorsal de embriões de camundongos selvagens e deficientes para PrPc serão desafiados com vitronectina, anticorpos específicos, e peptídeos de interesse;

- Determinar a importância de PrPc e na consolidação da memória;

**Abordagem:** Anticorpos e peptídeos específicos serão infundidos no hipocampo de ratos adultos e o teste de esQUIVA inibitória será aplicado para avaliar memórias de curta (STM) e longa (LTM) duração.

- Determinar as vias de sinalização ativadas por PrPc-Ln na consolidação da memória;

**Abordagem:** A atividade das enzimas (PKA e MAPK) serão quantificadas após o teste de esquila inibitória através de ensaios bioquímicos de incorporação radioativa e “immunoblotting” com anticorpos específicos.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

---

Este tópico inclui a metodologia aplicada nos experimentos referentes aos resultados apresentados no item V.5.

#### **3.1 CULTURA PRIMÁRIA DE NEURÔNIOS SENSORIAIS DE GÂNGLIOS DA RAIZ DORSAL**

Gânglios da raiz dorsal (DRG) foram cuidadosamente dissecados de embriões (12 dias pós-coito) de camundongos selvagens e deficientes para o gene de PrPc (PUSCHEL 1999). Os gânglios foram incubados em solução de tripsina: HBSS (“Hanks Balanced Salt Solution”) (1:1) durante 20 minutos à 37°C. A tripsina foi inativada com meio Neurobasal acrescido de 10% SFB (Soro Fetal Bovino) por 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas com HBSS para a remoção do SFB. Em seguida foi adicionado meio Neurobasal acrescido de fator de crescimento de nervos (NGF) (60ng/ml) e então as células foram dissociadas sob ação hidromecânica. Para a contagem e avaliação da viabilidade celular, foi retirada amostra de 10µl dessa suspensão e diluída 5 vezes em solução contendo 90µl de HBSS e 100µl de corante azul de tripan (Sigma). Uma alíquota de 10µl dessa nova solução foi transferida para a câmara de Neubauer para contagem do número de células viáveis.

As células ( $1,5 \times 10^5$  células/ml) foram transferidas para lamínulas de vidro de 13mm de diâmetro previamente tratadas com laminina (10 $\mu$ g/ml) ou polilisina (5 $\mu$ g/ml). As células foram submetidas a diferentes tratamentos e incubadas em estufa úmida, a 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, a cultura foi fixada por 20 minutos com uma solução de fixação (4% paraformaldeído e 0,12M sacarose), lavada com PBS e corada com hematoxilina (0,5% hematoxilina, 10% Alúmen de Potássio, 0,25% óxido de mercúrio e 4,75% de etanol). Tomamos como referência para contagem de um neurito formado, prolongamentos maiores que três corpos celulares.

### 3.2 ENSAIO DE IMUNOHISTOQUÍMICA

Partindo-se de tecidos fixados (embrião E12 selvagens e deficientes para *Prnp*) em formol a 4% e parafinizados, foram feitos cortes histológicos de 3 a 5 $\mu$ m e colocados em lâminas silanizadas. Os cortes foram inicialmente desparafinados em xilol e hidratados com concentrações decrescentes de etanol. As lâminas foram então, incubadas em uma solução de peróxido de hidrogênio a 10%, para eliminação de peroxidase endógena. Seguiu-se com um tratamento para exposição de sítios ativos por aquecimento em microondas (SHI et al. 1991; REYNOLDS et al. 1994) por 15 minutos em tampão citrato 0,01M pH 6,4. e um tratamento adicional, para eliminar grupos aldeídos, que consiste em uma incubação de 30 minutos com glicina 50 mM, em tampão Tris 0,1 M pH 7,4. Adicionalmente incubamos as lâminas com um tampão bloqueador de ligações inespecíficas (tampão fosfato 0,02 M, salina pH7,4 contendo Triton X-100 a

0,2%, leite desnatado a 5%, acrescido de soro normal de cabra a 5%) por 4 horas à temperatura ambiente. Os anticorpos primários diluídos (anti-PrPc 1:1000 e anti STI1 1:1000) neste mesmo tampão bloqueador, foram incubados à temperatura ambiente por 12h (MARTINS et al. 1999). Amostras dos mesmos tecidos foram também incubadas com o soro pré-imune do animal em que foi produzido o anticorpo primário e na mesma diluição usada, para servir de controle negativo da reação. As lâminas foram então lavadas em tampão PBS (10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 140mM NaCl, pH 7,4) acrescido de Triton 0,2% e incubadas com o anticorpo secundário, um conjugado ligado a um polímero de dextran que amplifica o sinal de ligação antígeno-anticorpo e é livre de biotina (Universal Dako EnVision Systems, peroxidase, Dako Corporation). Todas as reações foram reveladas com diaminobenzidina tetrahidrocloreto e contra coradas com hematoxilina de Harris (SHI et al. 1991).

### 3.3 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

As células ( $1,5 \times 10^5$  células/ml) provenientes de cultura primária de neurônios periféricos de camundongo tipo selvagem e deficiente para *Prnp* (conforme descrito itens 3.1) foram cultivadas sobre lamínulas (13mm) de vidro tratadas com laminina (10µg/ml) durante 24h, após este período, as mesmas foram lavadas duas vezes em PBS (10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 140mM NaCl, pH 7,4) e fixadas em solução de fixação (4% paraformaldeído e 0,12M sacarose) por 20 minutos. Em seguida as células foram lavadas com PBS 0,1% Triton X-100. Para bloqueio de interações inespecíficas do anticorpo

incubamos as células por 1h com PBS 0,1% Triton X-100 acrescido de 1% de soro de cabra. Os anticorpos anti-STI1 IgG (10 $\mu$ g/ml) purificada produzido em coelho e IgG irrelevante (10 $\mu$ g/ml) foram diluídos em PBS 0,1% Triton X-100 acrescido de 1% de soro de cabra e incubados 16h a 4°C em câmara úmida. As lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 0,1% Triton X-100 e incubadas por 1h com anticorpo anti-IgG de coelho acoplado a FITC (isotiocionato de fluoresceína) diluído (1:1000) em PBS 0,1% Triton X-100 acrescido de 1% de soro de cabra. Os anticorpos foram lavados e as lâminas foram montadas utilizando o líquido para montagem Hydromount.

### **3.4 ENSAIOS DE ATIVIDADE p44/42 MAPK**

A análise da atividade de MAPK foi realizada utilizando-se reagentes provenientes do “kit” p44/42MAP kinase (Cell Signaling).

Cultura de neurônios periféricos (5x10<sup>5</sup> células) foi tratada com STI1 (10x10<sup>-7</sup>M) por diferentes períodos, lavada com PBS e lisada com tampão de lise proveniente do “kit” p44/42MAPK fosforilada. A seguir o lisado foi imunoprecipitado com o anticorpo anti-fosfo-p44/42. A proteína imunoprecipitada foi incubada com o substrato Elk na presença de ATP e tampão quinase, permitindo assim que a proteína ativa (MAPK fosforilada) fosforilasse o seu substrato específico (Elk), os produtos desta reação foram separados em gel de poliacrilamida-SDS e transferidos para membrana de nitrocelulose. A fosforilação de Elk foi analisada por “immunoblotting” utilizando o anticorpo específico anti-fosfo-Elk-1 (Ser383) (1:1000).

### 3.5 ENSAIO DE COMPETIÇÃO DA INTERAÇÃO PrPc-STI1 COM LAMININA E O DECAPEPTÍDEO (RNIAEIIKDI) DA CADEIA $\gamma$ 1 DE LAMININA

Quatro microgramas de His<sub>6</sub>-PrPc foram adsorvidas em micropoços de polistireno por 16 horas à temperatura ambiente. Os poços foram lavados com TBS e, para bloquear ligações inespecíficas adicionou-se uma solução 1% de albumina sérica bovina (BSA), por 2 horas à temperatura ambiente. Os poços foram lavados com TBS e pré-incubados com o peptídeo  $\gamma$ -1 (RNIAEIIKDI), o peptídeo “scrambled” do  $\gamma$ -1 ou a proteína laminina por 3 horas à temperatura ambiente. Em seguida, concentrações crescentes de <sup>125</sup>IHis<sub>6</sub>-STI1 com uma atividade específica de  $0,2 \times 10^7$  cpm/ $\mu$ g, foi adicionada e incubada 16 horas a 4°C. Após lavagens extensivas, a radiação dos poços foi medida utilizando-se contador gama (Minigamma counter LKB Wallac). Através do dado de atividade específica da proteína marcada foi possível estabelecer a concentração de proteína que se ligou a PrPc.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

A seguir serão apresentados os resultados que compõem os artigos já publicados e os manuscritos para publicação.

As duas primeiras composições de resultados (itens 4.1 e 4.2-Anexos I e II respectivamente), uma em artigo outra em manuscrito, referem-se aos principais dados obtidos durante os projetos de Mestrado e Doutorado. Esses trabalhos mostram a interação de PrPc com STI1 e a participação da mesma em neuritogênese e neuroproteção de neurônios do sistema nervoso central.

Resultados provenientes de estudos colaborativos serão apresentados a seguir, onde será destaque a interação de PrPc com as proteínas de matriz extracelular, vitronectina participando de crescimento axonal de neurônios periféricos (item 4.3-Anexo III) e laminina modulando aprendizado e memória em ratos (item 4.4-Anexo IV).

Finalmente, serão descritos dados ainda não publicados que merecem especial atenção, pois representam os efeitos biológicos promovidos pelo complexo protéico formado por laminina, vitronectina e STI1 em neurônios periféricos (item 4.5).

#### **4.1 ARTIGO INTITULADO: STRESS INDUCIBLE PROTEIN 1 IS A CELL SURFACE LIGAND FOR CELLULAR PRION PROTEIN THAT TRIGGERS NEUROPROTECTION (ANEXO I)**

Este artigo é referente aos resultados obtidos durante o projeto de mestrado. Parte deste trabalho foi desenvolvido pelo grupo do Dr. Rafael Linden, com o qual nosso grupo mantém uma importante colaboração.

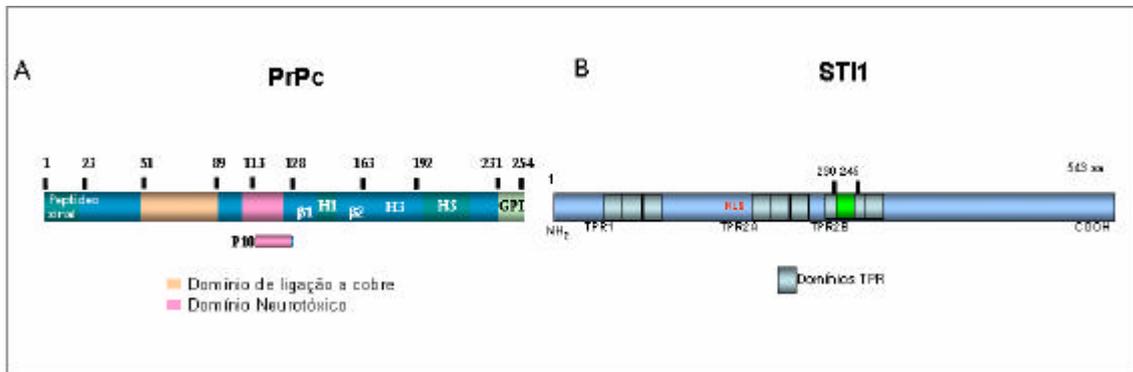
Uma vez que havíamos identificado STI1 como um possível ligante de PrPc, prosseguimos com diferentes abordagens a fim de caracterizar essa ligação.

Assim, através de ensaios bioquímicos foi possível evidenciar *in vitro*, uma ligação específica e saturável entre PrPc e STI1 independente de cobre, apresentando um  $K_d$  de  $10^{-7}M$ .

Visto que a ligação entre PrPc e STI1 era altamente específica, seguimos com o mapeamento da região de interação entre as duas moléculas, através de ensaios de competição, onde utilizamos peptídeos sintéticos tanto de PrPc como de STI1. Assim, foi estabelecido que, a região onde STI1 liga PrPc situa-se entre os aminoácidos 113-128 (GAAAAGAVVGGLGGYM) e o sítio de interação de PrPc a STI1 está localizado entre os aminoácidos 230-245 (ELGNDAYKKKDFDKAL) (Figura 8).

Além disso, nosso grupo através de ensaios de imunoprecipitação mostrou que a interação entre PrPc e STI1 deve ocorrer na membrana celular. Mostramos ainda, que a interação de PrPc tanto com STI1, quanto com o peptídeo que mimetiza o domínio específico de ligação a PrPc (STI1<sub>230-245</sub>)

(CHIARINI et al. 2002; ZANATA et al. 2002), transduz sinais neuroprotetores, evitando assim, que as células retinianas entrem em apoptose.



Legenda: A, STI1 é capaz de interagir na região 113-128 (Peptídeo10-rosa) do domínio neurotóxico da molécula de PrPc. B, PrPc liga-se a STI1 no domínio 230-245 (verde) situado no motivo tetratricopeptídico B (TPR). NLS, sítio de localização nuclear.

**Figura 8** - Desenho esquemático das proteínas PrPc e STI1, destacando os domínios de ligação mapeados.

#### **4.2 MANUSCRITO INTITULADO: INTERACTION OF CELLULAR PRION PROTEIN AND STRESS INDUCIBLE PROTEIN 1 PROMOTES NEURITE OUTGROWTH AND NEUROPROTECTION THROUGH DISTINCT SIGNALING PATHWAYS (ANEXO II)**

O manuscrito apresentado a seguir representa os resultados obtidos no transcorrer do projeto de doutorado.

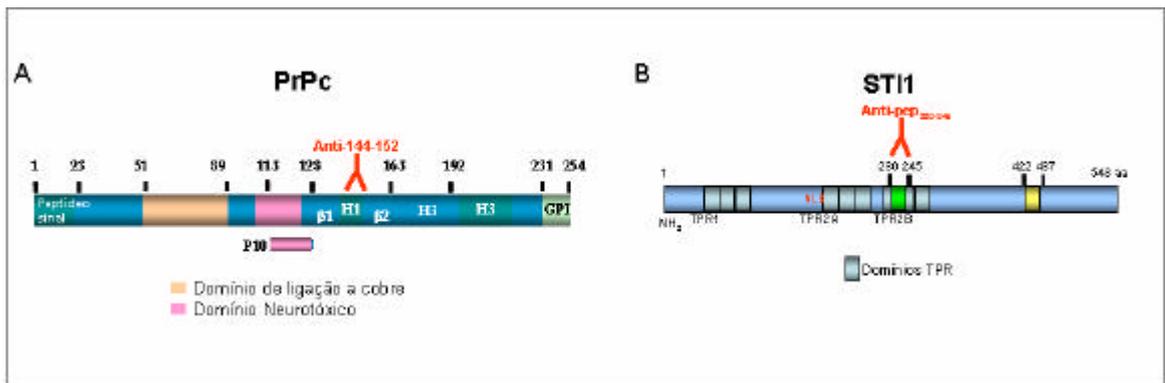
Diante dos resultados que demonstram uma interação específica de STI1 a PrPc, decidimos investigar o papel biológico dessa ligação em modelos de neuritogênese e neuroproteção em neurônios hipocampais.

Primeiramente, este estudo avaliou a distribuição *in situ* de STI1 e PrPc e constatou uma alta concentração de ambas as moléculas, além de um alto nível de co-localização.

STI1 promoveu neuritogênese de uma maneira dependente de PrPc, pois células deficientes para a última não apresentou efeito. Além disso, anticorpo contra PrPc foi capaz de bloquear o efeito neuritogênico mediado por STI1 (Figura 9).

A neuritogênese mediada por STI1 além de depender de PrPc, requer a ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK).

Além disso, como previamente descrito em neurônios retinianos (CHIARINI et al. 2002), STI1 foi capaz de proteger neurônios hipocampais da morte induzida por estaurosporina através da ativação da via de proteína quinase A dependente de AMPc (PKA) somente em células selvagens para PrPc. Juntos esses dados mostram que a interação entre PrPc e STI1 ativam vias diferentes de sinalização que estão envolvidas em fenômenos biológicos distintos como a neuritogênese e a neuroproteção.



**Legenda:** A, O domínio de ligação de STI1 a PrPc (113-128) é representado pelo peptídeo 10 (rosa). Em destaque o sítio de interação do anticorpo que reconhece os resíduos 144-152 de PrPc (6H4, Prionics<sup>TM</sup>). B, Em verde, a região de interação a PrPc (pepSTI1<sub>230-245</sub>). A região em amarelo destaca o peptídeo da região carboxi-terminal de STI1 (pepSTI1<sub>422-437</sub>) utilizado como controle no trabalho que se segue. O anticorpo anti-pepSTI1<sub>230-245</sub> reconhece o domínio 230-245.

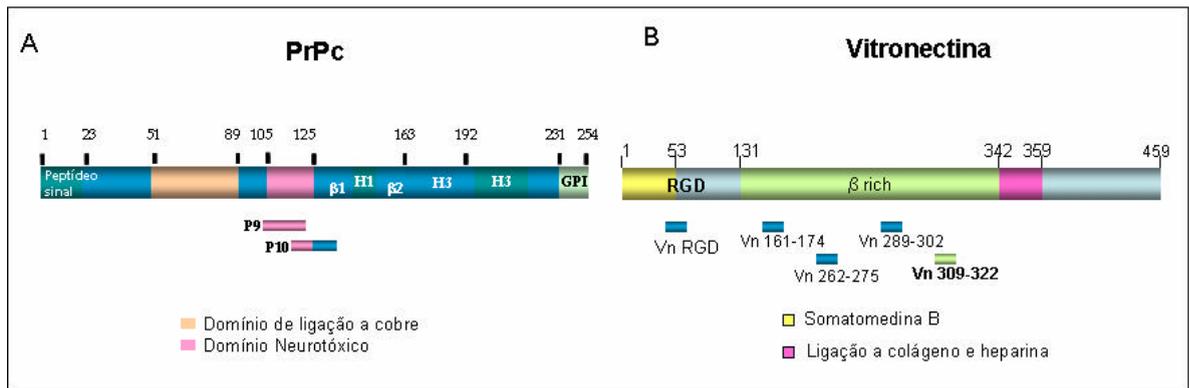
**Figura 9** - Desenho esquemático dos principais domínios de PrPc e STI1.

### 4.3 MANUSCRITO INTITULADO: **CELLULAR PRION IS A VITRONECTIN RECEPTOR SUPPORTING AXONAL GROWTH: REDUNDANCY MEDIATED BY INTEGRINS (ANEXO III)**

O próximo manuscrito é referente ao trabalho de doutorado conduzido por Glauca N. M. Hajj, o qual teve uma importante participação.

Esse estudo caracteriza, através de experimentos *in vitro*, uma ligação específica e de alta afinidade entre vitronectina e PrPc, apresentando um *Kd* de  $10^{-8}$ M e determina os sítios de ligação de vitronectina em PrPc (105-119) e PrPc em vitronectina (307-320) (Figura 10). Neste estudo, a interação de vitronectina com PrPc levou ao crescimento axonal de células do sistema nervoso periférico, cuja ausência de PrPc foi compensada por integrinas em células provenientes de animais deficientes para PrPc.

Nesse trabalho pude cooperar com a produção de proteína prion recombinante tipo selvagem e construção, expressão e purificação de mutantes de PrPc no domínio de ligação à vitronectina. Além de participar de experimentos biológicos em culturas primárias de neurônios dissociados da raiz dorsal.



**Legenda:** A, O domínio de ligação de Vn a PrPc (105-119) é representado pelos peptídeos P9 e P10. B, O peptídeo Vn 309-322 representa a sequência de interação a PrPc. A região que interage com integrinas (RGD) é destacada pelo peptídeo VnRGD. Outros peptídeos utilizado neste trabalho também estão representados (Vn161-174, Vn289-302 e Vn262-275).

**Figura 10** - Desenho esquemático dos principais domínios de PrPc e Vn.

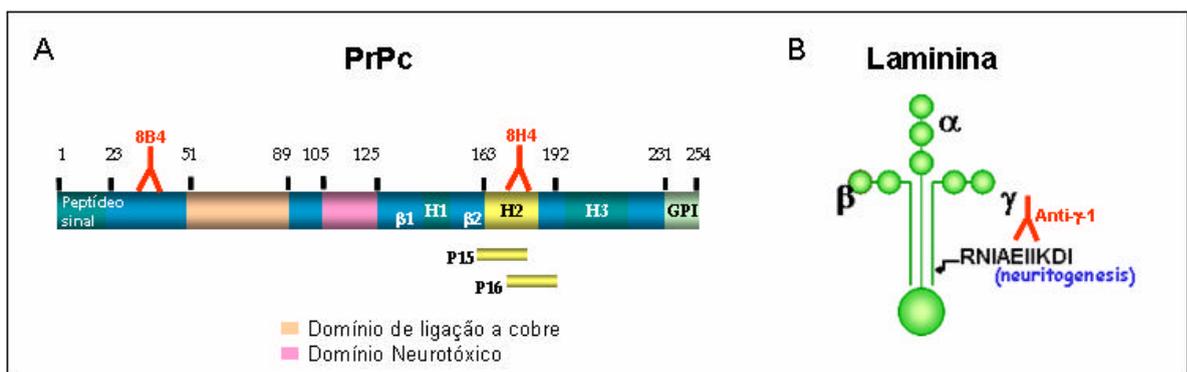
#### 4.4 MANUSCRITO INTITULADO: *CELLULAR PRION INTERACTION WITH LAMININ MEDIATES MEMORY CONSOLIDATION BY PKA AND MAPK (ANEXO IV)*

O manuscrito a seguir, resultado da colaboração entre o nosso grupo e o grupo de pesquisa do Prof. Ivan Izquierdo (UFRGS), relata a importância de laminina e PrPc no fenômeno de consolidação da memória.

Através de ensaios *in vitro* mapeamos o domínio de interação de laminina em PrPc entre os domínios 173-183. O sítio de ligação de PrPc em laminina já fora mapeado no decapeptídeo da cadeia gama 1 de laminina (GRANER et al. 2000a) (Figura 11).

O teste de esquila inibitória após infusão intra-hipocampal de anticorpos contra laminina e PrPc em ratos mostra que o bloqueio destas proteínas prejudica a consolidação da memória de longa e curta duração nesses animais. Esses reagentes também bloqueiam PKA e MAPK que são vias clássicas de sinalização ativadas durante a consolidação da memória. Portanto, esses resultados mostram que a interação de PrPc com laminina aponta para uma importante função fisiológica em cognição.

Neste manuscrito contribuí com experimentos bioquímicos que visavam caracterizar o sítio de interação de laminina em PrPc além de experimentos de competição com anticorpos.



**Legenda:** A, O domínio de ligação de Ln a PrPc (173-183) é representado pelos peptídeos P15 e P16 (amarelo). B, O peptídeo RNIAEIIKDI da região carboxi-terminal de Ln representa a seqüência de interação a PrPc. As sequências reconhecidas pelos anticorpos utilizados no trabalho em questão estão em destaque. Anticorpo 8B4 reconhece os resíduos (34-45) e o 8H4 os resíduos (175-185).

**Figura 11** - Desenho esquemático dos principais domínios de PrPc e Ln.

#### **4.5 PAPEL DO COMPLEXO MULTI-PROTÉICO FORMADO POR PrPc, STI1, LAMININA E VITRONECTINA NO CRESCIMENTO AXONAL DE NEURÔNIOS PERIFÉRICOS**

Os resultados apresentados a seguir foram realizados em colaboração com a aluna de doutorado do grupo, Glaucia Hajj.

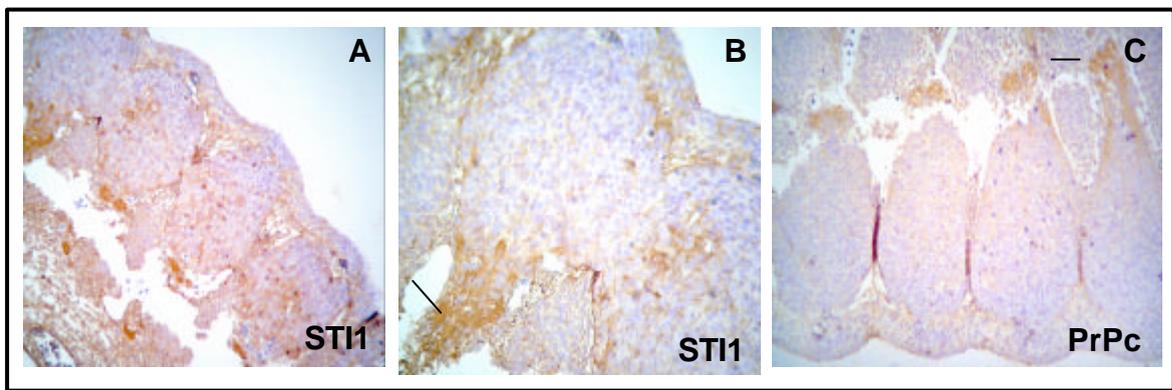
Além do modelo de neuritogênese em sistema nervoso central (SNC), pudemos explorar o envolvimento da interação entre PrPc-STI1, PrPc-Ln e do complexo Ln-PrPc-STI1 no crescimento axonal de neurônios de gânglios da raiz dorsal. Portanto, como essas células fazem parte do sistema nervoso periférico (SNP), poderiam eventualmente se comportar de maneira diferente do SNC.

Dados descritos na literatura citam que certas moléculas possuem funções opostas quando relacionadas a diferentes sistemas, por exemplo, as semaforinas, uma família de moléculas envolvidas na navegação axonal, podem atuar tanto repulsivamente (para axônios simpáticos) quanto como fator atrativo (para axônios corticais) (ADAMS et al. 1997; BAGNARD et al. 1998).

Visto o envolvimento de STI1 e PrPc na diferenciação de neurônios do SNC (LOPES et al. Anexo II), nossa primeira abordagem nesta etapa do trabalho foi avaliar se esta interação participa da diferenciação de neurônios do SNP. Para esse fim, primeiramente realizamos experimentos de imunohistoquímica em cortes histológicos de embriões de camundongos de 12 dias, empregando anticorpos contra STI1 e PrPc. A expressão de PrPc (HAJJ et al. Anexo III) e STI1 além de ser vista nos gânglios periféricos, pode ser

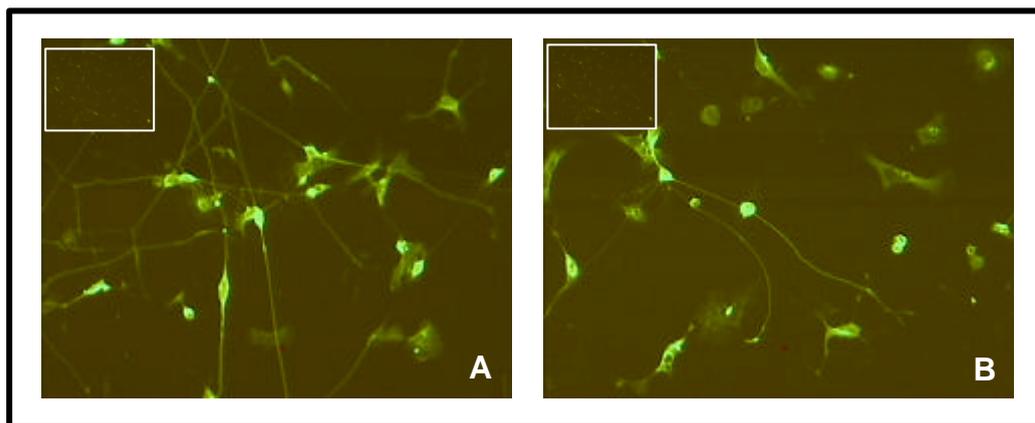
observada em nervos que partem dos gânglios (Figura 12-como indicam as setas).

A expressão de STI1 também foi analisada em culturas de neurônios sensoriais dissociados de camundongos selvagens e deficientes para *Prnp* através de ensaios de imunofluorescência. STI1 mostrou-se abundantemente expressa nos corpos celulares e axônios de neurônios sensoriais de camundongos *Prnp*<sup>+/+</sup> (Figura 13 A) e *Prnp*<sup>0/0</sup> (Figura B).



**Legenda:** Cortes histológicas de embrião de 12 dias *Prnp*<sup>+/+</sup> foram reagidos com anticorpo anti-STI1 (A e B- aumentos de 200X e 400X respectivamente) e anti-PrPc (C). Setas indicam a expressão das proteínas nos nervos que partem do gânglio periférico.

**Figura 12** - STI1 e PrPc são proteínas expressas em gânglios e nervos periféricos.



**Legenda:** Cultura de células dissociadas de gânglios da raiz dorsal de embrião de camundongo tipo selvagem ( $Prnp^{+/+}$ ) (A) e deficiente para  $Prnp$  ( $Prnp^{0/0}$ ) (B) foi plaqueada sobre laminina e incubada com anticorpo anti-STI1 (IgG) (A e B) e IgG irrelevante (insetos fotos A e B).

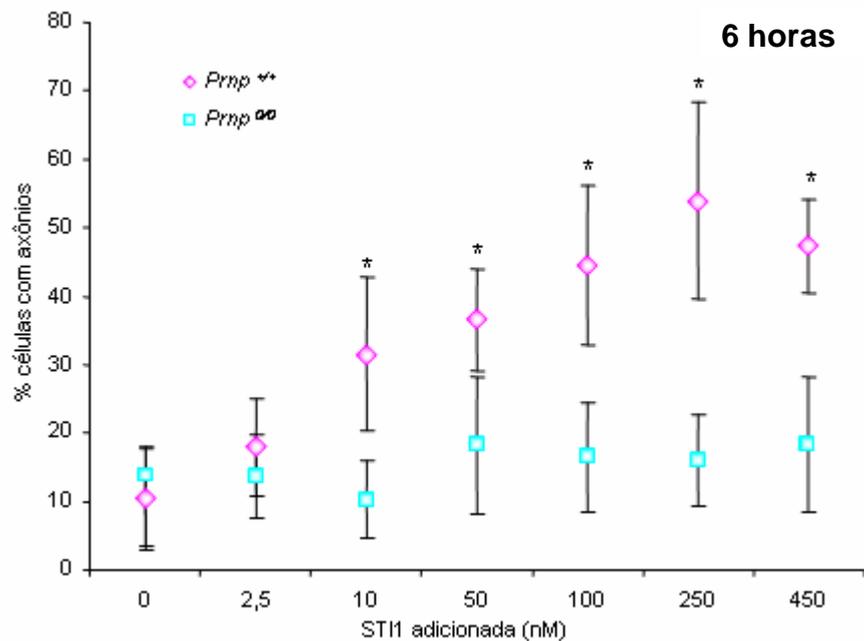
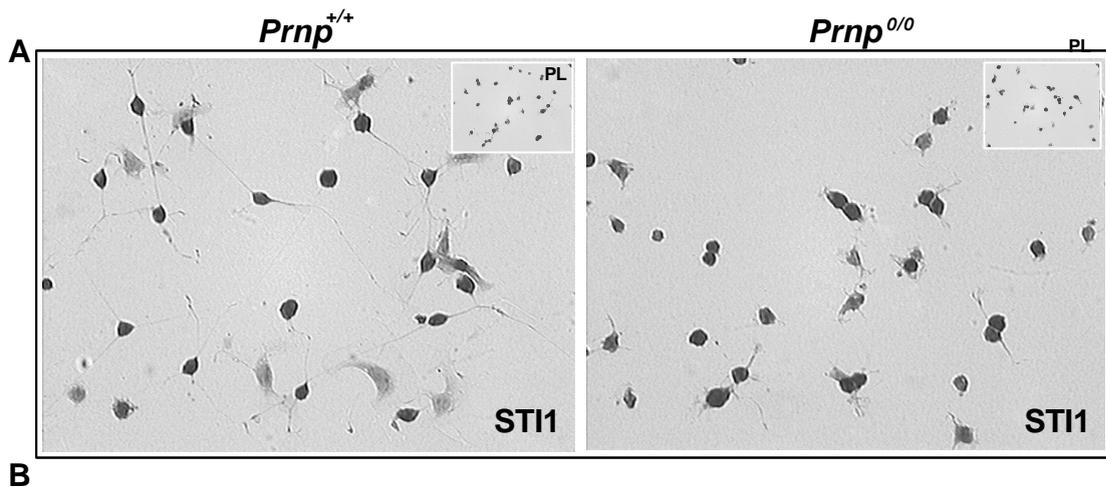
**Figura 13** - Presença de STI1 no corpo celular e axônios de neurônios sensoriais.

Observada a alta expressão de STI1 e PrPc em nervos e gânglios periféricos, seguimos com experimentos de neuritogênese para analisar uma possível participação dessas moléculas nesse evento.

Células dissociadas de gânglios da raiz dorsal (DRG) provenientes de camundongos  $Prnp^{+/+}$  apresentam crescimento axonal estimulado por STI1, como mostrado no campo representativo da cultura (Figura 14A).

A Figura 14B, apresenta uma curva dose-resposta em que uma concentração de 250nM de STI1 é capaz de estimular a neuritogênese em cerca de 50% das células que expressam PrPc. Este mesmo efeito não é observado em células de animais deficientes para  $Prnp$  onde o crescimento não passa de 20%.

A concentração de STI1 requerida nesse experimento é equiparável àquela usada em neurônios hipocâmpais (Lopes et al. Anexo II).



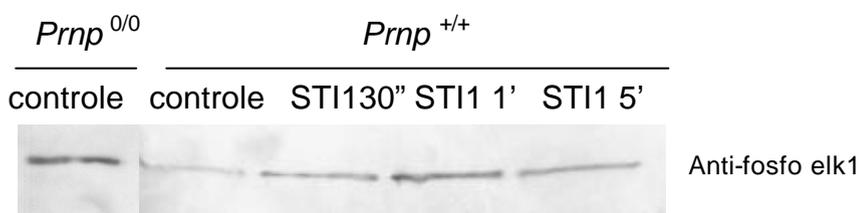
**Legenda:** A) Figura representativa da cultura primária de neurônios sensoriais de camundongos *Prnp*<sup>+/+</sup> e *Prnp*<sup>0/0</sup> foram tratadas ou não (inserto-PL) com ST11. B) Cultura primária de neurônios sensoriais de camundongos *Prnp*<sup>+/+</sup> e *Prnp*<sup>0/0</sup> foram tratadas com concentrações crescentes de ST11(solúvel) por 6h. O gráfico mostra as médias de pelo menos 3 experimentos independentes e as barras verticais representam o desvio padrão \*, p<0,05 teste não paramétrico, Mann Whitney.

**Figura 14** - O complexo ST11-PrPc medeia o crescimento axonal de neurônios sensoriais da raiz dorsal *Prnp*<sup>+/+</sup>.

Como em neurônios hipocâmpais STI1 elicit a via de MAPK na neuritogênese (LOPES et al. Anexo II), é importante averiguar se a mesma via é ativada por STI1 no crescimento neurítico de outro tipo neuronal.

Na Figura 15, podemos observar um ensaio preliminar de atividade de MAPK, realizado em células de gânglios da raiz dorsal tratadas com STI1 em diferentes tempos. O primeiro fato que nos chama a atenção é que o nível basal de atividade de MAPK nos animais deficientes para PrPc é maior do que o observado nos animais selvagens. Isto já foi observado no modelo de estudo de neurônios de retina (CHIARINI et al. 2002), neurônios hipocâmpais (Lopes et al. item 4.2-Anexo) e no cérebro e cerebelo de animais adultos (BROWN 2002), confirmando este dado em três tipos neuronais distintos.

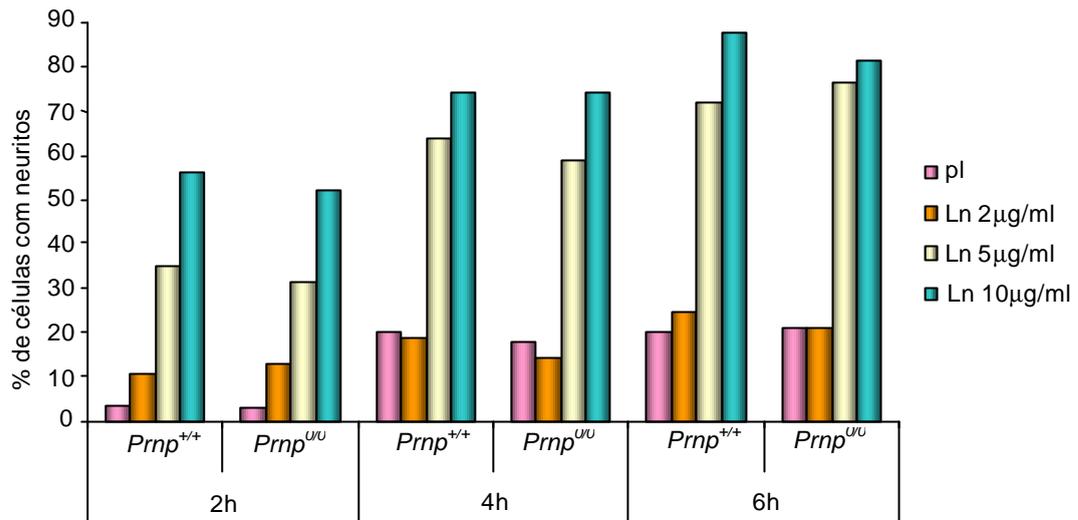
Também podemos ressaltar que a atividade de MAPK aumenta 30 segundos após adição de STI1 e apresenta pico de atividade em 1 minuto.



**Legenda:** Culturas primárias de neurônios de gânglios da raiz dorsal foram plaqueadas sobre poli-lisina durante 16 horas (controle) e tratadas com STI1 por 30 segundos (STI1 30"), 1 minuto (STI1 1') ou 5 minutos (STI1 5'). As células foram lisadas, MAPK foi imunoprecipitada e utilizada em ensaio de fosforilação de ELK-1 recombinante. As proteínas precipitadas foram separadas por SDS-PAGE e avaliadas por "immunoblotting" contra ELK-1 fosforilada. A figura apresenta o autoradiograma obtido.

**Figura 15** - Atividade de MAPK em células de gânglios da raiz dorsal de embriões selvagens (*Prnp*<sup>+/+</sup>) e deficientes para *Prnp* (*Prnp*<sup>0/0</sup>).

A seguir fomos verificar o efeito de outro ligante de PrPc, identificado pelo grupo, laminina (Ln), no comportamento dos neurônios de gânglios da raiz dorsal. Laminina é um conhecido promotor da neuritogênese de vários tipos neuronais (LUCKENBILL-EDDS 1997) e, de fato a uma concentração de 10µg/ml há uma extensa neuritogênese celular, com cerca de 80% das células apresentando neuritos em 6 horas. Os dois tipos celulares (com ou sem PrPc) apresentam o mesmo comportamento frente a esta molécula, com crescimento de neuritos em proporção semelhante na concentração mais elevada de Ln (Figura 16). Em contraste, neurônios hipocâmpais de animais deficientes para PrPc respondem de maneira menos intensa a laminina, apresentando neuritogênese menor do que neurônios de animais selvagens (GRANER et al. 2000a). Desta forma, semelhantemente ao que acontece em DRG tratados com Vn, a neuritogênese mediada por Ln é igual em células que expressam ou não PrPc. Portanto, a existência de mecanismos compensatórios em animais *Prnp*<sup>0/0</sup> é mais evidente em DRG do que em neurônios do SNC.



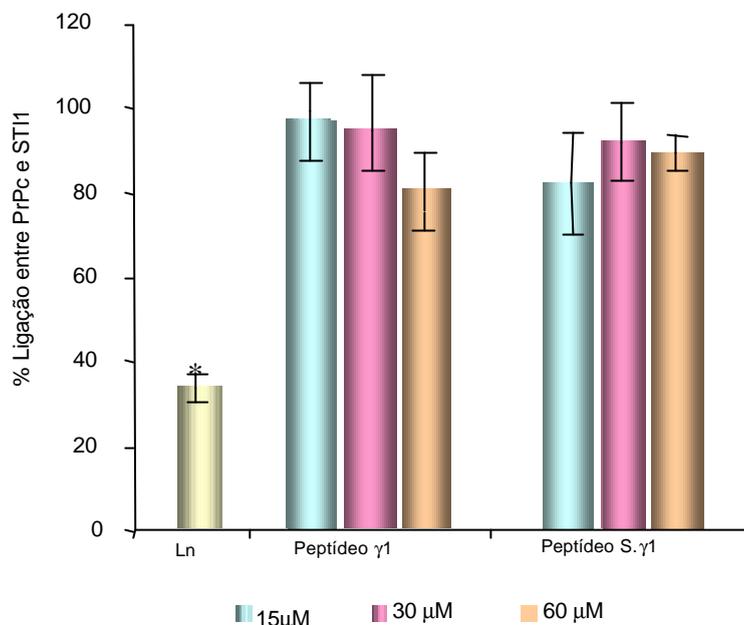
**Legenda:** Células dissociadas de explantes de gânglios da raiz dorsal de embriões de camundongos selvagens (*Prnp*<sup>+/+</sup>) e deficientes para o gene de PrPc (*Prnp*<sup>0/0</sup>) com 12 dias foram cultivadas em presença de concentrações crescentes de Ln (adsorvida) durante 2, 4 ou 6 horas.

**Figura 16** - Laminina estimula neuritogênese em cultura primária de gânglios da raiz dorsal.

Uma vez que STI1 e Ln interagem com PrPc através de domínios diferentes (ZANATA et al. 2002 – Anexo I), e com o objetivo de mostrar se PrPc é capaz de interagir com STI1 e Ln e assim favorecer a formação de um complexo protéico, seguimos com um experimento *in vitro* de competição da interação entre STI1 e PrPc utilizando Ln e o peptídeo  $\gamma$ 1, que representa o sítio de ligação de PrPc à Ln (peptídeo  $\gamma$ 1-GRANER et al. 2000a).

A Figura 17 mostra que a interação STI1-PrPc é inibida por Ln, mas não pelo peptídeo  $\gamma$ 1 da Ln. Estes resultados ainda revelam que a competição da interação PrPc-STI1 por Ln pode ter sido causada por impedimento estérico, uma vez que Ln possui grande massa molecular (~900kDa). Por outro lado confirma que o sítio de interação da Ln (resíduos 173-183 COITINHO et al.

(2003) item IV. 4 resultados) em PrPc é diferente daquele de STI1 (resíduos 113-128-ZANATA et al. 2002- Anexo I) o que pode favorecer a formação do complexo PrPc-STI1 e Ln *in vivo*.

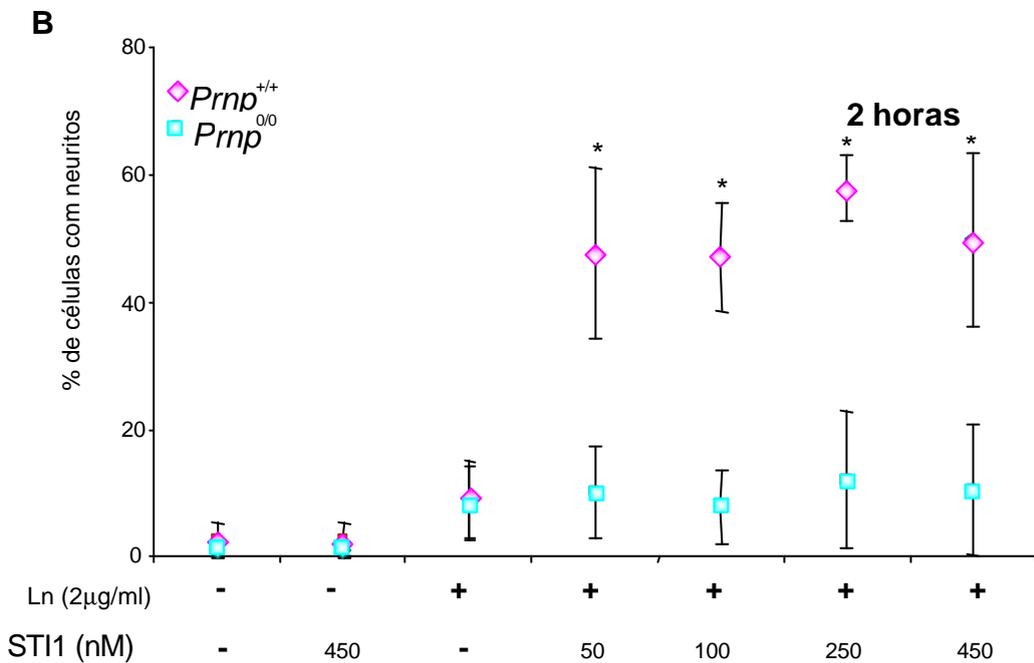
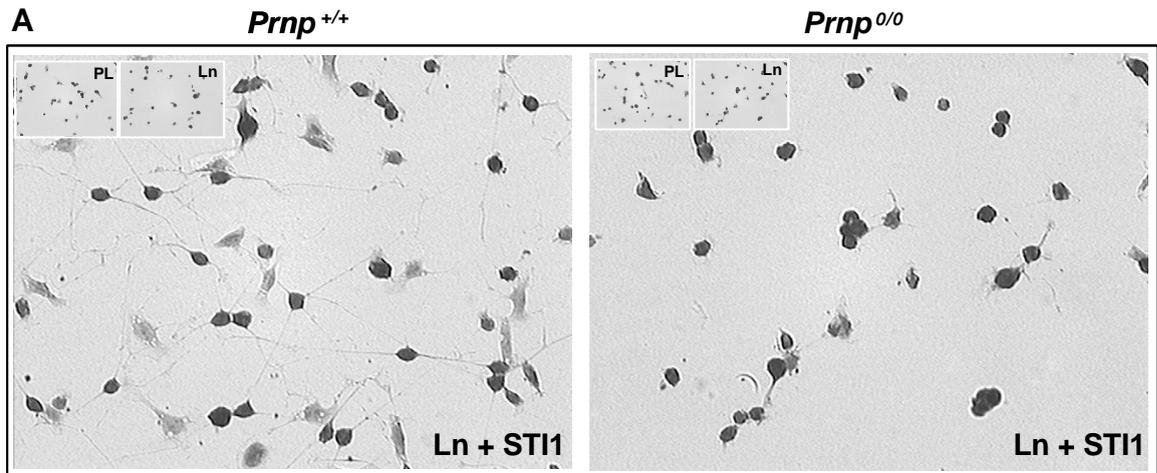


**Legenda:** PrPc foi adsorvido em poços de poliestireno. Para bloquear interações inespecíficas, uma solução de BSA foi adicionada em cada poço. Para a competição, o PrPc adsorvido foi pré-incubado por 3h com concentrações crescentes (15, 30 e 60 μM) do peptídeo da cadeia γ1 de Ln e do peptídeo "scrambled" da cadeia γ1 (Peptídeo S. γ1), com STI1 (0,1 μM) e Ln (3nM) não marcados. Foram adicionados, 0,01 μM de STI1 marcada (<sup>125</sup>I) e incubamos 16 horas a 4°C. Os poços foram lavados e contou-se a radiação. O gráfico mostra as médias de pelo menos 3 experimentos independentes e as barras verticais representam o desvio padrão \*, p<0,05 teste não paramétrico, Mann Whitney.

**Figura 17** - Ensaio de competição da interação PrPc-STI1 com Ln e o peptídeo da cadeia γ1 de Ln.

Visto que a ligação de Ln a PrPc pode não excluir a de STI1, seguimos com experimentos de neuritogênese *ex vivo* para verificar o efeito combinatório de Ln e STI1. Ln foi utilizada em concentrações sub-ótimas (2 μg/ml) e STI1 foi adicionada em concentrações crescentes. Um efeito aditivo muito forte entre as

duas proteínas foi observado. Duas horas após o tratamento houve crescimento axonal em cerca de 60% das células (Figura 18) enquanto para todas as outras condições de crescimento em cultura de células ganglionares realizadas, são necessárias 6 horas para que seja observado o efeito de neuritogênese. Além disso, este efeito é específico para as células que possuem PrPc, já que aquelas provenientes de animais deficientes para PrPc não apresentam crescimento (Figura18).

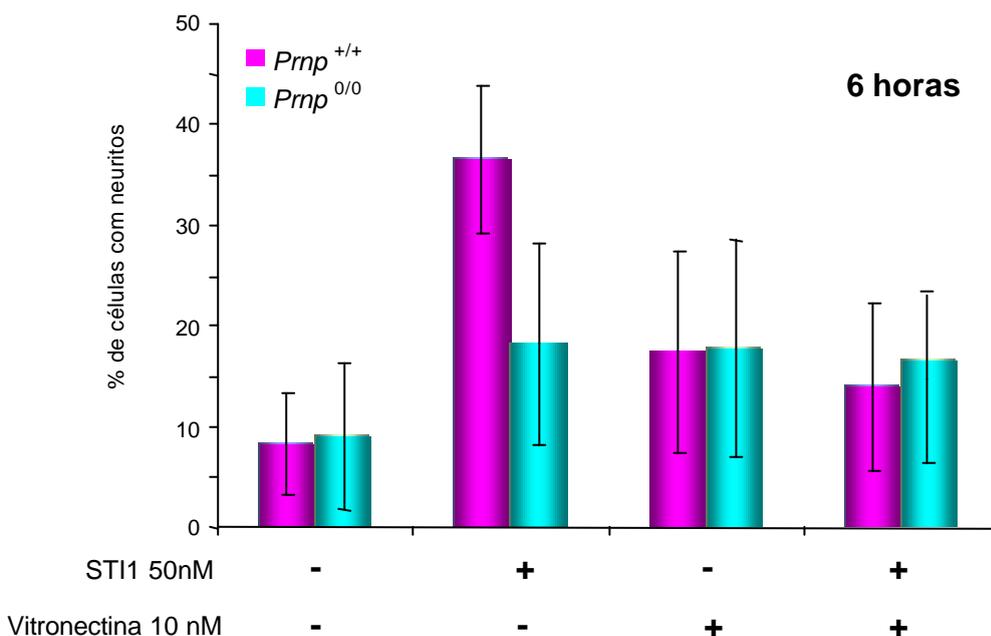


**Legenda:** Células dissociadas de explantes de gânglios da raiz dorsal de embriões de camundongos selvagens (*Prnp*<sup>+/+</sup>) e deficientes para PrPc (*Prnp*<sup>0/0</sup>) com 12 dias foram cultivadas em presença Ln (aderida), STI1 (solúvel) ou combinação das duas proteínas durante 2 horas. Barras verticais representam desvio padrão. \*, p<0,05 teste não paramétrico, Mann Whitney.

**Figura 18** - STI1 promove efeito sinérgico na neuritogênese mediada por laminina em células ganglionares de camundongo *Prnp*<sup>+/+</sup>.

Uma vez que, explantes ganglionares de camundongos selvagens e deficientes para *Prnp* respondem à Vn de maneira semelhante (Hajj et al. Anexo III). Partimos então para a análise combinada de Vn e STI1 sobre as culturas de neurônios sensoriais dissociados.

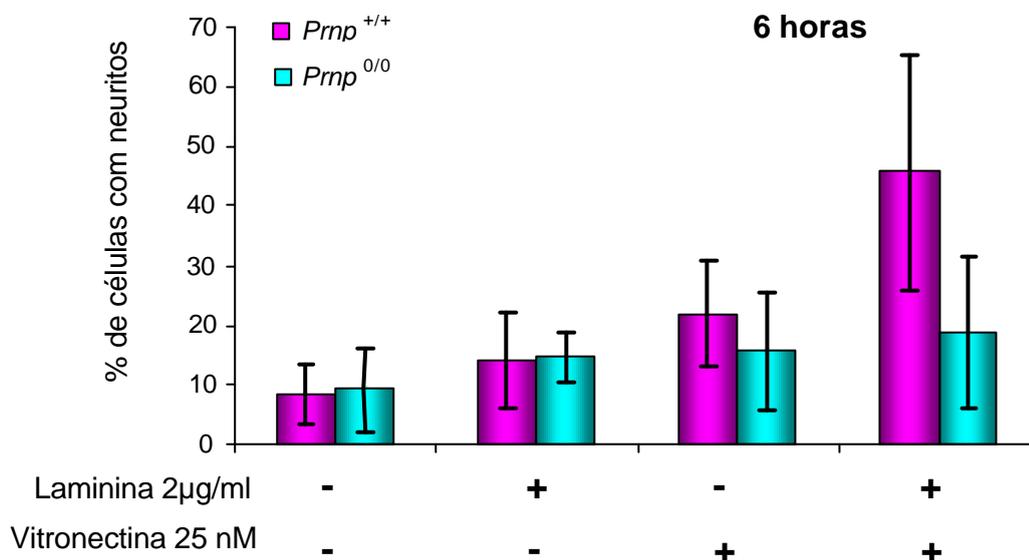
Combinações de concentrações de STI1 e Vn tiveram um efeito muito curioso sobre as culturas. Em primeiro lugar, as duas proteínas não possuem efeito aditivo, mesmo em concentrações sub-ótimas. Além disso, uma concentração sub-ótima de Vn, quando colocada juntamente a uma concentração de STI1 capaz de promover crescimento neurítico, é capaz de inibir o efeito da última (Figura 19).



**Legenda:** Células dissociadas de explantes de gânglios da raiz dorsal de embriões de camundongos selvagens (*Prnp*<sup>+/+</sup>) e deficientes para PrPc (*Prnp*<sup>0/0</sup>) com 12 dias foram cultivadas em presença Vn, STI1 ou combinação das duas proteínas em solução durante 6 horas. Barras verticais representam desvio padrão de pelo menos 3 experimentos.

**Figura 19** - Crescimento neurítico estimulado por Vn e STI1 em neurônios sensoriais.

Observamos também o efeito combinado de Ln e Vn nestas células. Como visto anteriormente (Figura 16), Ln a uma concentração de 2µg/ml praticamente não produz efeito sobre a neuritogênese. No entanto, quando adicionamos a esta concentração de Ln, uma concentração também sub-ótima de Vn (25nM) há um crescimento neurítico que se aproxima de 50% nas células de animais selvagens, mas não naquelas dos animais deficientes para PrPc (Figura 20).



**Legenda:** Células dissociadas de explantes de gânglios da raiz dorsal de embriões de camundongos selvagens (*Prnp*<sup>+/+</sup>) e deficientes para PrPc (*Prnp*<sup>0/0</sup>) com 12 dias foram cultivadas em presença Vn (solúvel), Ln (aderida) ou combinação das duas proteínas durante 6 horas. Barras verticais representam desvio padrão de pelo menos 3 experimentos.

**Figura 20** - Crescimento axonal estimulado por Vn e Ln.

Diante dos resultados do efeito combinado de vários ligantes de PrPc, torna-se necessário propor um modelo no qual estas observações se encaixem.

STI1 e Ln não possuem o mesmo sítio de ligação em PrPc, enquanto STI1 liga-se aos aminoácidos 113-128 (como mostrado artigo ZANATA et al. 2002 Figura 4 – Anexo I), Ln liga-se aos resíduos 173-182 (Coitinho et al. Figura 3 –Anexo IV), o que possibilitaria a interação dos dois ligantes ao mesmo tempo em PrPc. Em ensaios de ligação, Ln é capaz de competir pela interação STI1-PrPc (Figura 17), provavelmente através de impedimento estérico, já que Ln é uma proteína de 900 kDa. Entretanto, ensaios *ex vivo* mostram que em concentrações sub-ótimas, onde nenhuma das duas proteínas tem atividade isoladamente, não ocorre neuritogênese. (Figura 20 painéis A.1 e A.2). Sua combinação (Ln+STI1) faz com que o limiar das vias desencadeadas por PrPc seja atingido resultando em um maior crescimento neurítico (Figura 21 painéis A.3 e A.4). Isso poderia ocorrer pela ligação de Ln e STI1 em moléculas distintas de PrPc (Figura 21 painel A.3). Uma outra hipótese, é que Ln e STI1 poderiam estar ligadas a uma única molécula de PrPc (Figura 21 painel A.4). Para ambos os casos (Figura 21 painéis A.3 e A.4) a sinalização desencadeada seria suficiente para induzir neuritogênese. Isso não exclui uma possível ligação de Ln a integrinas nesses modelos (Figura 21 painéis A.3 e A.4), entretanto esta associação não é produtiva uma vez que neurônios sensoriais de animais deficientes para PrPc não respondem ao tratamento.

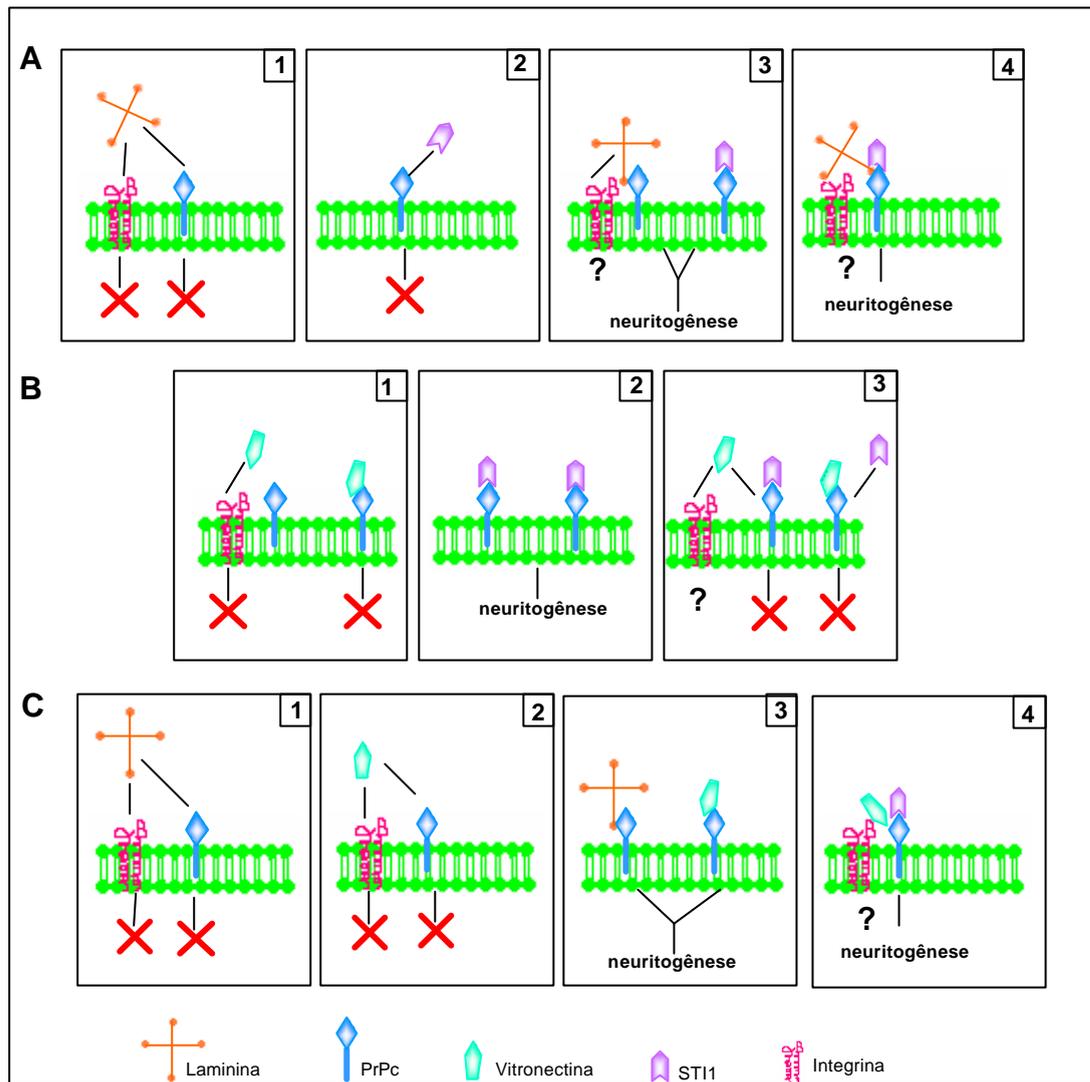
É possível ainda que PrPc desempenhe um papel nucleante recrutando inicialmente STI1 e Ln e a última passaria então a associar-se também a integrinas (Figura 21 A.4).

Por sua vez a neuritogênese induzida por STI1 em animais selvagens pode ser inibida por Vn em concentrações cinco vezes menores, que aquela

usada para STI1 (Figura 21 painéis B.1, B.2 e B.3). Estes dados comprovam os resultados obtidos anteriormente onde Vn e STI1 associam-se a domínios sobrepostos e competem entre si pela ligação a PrPc (ZANATA et al. 2002 Figura 4 - Anexo I e Hajj et al. Figura 2a e b - Anexo III).

Por outro lado, apesar da maior afinidade de Vn ( $Kd=10^{-8}M$ ) que STI1 ( $Kd=10^{-7}M$ ) por PrPc, em baixas concentrações, Vn é capaz de dissociar STI1 de PrPc, mas não promover efeito biológico (Figura 21 B.3).

O mesmo raciocínio usado na interpretação da combinação de STI1+Ln serve para a combinação Ln+Vn, onde se observa um aumento da neuritogênese somente em animais selvagens. As duas moléculas em concentrações sub-ótimas não possuem atividade suficiente para desencadear a via de sinalização relevante para o processo (Figura 21 C.1 e C.2), mas quando são associadas, o limiar de ativação da via é atingido e há crescimento (Figura 21 C.3). Também neste caso os sítios de ligação de PrPc a estas moléculas é diferente (ZANATA et al. 2002) o que possibilitaria a ligação das duas proteínas na mesma molécula de PrPc; se não houver impedimento estérico das moléculas envolvidas (Figura 21 C.4). É importante notar que o efeito combinado de Vn e Ln é dependente unicamente da presença de PrPc, uma vez que o efeito está ausente em animais deficientes para PrPc. Isso pode implicar numa ordem de hierarquia na ativação dessas vias de sinalização que possuem como alvo inicial PrPc, que pode ter uma ação nucleante e recrutar outros receptores (integrinas) (Figura 21 C.4).



**Legenda:** A, Ln e ST11, isoladamente, e em concentrações subótimas, não são capazes de ativar a via de neuritogênese. Quando ambas ligam a diferentes moléculas de PrPc ou ainda à mesma molécula, são capazes de induzir neuritogênese. Alternativamente, o complexo PrPc, Ln e ST11 pode ser capaz de recrutar integrinas e ativar neuritogênese. B, Na combinação Vn e ST11, Vn é capaz de bloquear o efeito de ST11, inibindo o crescimento neurítico. C, A combinação da ativação de PrPc com Ln e Vn leva a neuritogênese. O complexo Ln, Vn, PrPc poderia recrutar integrinas nesse modelo, assim como em A.

**Figura 21** - Modelo proposto para ilustrar as interações entre as proteínas PrPc, ST11, Vn, Ln e integrina.

## 5 CONCLUSÕES

---

Na tentativa de elucidar a (s) função (ões) fisiológica (s) de PrPc, nosso grupo vem identificando e caracterizando proteínas ligantes de PrPc a fim de associar essas interações com fenômenos biológicos.

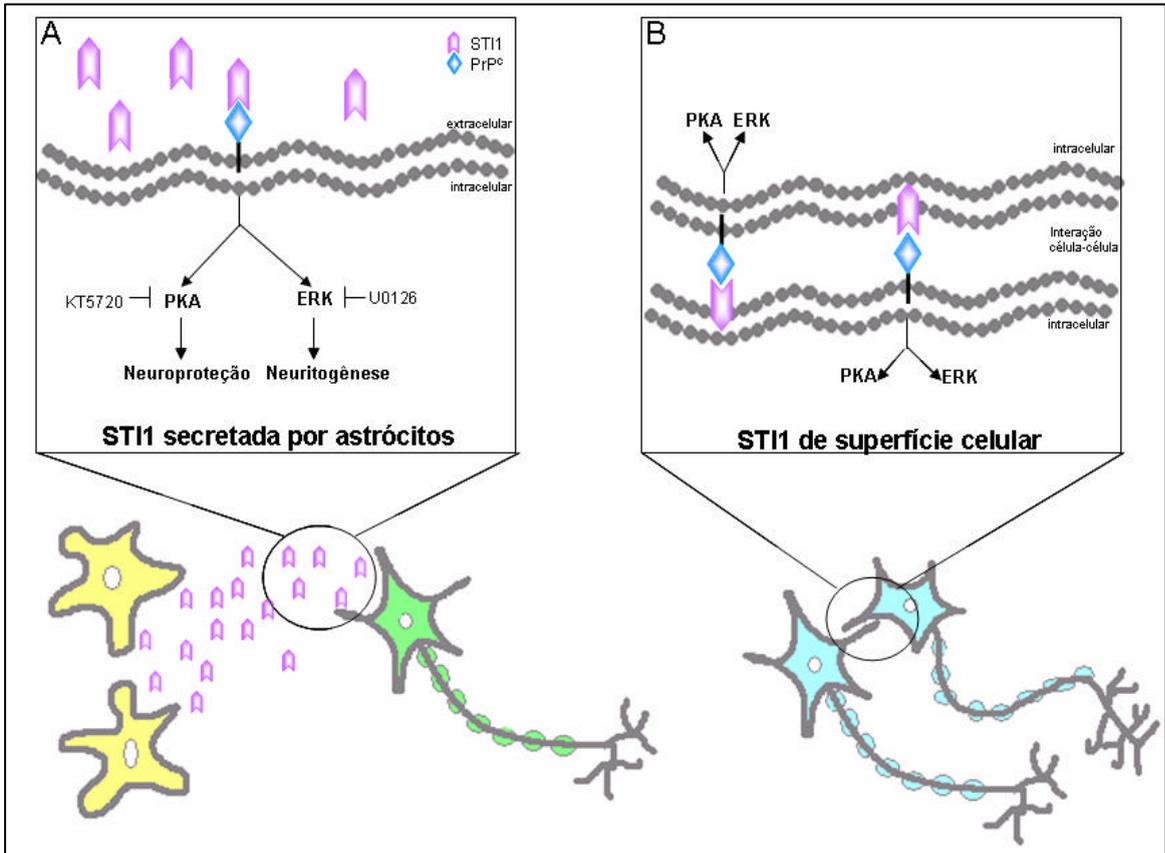
As proteínas de matriz extracelular, laminina (Ln) e vitronectina (Vn) e a proteína co-chaperonina, STI1, são três dos ligantes de PrPc já caracterizados.

Assim, o presente estudo destacou as principais funções biológicas atribuídas a PrPc e seus respectivos parceiros, STI1, Vn e Ln.

Em um primeiro momento, ao explorar a teoria da hidropaticidade complementar, caracterizamos STI1, como o mais novo ligante de PrPc. STI1 é uma co-chaperonina, presente principalmente no citoplasma, e também encontrada na superfície celular. Essa proteína, quando associada à PrPc, mostrou-se relacionada ao crescimento neurítico de neurônios do sistema nervoso central e periférico, de uma maneira dependente da atividade de MAPK. Além disso, STI1 atua na neuroproteção de neurônios hipocâmpais e retinianos utilizando a via de PKA.

Assim, podemos propor um modelo onde PrPc interage com STI1 e transduz sinais de sobrevivência neuronal através da via de PKA e de crescimento neurítico através da via de MAPK. O complexo PrPc-STI1 pode ser formado tanto por proteínas da mesma célula quanto por proteínas de células distintas. Além disso, especula-se ainda que STI1 possa agir como um fator solúvel neurotrófico, uma vez que STI1 apresenta-se secretada em certas

linhagens tumorais e em cultura de astrócitos (EUSTACE e JAY 2004 e LIMA et al manuscrito em preparação) (Figura 22).



**Legenda:** A, A forma secretada de STI1 pode interagir com PrPc e ativar a cascata de transdução de sinal que leva a sobrevivência neuronal (PKA) ou neuritogênese (Erk). B, A fração de STI1 presente na membrana plasmática pode ligar PrPc de células distintas e ativar vias de sinalização específicas (PKA ou MAPK).

**Figura 22** - Modelos alternativos de atuação de STI1, quando solúvel ou integrada à membrana plasmática, na neuritogênese e neuroproteção:

Em um segundo momento, mostramos que os outros ligantes de PrPc, Ln e Vn, assim como STI1, encontram-se envolvidos em neuritogênese, sendo que para Vn, este efeito é dependente de PrPc, mas pode ser compensado por integrinas.

Além disso, a interação entre Ln e PrPc mostra-se envolvida em mecanismos de consolidação das memórias de curta e longa duração através de vias clássicas de sinalização.

É interessante observar que o comportamento de PrPc associado a cada ligante descrito neste estudo reflete em fenômenos biológicos integrados, ou seja, neuritogênese em SNC e SNP e sobrevivência neuronal. A neuritogênese pode ser relacionada à plasticidade neuronal e especificamente neste caso a consolidação da memória. Entretanto, outros eventos biológicos podem ser relacionados com o fenótipo desencadeado pela ativação do complexo multi-protérico, do qual PrPc faz parte.

Preliminarmente, ao analisar os efeitos biológicos induzidos pelo complexo PrPc, STI1, Ln e Vn, na neuritogênese de neurônios periféricos, obtivemos resultados um tanto quanto curiosos.

Uma vez que, Ln e STI1 ligam a PrPc em diferentes domínios as mesmas poderiam agir conjuntamente na neuritogênese. De fato, culturas neuronais tratadas com ambas as proteínas apresentaram um efeito sinérgico muito acentuado e o mesmo não foi observado com o tratamento isolado (com concentrações sub-ótimas). Isto indica, uma integração ativa do complexo PrPc-STI1-Ln nesse fenótipo.

Já as moléculas de Vn e STI1 são mutuamente exclusivas quanto à ligação a PrPc, pois ambas compartilham o mesmo domínio de ligação desta proteína. Além disso, Vn possui uma afinidade dez vezes maior que STI1. Apesar de Ln e Vn ligarem-se a domínios diferentes de PrPc, quando combinadas mostram um efeito maior sobre a neuritogênese. Portanto, no

micro-ambiente celular, os fenômenos biológicos mediados por Tl1, Ln e Vn dependerão da disponibilidade de cada uma delas e de seus respectivos receptores celulares específicos.

O conjunto de resultados aqui apresentados demonstrou que PrPc participa na formação de neuritos, sobrevivência neuronal e consolidação da memória em conjunto com outros ligantes.

No entanto, como pode ser visto, muitas questões sobre PrPc e suas interações ainda permanecem em aberto. O melhor conhecimento dessas ligações poderá ajudar a desvendar o (s) papel (éis) fisiológico (s) de PrPc e também poderá trazer informações favoráveis ao desenvolvimento de compostos terapêuticos para o tratamento de doenças priônicas.

## 6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas-Terki T, Briand PA, Donze O, Picard D. The Hsp90 co-chaperones Cdc37 and Sti1 interact physically and genetically. **Biol Chem** 2002; 383:1335-42.

Abbas-Terki T, Donze O, Briand PA, Picard D. Hsp104 interacts with Hsp90 cochaperones in respiring yeast. **Mol Cell Biol** 2001; 21:7569-75.

Adams RH, Lohrum M, Klostermann A, Betz H, Puschel AW. The chemorepulsive activity of secreted semaphorins is regulated by furin-dependent proteolytic processing. **EMBO J** 1997; 16:6077-86.

Adams MD, Celniker SE, Holt RA, et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science** 2000; 287:2185-95.

Aguzzi A, Heppner FL, Heikenwalder M, et al. Immune system and peripheral nerves in propagation of prions to CNS. **Br Med Bull** 2003; 66:141-59.

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

Alper T, Haig DA, Clarke MC. The exceptionally small size of the scrapie agent. **Biochem Biophys Res Commun** 1966; 22:278-84.

Alper T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? **Nature** 1967; 214:764-66.

Arbeitman MN, Hogness DS. Molecular chaperones activate the *Drosophila* ecdysone receptor, an RXR heterodimer. **Cell** 2000; 101:67-77.

Arnold JE, Tipler C, Laszlo L, Hope J, Landon M, Mayer RJ. The abnormal isoform of the prion protein accumulates in late-endosome-like organelles in scrapie-infected mouse brain. **J Pathol** 1995; 176:403-11.

Asante EA, Gowland I, Linehan JM, Mahal SP, Collinge J. Expression pattern of a mini human PrP gene promoter in transgenic mice. **Neurobiol Dis** 2002a; 10:1-7.

Asante EA, Linehan JM, Desbruslais M, et al. BSE prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD-like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein. **EMBO J** 2002b; 21:6358-66.

Bagnard D, Lohrum M, Uziel D, Puschel AW, Bolz J. Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. **Development** 1998; 125:5043-53.

Banks WA, Niehoff ML, Adessi C, Soto C. Passage of murine scrapie prion protein across the mouse vascular blood-brain barrier. **Biochem Biophys Res Commun** 2004; 318:125-30.

Baron GS, Wehrly K, Dorward DW, Chesebro B, Caughey B. Conversion of raft associated prion protein to the protease-resistant state requires insertion of PrP-res (PrP(Sc)) into contiguous membranes. **EMBO J** 2002; 21:1031-40.

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.

Beck K, Hunter I, Engel J. Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. **FASEB J** 1990; 4:148-60.

Behrens A, Genoud N, Naumann H, Rulicke T, Janett F, Heppner FL, Ledermann B, Aguzzi A. Absence of the prion protein homologue Doppel causes male sterility. **EMBO J** 2002; 15;21(14):3652-8.

Beranger F, Mange A, Goud B, Lehmann S. Stimulation of PrP(C) retrograde transport toward the endoplasmic reticulum increases accumulation of PrP(Sc) in prion-infected cells. **J Biol Chem** 2002; 277:38972-77.

Bharadwaj S, Ali A, Ovsenek N. Multiple components of the HSP90 chaperone complex function in regulation of heat shock factor 1 In vivo. **Mol Cell Biol** 1999; 19:8033-41.

Blalock JE. Complementarity of peptides specified by 'sense' and 'antisense' strands of DNA. **Trends Biotechnol** 1990; 8:140-144.

Blatch GL, Lasse M. The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. **Bioessays** 1999; 21:932-39.

Blatch GL, Lasse M, Zetter BR, Kundra V. Isolation of a mouse cDNA encoding mSTI1, a stress-inducible protein containing the TPR motif. **Gene** 1997; 194:277-82.

Boellaard JW, Brown P, Tateishi J. Gerstmann-Straussler-Scheinker disease- the dilemma of molecular and clinical correlations. **Clin Neuropathol** 1999; 18:271-85.

Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. **Science** 1982; 218:1309-11.

Bons N, Mestre-Frances N, Belli P, Cathala F, Gajdusek DC, Brown P. Natural and experimental oral infection of nonhuman primates by bovine spongiform encephalopathy agents. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1999; 96:4046-51.

Bradley ME, Edskes HK, Hong JY, Wickner RB, Liebman SW. Interactions among prions and prion "strains" in yeast. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2002; 99 Suppl 4:16392-99.

Bratosiewicz J, Kordek R, Kulczycki J, Botts G, Liberski PP. Molecular analysis of PRNP gene in Polish population and in Creutzfeldt-Jakob disease. **Folia Neuropathol** 1999; 37:277-80.

Brentani RR. Biological implications of complementary hydrophobicity of amino acids. **J Theor Biol** 1988; 135:495-99.

Brown P, Preece MA, Will RG. "Friendly fire" in medicine: hormones, homografts, and Creutzfeldt-Jakob disease. **Lancet** 1992; 340:24-27.

Brown DR, Qin K, Herms JW, et al. The cellular prion protein binds copper in vivo. **Nature** 1997a; 390:684-87.

Brown DR, Schulz-Schaeffer WJ, Schmidt B, Kretzschmar HA. Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. **Exp Neurology** 1997b; 146:104-12.

Brown DR, Besinger A. Prion protein expression and superoxide dismutase activity. **Biochem J** 1998; 334:423-29.

Brown DR, Nicholas RS, Canevari L. Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. **J Neurosci Res** 2002; 67:211-24.

Brown LR, Harris DA. Copper and zinc cause delivery of the prion protein from the plasma membrane to a subset of early endosomes and the Golgi. **J Neurochem** 2003; 87:353-63.

Brown P. The phenotypic expression of different mutations in transmissible human spongiform encephalopathy. **Rev Neurol (Paris)** 1992; 148:317-27.

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.

Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, et al. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. **Cell** 1993; 73:1339-47.

Caboclo LO, Huang N, Lepski GA, et al. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease following human growth hormone therapy: case report. **Arq Neuropsiquiatr** 2002; 60:458-61.

Cabral AL, Lee KS, Martins VR. Regulation of the cellular prion protein gene expression depends on chromatin conformation. **J Biol Chem** 2002; 277:5675-82.

Carlton JM, Angiuoli SV, Suh BB, et al. Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. **Nature** 2002; 419:512-19.

Castro RM. Proteína prion celular em doenças humanas não-priônicas: aspectos moleculares e celulares. 1-163.2004 Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente.

Caughey B. In vitro expression and biosynthesis of prion protein. **Curr Top Microbiol Immunol** 1991; 172:93-107.

Caughey B, Race RE. Potent inhibition of scrapie-associated PrP accumulation by congo red. **J Neurochem** 1992; 59:768-71.

Caughey B, Raymond GJ. Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells. **J Virol** 1993; 67:643-50.

Caughey B, Raymond GJ, Callahan MA, Wong C, Baron GS, Xiong LW. Interactions and conversions of prion protein isoforms. **Adv Protein Chem** 2001; 57:139-69.

Caughey B, Raymond LD, Raymond GJ, Maxson L, Silveira J, Baron GS. Inhibition of protease-resistant prion protein accumulation in vitro by curcumin. **J Virol** 2003; 77:5499-502.

Cervenakova L, Bueteffisch C, Lee HS, et al. Novel PRNP sequence variant associated with familial encephalopathy. **Am J Med Genet** 1999; 88:653-56.

Chandler RL. Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. **Lancet** 1961; 1:1378-79.

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

Chen S, Mange A, Dong L, Lehmann S, Schachner M. Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. **Mol Cell Neurosci** 2003; 22:227-33.

Chen ZL, Strickland S. Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. **Cell** 1997; 91:917-25.

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

Chen ZL, Strickland S. Laminin gamma1 is critical for Schwann cell differentiation, axon myelination, and regeneration in the peripheral nerve. **J Cell Biol** 2003; 163:889-99.

Chesebro B, Race R, Wehrly K, et al. Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. **Nature** 1985; 315:331-33.

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

Cho HJ. Is the scrapie agent a virus? **Nature** 1976; 262:411-12.

Coitinho AS, Roesler R, Martins VR, Brentani RR, Izquierdo I. Cellular prion protein ablation impairs behavior as a function of age. **Neuroreport** 2003; 14:1375-79.

Collinge J, Palmer MS, Dryden AJ. Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. **Lancet** 1991; 337:1441-42.

Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. **Nature** 1996; 383:685-90.

Collins S, Boyd A, Fletcher A, Gonzales MF, McLean CA, Masters CL. Recent advances in the pre-mortem diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. **J Clin Neurosci** 2000; 7:195-202.

Cognato H, Yurchenco PD. Form and function: the laminin family of heterotrimers. **Dev Dyn** 2000; 218:213-34.

Come JH, Fraser PE, Lansbury PT, Jr. A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1993; 90:5959-63.

Cordeiro Y, Machado F, Juliano L, et al. DNA converts cellular prion protein into the beta-sheet conformation and inhibits prion peptide aggregation. **J Biol Chem** 2001; 276:49400-49409.

Cortelli P, Gambetti P, Montagna P, Lugaresi E. Fatal familial insomnia: clinical features and molecular genetics. **J Sleep Res** 1999; 8 Suppl 1:23-29.

Coulthard A, Hall K, English PT, Ince PG, Burn DJ, Bates D. Quantitative analysis of MRI signal intensity in new variant Creutzfeldt-Jakob disease. **Br J Radiol.** 1999;2(860):742-8.

Croes EA, Jansen GH, Lemstra AW, Frijns CJ, van Gool WA, van Duijn CM. The first two patients with dura mater associated Creutzfeldt-Jakob disease in the Netherlands. **J Neurol** 2001; 248:877-80.

Cuille J, Chelle, PL. Experimental transmission of trembling to the goat. **Comptes Rendus des Seances de l'Academie des Sciences** 1939; 208: 1058-1160.

Das AK, Cohen PW, Barford D. The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. **EMBO J** 1998; 17:1192-99.

Daude N, Marella M, Chabry J. Specific inhibition of pathological prion protein accumulation by small interfering RNAs. **J Cell Sci** 2003; 116:2775-79.

DeBurman SK, Raymond GJ, Caughey B, Lindquist S. Chaperone-supervised conversion of prion protein to its protease-resistant form. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1997; 94:13938-43.

Deleault NR, Lucassen RW, Supattapone S. RNA molecules stimulate prion protein conversion. **Nature** 2003; 425:717-20.

Demand J, Luders J, Hohfeld J. The carboxy-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors. **Mol Cell Biol** 1998; 18:2023-28.

Doh-ura K, Tateishi J, Sasaki H, Kitamoto T, Sakaki Y. Pro----leu change at position 102 of prion protein is the most common but not the sole mutation related to Gerstmann-Straussler syndrome. **Biochem Biophys Res Commun** 1989; 163:974-79.

Donze O, Picard D. Hsp90 binds and regulates Gcn2, the ligand-inducible kinase of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 [corrected]. **Mol Cell Biol** 1999; 19:8422-32.

Edenhofer F, Rieger R, Famulok M, Wendler W, Weiss S, Winnacker EL. Prion protein PrPc interacts with molecular chaperones of the Hsp60 family. **J Virol** 1996; 70:4724-28.

Ellis V, Daniels M, Misra R, Brown DR. Plasminogen activation is stimulated by prion protein and regulated in a copper-dependent manner. **Biochemistry** 2002; 41:6891-96.

Eustace BK, Jay DG. Extracellular roles for the molecular chaperone, hsp90. **Cell Cycle** 2004; 3:1098-100.

Finckh U, Muller-Thomsen T, Mann U, et al. High prevalence of pathogenic mutations in patients with early-onset dementia detected by sequence analyses of four different genes. **Am J Hum Genet** 2000; 66:110-117.

Flechsig 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, Li H, et al. A marked disparity between the expression of prion protein and its message by neurones of the CNS. **Neuroscience** 2002a; 111:533-51.

Ford MJ, Burton LJ, Morris RJ, Hall SM. Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. **Neuroscience** 2002b; 113:177-92.

Forloni G, Angeretti N, Chiesa R, et al. Neurotoxicity of a prion protein fragment. **Nature** 1993; 362:543-46.

Gabizon R, McKinley MP, Groth D, Prusiner SB. Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1988; 85:6617-21.

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

Gajdusek DC, Zigas V. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. **N Engl J Med** 1957; 257:974-78.

Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M. Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. **Nature** 1966; 209:794-96.

Gajdusek DC. Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. **Science** 1977; 197:943-60.

Gauczynski S, Peyrin JM, Haik S, et al. The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. **EMBO J** 2001; 20:5863-75.

Gehlsen KR, Sriramarao P, Furcht LT, Skubitz AP. A synthetic peptide derived from the carboxy terminus of the laminin A chain represents a binding site for the alpha 3 beta 1 integrin. **J Cell Biol** 1992; 117:449-59.

Genoud N, Behrens A, Miele G, Robay D, Heppner FL, Freigang S, Aguzzi A. R. Disruption of Doppel prevents neurodegeneration in mice with extensive Prnp deletions. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2004; 23;101(12):4198-203.

Ghetti B, Dlouhy SR, Giaccone G, et al. Gerstmann-Straussler-Scheinker disease and the Indiana kindred. **Brain Pathol** 1995; 5:61-75.

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 U S A** 1996; 93:744-48.

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

Gibbs CJ, Jr., Gajdusek DC, Asher DM, et al. Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. **Science** 1968; 161:388-89.

Glover JR, Lindquist S. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. **Cell** 1998; 94:73-82.

Goebel M, Yanagida M. The TPR snap helix: a novel protein repeat motif from mitosis to transcription. **Trends Biochem Sci** 1991; 16:173-77.

Goldfarb LG, Brown P, Little BW, et al. A new (two-repeat) octapeptide coding insert mutation in Creutzfeldt-Jakob disease. **Neurology** 1993; 43:2392-94.

Goldfarb LG, Brown P, Cervenakova L, Gajdusek DC. Genetic analysis of Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 1994; 343:379-84.

Gonzalez-Iglesias R, Pajares MA, Ocal C, Espinosa JC, Oesch B, Gasset M. Prion protein interaction with glycosaminoglycan occurs with the formation of oligomeric complexes stabilized by Cu(II) bridges. **J Mol Biol** 2002; 319:527-40.

Grabham PW, Gallimore PH, Grand RJ. Vitronectin is the major serum protein essential for NGF-mediated neurite outgrowth from PC12 cells. **Exp Cell Res** 1992; 202:337-44.

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

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

Griffith JS. Self-replication and scrapie. **Nature** 1967; 215:1043-44.

Gross M, Hessefort S. Purification and characterization of a 66-kDa protein from rabbit reticulocyte lysate which promotes the recycling of hsp 70. **J Biol Chem** 1996; 271:16833-41.

Harris DA, Lele P, Snider WD. Localization of the mRNA for a chicken prion protein by in situ hybridization. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1993; 90:4309-13.

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

Hegde RS, Mastrianni JA, Scott MR, et al. A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. **Science** 1998; 279:827-34.

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

Hernandez TJ, Chatellard P, Stutz E. Isolation and characterization of gmsti, a stress-inducible gene from soybean (*Glycine max*) coding for a protein belonging to the TPR (tetratricopeptide repeats) family. **Plant Mol Biol** 1995; 27:1221-26.

Herzog C, Sales N, Etchegaray N, et al. Tissue distribution of bovine spongiform encephalopathy agent in primates after intravenous or oral infection. **Lancet** 2004; 363:422-28.

Honore B, Leffers H, Madsen P, Rasmussen HH, Vandekerckhove J, Celis JE. Molecular cloning and expression of a transformation-sensitive human protein containing the TPR motif and sharing identity to the stress-inducible yeast protein STI1. **J Biol Chem** 1992; 267:8485-91.

Hsiao K, Dlouhy SR, Farlow MR, et al. Mutant prion proteins in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease with neurofibrillary tangles. **Nat Genet** 1992; 1:68-71.

Hutter G, Heppner FL, Aguzzi A. No superoxide dismutase activity of cellular prion protein in vivo. **Biol Chem** 2003; 384:1279-85.

Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell** 1992; 69:11-25.

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

Indyk JA, Chen ZL, Tsirka SE, Strickland S. Laminin chain expression suggests that laminin-10 is a major isoform in the mouse hippocampus and is degraded by the tissue plasminogen activator/plasmin protease cascade during excitotoxic injury. **Neuroscience** 2003; 116:359-71.

Ingrosso L, Vetrugno V, Cardone F, Pocchiari M. Molecular diagnostics of transmissible spongiform encephalopathies. **Trends Mol Med** 2002; 8:273-80.

Inoue I, Kitamoto T, Doh-ura K, Shii H, Goto I, Tateishi J. Japanese family with Creutzfeldt-Jakob disease with codon 200 point mutation of the prion protein gene. **Neurology** 1994; 44:299-301.

Jin T, Gu Y, Zanusso G, et al. The chaperone protein BiP binds to a mutant prion protein and mediates its degradation by the proteasome. **J Biol Chem** 2000; 275:38699-704.

Joshi M, Dwyer DM, Nakhasi HL. Cloning and characterization of differentially expressed genes from in vitro-grown 'amastigotes' of *Leishmania donovani*. **Mol Biochem Parasitol** 1993; 58:345-54.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. **Principles of neural science**. New York: McGraw-Hill; 2000. The guidance of axons to their targets; p.1063-86.

Kaneko K, Vey M, Scott M, Pilkuhn S, Cohen FE, Prusiner SB. COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1997; 94:2333-38.

Keshet GI, Bar-Peled O, Yaffe D, Nudel U, Gabizon R. The cellular prion protein colocalizes with the dystroglycan complex in the brain. **J Neurochem** 2000; 75:1889-97.

Kimberlin RH. Scrapie agent: prions or virinos? **Nature** 1982; 297:107-8.

Kimberlin RH, Walker CA. The role of the spleen in the neuroinvasion of scrapie in mice. **Virus Res** 1989; 12:201-11.

Kirby L, Birkett CR, Rudyk H, Gilbert IH, Hope J. In vitro cell-free conversion of bacterial recombinant PrP to PrPres as a model for conversion. **J Gen Virol** 2003; 84:1013-20.

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.

Klatzo I, Gajdusek Dc, Zigas V. Pathology of Kuru. **Lab Invest** 1959; 8:799-847.

Kryndushkin DS, Smirnov VN, Ter Avanesyan MD, Kushnirov VV. Increased expression of Hsp40 chaperones, transcriptional factors, and ribosomal protein Rpp0 can cure yeast prions. **J Biol Chem** 2002; 277:23702-8.

Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T, et al. Prions prevent neuronal cell-line death. **Nature** 1999;400:225-26.

Lamprecht R, LeDoux J. Structural plasticity and memory. **Nat Rev Neurosci** 2004; 5:45-54.

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

Lantos PL, McGill IS, Janota I, et al. Prion protein immunocytochemistry helps to establish the true incidence of prion diseases. **Neurosci Lett** 1992; 147:67-71.

Lassle M, Blatch GL, Kundra V, Takatori T, Zetter BR. Stress-inducible, murine protein mSTI1. Characterization of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different kinases. **J Biol Chem** 1997; 272:1876-84.

Le Beau JM, Liuzzi FJ, Depto AS, Vinik AI. Differential laminin gene expression in dorsal root ganglion neurons and nonneuronal cells. **Exp Neurol** 1994; 127:1-8.

Le Beau JM, Liuzzi FJ, Depto AS, Vinik AI. Up-regulation of laminin B2 gene expression in dorsal root ganglion neurons and nonneuronal cells during sciatic nerve regeneration. **Exp Neurol** 1995; 134:150-155.

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

Lee KS, Linden R, Prado MA, Brentani RR, Martins VR. Towards cellular receptors for prions. **Rev Med Virol** 2003; 13:399-408.

Legname G, Baskakov IV, Nguyen HO, et al. Synthetic mammalian prions. **Science** 2004; 305:673-76.

Lentz SI, Miner JH, Sanes JR, Snider WD. Distribution of the ten known laminin chains in the pathways and targets of developing sensory axons. **J Comp Neurol** 1997; 378:547-61.

Leucht C, Simoneau S, Rey C, et al. The 37 kDa/67 kDa laminin receptor is required for PrP(Sc) propagation in scrapie-infected neuronal cells. **EMBO Rep** 2003; 4:290-295.

Liebkind R, Laatikainen T, Liesi P. Is the soluble KDI domain of gamma1 laminin a regeneration factor for the mammalian central nervous system? **J Neurosci Res** 2003; 73:637-43.

Liesi P, Laatikainen T, Wright JM. Biologically active sequence (KDI) mediates the neurite outgrowth function of the gamma-1 chain of laminin-1. **J Neurosci Res** 2001; 66:1047-53.

Lima FR, Muras AG, Arantes C, Nomizo R. Involvement of PrPc in the neuron glia interaction. Manuscrito em preparação.

Liu T, Li R, Pan T, et al. Intercellular transfer of the cellular prion protein. **J Biol Chem** 2002; 277:47671-78.

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

Longshaw VM, Chapple JP, Balda MS, Cheetham ME, Blatch GL. Nuclear translocation of the Hsp70/Hsp90 organizing protein mSTI1 is regulated by cell cycle kinases. **J Cell Sci** 2004; 117:701-10.

Lorenz H, Windl O, Kretschmar HA. Cellular phenotyping of secretory and nuclear prion proteins associated with inherited prion diseases. **J Biol Chem** 2002; 277:8508-16.

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

Lugaresi E, Montagna P, Baruzzi A, et al. [Familial insomnia with a malignant course: a new thalamic disease]. **Rev Neurol (Paris)** 1986; 142:791-92.

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

Magalhães AC, Silva JA, Lee KS, et al. Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. **J Biol Chem** 2002; 277:33311-18.

Mallucci GR, Ratte S, Asante EA, et al. Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. **EMBO J** 2002; 21:202-10.

Mallucci GR, Dickinson A, Linehan J, Klohn PC, Brandner S, Collinge J. Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. **Science** 2003; 302:871-74.

Manson J, West JD, Thomson V, McBride P, Kaufman MH, Hope J. The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? **Development** 1992; 115:117-22.

Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J. 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. **Mol Neurobiol** 1994; 8:121-27.

Manthorpe M, Engvall E, Ruoslahti E, Longo FM, Davis GE, Varon S. Laminin promotes neuritic regeneration from cultured peripheral and central neurons. **J Cell Biol** 1983; 97:1882-90.

Martinez-Morales JR, Marti E, Frade JM, Rodriguez-Tebar A. Developmentally regulated vitronectin influences cell differentiation, neuron survival and process outgrowth in the developing chicken retina. **Neuroscience** 1995; 68:245-53.

Martinez-Morales JR, Barbas JA, Marti E, Bovolenta P, Edgar D, Rodriguez-Tebar A. Vitronectin is expressed in the ventral region of the neural tube and promotes the differentiation of motor neurons. **Development** 1997; 124:5139-47.

Martins AR, Dias MM, Vasconcelos TM, et al. Microwave-stimulated recovery of myosin-V immunoreactivity from formalin-fixed, paraffin-embedded human CNS. **J Neurosci Methods** 1999;92:25-29.

Martins VR, Graner E, Garcia-Abreu J, et al. Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. **Nat Med** 1997; 3:1376-82.

Masison DC. Expanding the prion model for the yeast [PSI<sup>+</sup>] element. **Trends Microbiol** 2000; 8:1-3.

Masters CL, Richardson EP, Jr. Subacute spongiform encephalopathy (Creutzfeldt-Jakob disease). The nature and progression of spongiform change. **Brain** 1978; 101:333-44.

Masters CL, Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr. The familial occurrence of Creutzfeldt-Jakob disease and Alzheimer's disease. **Brain** 1981; 104:535-58.

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.

Mathews JD, Glasse R, Lindenbaum S. Kuru and cannibalism. **Lancet** 1968; 2:449-52.

McKinley MP, Hay B, Lingappa VR, Lieberburg I, Prusiner SB. Developmental expression of prion protein gene in brain. **Dev Biol** 1987; 121:105-10.

McKinley MP, Taraboulos A, Kenaga L, et al. Ultrastructural localization of scrapie prion proteins in cytoplasmic vesicles of infected cultured cells. **Lab Invest** 1991; 65:622-30.

Medori R, Tritschler HJ, LeBlanc A, et al. Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. **N Engl J Med** 1992; 326:444-49.

Meggio F, Negro A, Sarno S, et al. Bovine prion protein as a modulator of protein kinase CK2. **Biochem J** 2000; 352 Pt 1:191-96.

Meyer RK, McKinley MP, Bowman KA, Braunfeld MB, Barry RA, Prusiner SB. Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1986; 83:2310-2314.

Miele G, Alejo Blanco AR, Baybutt H, Horvat S, Manson J, Clinton M. Embryonic activation and developmental expression of the murine prion protein gene. **Gene Expr** 2003; 11:1-12.

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

Miura T, Hori-i A, Takeuchi H. Metal-dependent alpha-helix formation promoted by the glycine-rich octapeptide region of prion protein. **FEBS Lett** 1996; 396:248-52.

Mobley WC, Neve RL, Prusiner SB, McKinley MP. Nerve growth factor increases mRNA levels for the prion protein and the beta-amyloid protein precursor in developing hamster brain. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1988; 85:9811-15.

Montrasio,F., Cozzio,A., Flechsig,E., Rossi,D., Klein,M.A., Rulicke,T., Raeber,A.J., Vosshenrich,C.A., Proft,J., Aguzzi,A., and Weissmann,C. B lymphocyte-restricted expression of prion protein does not enable prion replication in prion protein knockout mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A** 2001; 98, 4034-4037.

Moore RC, Lee IY, Silverman GL, et al. Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. **J Mol Biol** 1999; 292:797-817.

Moore RC, Mastrangelo P, Bouzamondo E, Heinrich C, Legname G, Prusiner SB, Hood L, Westaway D, DeArmond SJ, Tremblay P. Doppel-induced cerebellar degeneration in transgenic mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 18;98(26):15288-93.

Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, et al. Signal transduction through prion protein. **Science** 2000; 289:1925-28.

Narang HK. Scrapie, an unconventional virus: the current views. **Proc Soc Exp Biol Med** 1987; 184:375-88.

Narang H. Origin and implications of bovine spongiform encephalopathy. **Proc Soc Exp Biol Med** 1996; 211:306-22.

Negro A, Ballarin C, Bertoli A, Massimino ML, Sorgato MC. The metabolism and imaging in live cells of the bovine prion protein in its native form or carrying single amino acid substitutions. **Mol Cell Neurosci** 2001; 17:521-38.

Nicolet CM, Craig EA. Isolation and characterization of STI1, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol** 1989; 9:3638-46.

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.

Owens-Grillo JK, Stancato LF, Hoffmann K, Pratt WB, Krishna P. Binding of immunophilins to the 90 kDa heat shock protein (hsp90) via a tetratricopeptide repeat domain is a conserved protein interaction in plants. **Biochemistry** 1996; 35:15249-55.

Paitel E, Sunyach C, Alves DC, Bourdon JC, Vincent B, Checler F. Primary cultured neurons devoid of cellular prion display lower responsiveness to staurosporine through the control of p53 at both transcriptional and post-transcriptional levels. **J Biol Chem** 2004; 279:612-18.

Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, et al. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1993; 90:10962-66.

Panegyres PK, Toufexis K, Kakulas BA, et al. A new PRNP mutation (G131V) associated with Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. **Arch Neurol** 2001; 58:1899-902.

Patino MM, Liu JJ, Glover JR, Lindquist S. Support for the prion hypothesis for inheritance of a phenotypic trait in yeast. **Science** 1996; 273:622-26.

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

Peden AH, Head MW, Ritchie DL, Bell JE, Ironside JW. Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. **Lancet** 2004; 364:527-29.

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.

Perera WS, Hooper NM. Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region. **Curr Biol** 2001; 11:519-23.

Peters PJ, Mironov A, Jr., Peretz D, et al. Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. **J Cell Biol** 2003; 162:703-17.

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.

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.

Ponce ML, Nomizu M, Kleinman HK. An angiogenic laminin site and its antagonist bind through the alpha(v)beta3 and alpha5beta1 integrins. **FASEB J** 2001; 15:1389-97.

Prado MA, Alves-Silva J, Magalhaes AC, et al. PrPc on the road: trafficking of the cellular prion protein. **J Neurochem** 2004; 88:769-81.

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

Priola SA, Caughey B, Caughey WS. Novel therapeutic uses for porphyrins and phthalocyanines in the transmissible spongiform encephalopathies. **Curr Opin Microbiol** 1999; 2:563-66.

Prusiner SB, McKinley MP, Bowman KA, et al. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. **Cell** 1983; 35:349-58.

Prusiner SB, Cochran SP, Alpers MP. Transmission of scrapie in hamsters. **J Infect Dis** 1985; 152:971-78.

Prusiner SB. Molecular biology of prion diseases. **Science** 1991; 252:1515-22.

Prusiner SB. Biology of prion diseases. **J Acquir Immune Defic Syndr** 1993; 6:663-65.

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

Puschel AW. Semaphorins: repulsive guidance molecules show their attractive side. **Nat Neurosci** 1999; 2:777-78.

Rachidi W, Vilette D, Guiraud P, et al. Expression of Prion Protein Increases Cellular Copper Binding and Antioxidant Enzyme Activities but Not Copper Delivery. **J Biol Chem** 2003; 278:9064-72.

Reynolds GM, Young FI, Young JA, Williams A, Rowlands DC. Microwave oven antigen retrieval applied to the immunostaining of cytopathology specimens. **Cytopathology** 1994; 5:345-58.

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

Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wuthrich K. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). **Nature** 1996; 382:180-182.

Roberts MS, Woods AJ, Shaw PE, Norman JC. ERK1 associates with alpha(v)beta 3 integrin and regulates cell spreading on vitronectin. **J Biol Chem** 2003; 278:1975-85.

Roesler R, Walz R, Quevedo J, et al. Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP(C). **Brain Res Mol Brain Res** 1999; 71:349-53.

Rossi D, Cozzio A, Flechsig E, Klein MA, Rulicke T, Aguzzi A, Weissmann C. Onset of ataxia and Purkinje cell loss in PrP null mice inversely correlated with Dpl level in brain. **EMBO J**. 2001;15;20(4):694-702.

Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. **Science** 1987; 238:491-97.

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

Sakaguchi S, Katamine S, Nishida N, Moriuchi R, Shigematsu K, Sugimoto T, Nakatani A, Kataoka Y, Houtani T, Shirabe S, Okada H, Hasegawa S, Miyamoto T, and Noda T. Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. **Nature** 1996; 380, 528-531.

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

Sasaki T, Timpl R. Domain IVa of laminin alpha5 chain is cell-adhesive and binds beta1 and alphaVbeta3 integrins through Arg-Gly-Asp. **FEBS Lett** 2001; 509:181-85.

Sauer B. Cre/lox: one more step in the taming of the genome. **Endocrine** 2002; 19:221-28.

Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions. **Ann NY Acad Sci** 1949; 51:666-72.

Scheufler C, Brinker A, Bourenkov G, et al. Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. **Cell** 2000; 101:199-210.

Schmitt-Ulms G, Legname G, Baldwin MA, et al. Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. **J Mol Biol** 2001; 314:1209-25.

Scholz GM, Cartledge K, Hall NE. Identification and characterization of Hsc, a novel Hsp90-associating relative of Cdc37. **J Biol Chem** 2001; 276:30971-79.

Schumacher RJ, Hurst R, Sullivan WP, McMahon NJ, Toft DO, Matts RL. ATP-dependent chaperoning activity of reticulocyte lysate. **J Biol Chem** 1994; 269:9493-99.

Schwartz I, Seger D, Shaltiel S. Vitronectin. **Int J Biochem Cell Biol** 1999; 31:539-44.

Scott MR, Will R, Ironside J, et al. Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1999; 96:15137-42.

Seiffert D. Constitutive and regulated expression of vitronectin. **Histol Histopathol** 1997; 12:787-97.

Shang M, Koshikawa N, Schenk S, Quaranta V. The LG3 module of laminin-5 harbors a binding site for integrin alpha3beta1 that promotes cell adhesion, spreading, and migration. **J Biol Chem** 2001; 276:33045-53.

Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. **J Histochem Cytochem** 1991; 39:741-48.

Shyng SL, Huber MT, Harris DA. A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. **J Biol Chem** 1993; 268:15922-28.

Shyng SL, Heuser JE, Harris DA. A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. **J Cell Biol** 1994; 125:1239-50.

Sigurdson CJ, Miller MW. Other animal prion diseases. **Br Med Bull** 2003; 66:199-212.

Sikorski RS, Boguski MS, Goebel M, Hieter P. A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis. **Cell** 1990; 60:307-17.

Silverman GL, Qin K, Moore RC, Yang Y, Mastrangelo P, Tremblay P, Prusiner SB, Cohen FE, Westaway D. Doppel is an N-glycosylated, glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. Expression in testis and ectopic production in the brains of Prnp(0/0) mice predisposed to Purkinje cell loss. **J Biol Chem** 2000; 275(35):26834-41.

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

Sonnenberg A, Gehlsen KR, Aumailley M, Timpl R. Isolation of alpha 6 beta 1 integrins from platelets and adherent cells by affinity chromatography on mouse laminin fragment E8 and human laminin pepsin fragment. **Exp Cell Res** 1991; 197:234-44.

Soto C, Kasczak RJ, Saborio GP, et al. Reversion of prion protein conformational changes by synthetic beta-sheet breaker peptides. **Lancet** 2000; 355:192-97.

Soto C. Diagnosing prion diseases: needs, challenges and hopes. **Nat Rev Microbiol** 2004; 2:809-19.

Soto C, Castilla J. The controversial protein-only hypothesis of prion propagation. **Nat Med** 2004; 10 Suppl:S63-S67.

Spielhauer C, Schatzl HM. PrPC directly interacts with proteins involved in signaling pathways. **J Biol Chem** 2001; 276:44604-12.

Stockel J, Hartl FU. Chaperonin-mediated de novo generation of prion protein aggregates. **J Mol Biol** 2001; 313:861-72.

Supattapone S, Wille H, Uyechi L, et al. Branched polyamines cure prion-infected neuroblastoma cells. **J Virol** 2001; 75:3453-61.

Suzuki S, Oldberg A, Hayman EG, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Complete amino acid sequence of human vitronectin deduced from cDNA. Similarity of cell attachment sites in vitronectin and fibronectin. **EMBO J** 1985; 4:2519-24.

Tagliavini F, McArthur RA, Canciani B, et al. Effectiveness of anthracycline against experimental prion disease in Syrian hamsters. **Science** 1997; 276:1119-22.

Tashiro K, Monji A, Yoshida I, et al. An IKLL-containing peptide derived from the laminin alpha1 chain mediating heparin-binding, cell adhesion, neurite outgrowth and proliferation, represents a binding site for integrin alpha3beta1 and heparan sulphate proteoglycan. **Biochem J** 1999; 340 ( Pt 1):119-26.

Tobler I, Gaus SE, Deboer T, et al. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. **Nature** 1996; 380:639-42.

Tomaselli KJ, Hall DE, Flier LA, et al. A neuronal cell line (PC12) expresses two beta 1-class integrins-alpha 1 beta 1 and alpha 3 beta 1-that recognize different neurite outgrowth-promoting domains in laminin. **Neuron** 1990; 5:651-62.

Turk E, Teplow DB, Hood LE, Prusiner SB. Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. **Eur J Biochem** 1988; 176:21-30.

van der Spuy J, Kana BD, Dirr HW, Blatch GL. Heat shock cognate protein 70 chaperone-binding site in the co-chaperone murine stress-inducible protein 1 maps to within three consecutive tetratricopeptide repeat motifs. **Biochem J** 2000; 345 Pt 3:645-51.

Vassallo N, Herms J. Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. **J Neurochem** 2003; 86:538-44.

Walker DG, McGeer PL. Vitronectin expression in Purkinje cells in the human cerebellum. **Neurosci Lett** 1998; 251:109-12.

Walmsley AR, Zeng F, Hooper NM. The N-terminal region of the prion protein ectodomain contains a lipid raft targeting determinant. **J Biol Chem** 2003; 278:37241-48.

Walz R, Castro RM, Velasco TR, et al. Cellular prion protein: implications in seizures and epilepsy. **Cell Mol Neurobiol** 2002; 22:249-57.

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

Walz R, Castro RM, Landemberger MC, Velasco TR, Terra-Bustamante VC, Bastos AC, Bianchin M, Wichert-Ana L, Araujo D, Alexandre V Jr, Santos AC, Machado HR, Carlotti CG Jr, Brentani RR, Martins VR, Sakamoto AC. Cortical malformations are associated with a rare polymorphism of cellular prion protein. **Neurology**. 2004;10;63(3):557-60.

Wang X, Grammatikakis N, Hu J. Role of p50/CDC37 in hepadnavirus assembly and replication. **J Biol Chem** 2002; 277:24361-67.

Warner RG, Hundt C, Weiss S, Turnbull JE. Identification of the heparan sulfate binding sites in the cellular prion protein. **J Biol Chem** 2002; 277:18421-30.

Webb JR, Campos-Neto A, Skeiky YA, Reed SG. Molecular characterization of the heat-inducible LmSTI1 protein of *Leishmania major*. **Mol Biochem Parasitol** 1997; 89:179-93.

Wegele H, Haslbeck M, Reinstein J, Buchner J. Sti1 is a novel activator of the Ssa proteins. **J Biol Chem** 2003; 278:25970-25976.

Welch WJ, Gambetti P. Chaperoning brain diseases. **Nature** 1998; 392:23-24.

Wells GA, Wilesmith JW. The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. **Brain Pathol** 1995; 5:91-103.

Wiksten M, Liebkind R, Laatikainen T, Liesi P. Gamma 1 laminin and its biologically active KDI-domain may guide axons in the floor plate of human embryonic spinal cord. **J Neurosci Res** 2003; 71:338-52.

Wilesmith JW, Ryan JB, Atkinson MJ. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. **Vet Rec** 1991; 128:199-203.

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

Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, et al. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. **Nature** 2002; 415:871-80.

Wuthrich K, Riek R. Three-dimensional structures of prion proteins. **Adv Protein Chem** 2001; 57:55-82.

Xu D, Baburaj K, Peterson CB, Xu Y. Model for the three-dimensional structure of vitronectin: predictions for the multi-domain protein from threading and docking. **Proteins** 2001; 44:312-20.

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; 43:2723-24.

Yamashita YM, Nakaseko Y, Samejima I, et al. 20S cyclosome complex formation and proteolytic activity inhibited by the cAMP/PKA pathway. **Nature** 1996; 384:276-79.

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

Zahn R. Prion propagation and molecular chaperones. **Q Rev Biophys** 1999; 32:309-70.

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.

Zhang Z, Quick MK, Kanelakis KC, Gijzen M, Krishna P. Characterization of a plant homolog of hop, a cochaperone of hsp90. **Plant Physiol** 2003; 131:525-35.

Zheng L, Roeder RG, Luo Y. S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. **Cell** 2003; 114:255-66.

Zheng X, Saunders TL, Camper SA, Samuelson LC, Ginsburg D. Vitronectin is not essential for normal mammalian development and fertility. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1995; 92:12426-30.

Zhuang P, Blackburn MN, Peterson CB. Characterization of the denaturation and renaturation of human plasma vitronectin. I. Biophysical characterization of protein unfolding and multimerization. **J Biol Chem** 1996a; 271:14323-32.

Zhuang P, Li H, Williams JG, Wagner NV, Seiffert D, Peterson CB. Characterization of the denaturation and renaturation of human plasma vitronectin. II. Investigation into the mechanism of formation of multimers. **J Biol Chem** 1996b; 271:14333-43.

**Anexo I** - Artigo intitulado: *Stress inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion protein that triggers neuroprotection.*

**Anexo II** - Manuscrito intitulado: *Interaction of cellular prion protein and stress inducible protein 1 promotes neurite outgrowth and neuroprotection through distinct signaling pathways.*

**Anexo III** - Manuscrito intitulado: *Cellular prion is a vitronectin receptor supporting axonal growth: redundancy mediated by integrins*

**Anexo IV** - Manuscrito intitulado: *Cellular prion interaction with laminin mediates memory consolidation by PKA and MAPK.*