

**PAPEL DE PRION CELULAR EM MODELOS  
EXPERIMENTAIS DE CONVULSÃO E DETECÇÃO DE  
POLIMORFISMOS DO GENE *PRNP* EM PACIENTES  
PORTADORES DE EPILEPSIAS**

**MICHELE CHRISTINE LANDEMBERGER**

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

**Área de concentração: Oncologia**

**Orientadora: Dra. Vilma Regina Martins**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Roger Walz**

**São Paulo**

**2006**

## FICHA CATALOGRÁFICA

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

Landemberger, Michele Christine

**Papel de prion celular em modelos experimentais de convulsão e  
detecção de polimorfismos do gene *PRNP* em pacientes portadores de  
epilepsias** / Michele Christine Landemberger -- São Paulo, 2006.

99p.

Tese (doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Vilma Regina Martins

Descritores: 1. EPILEPSIA/genética. 2. POLIMORFISMO GENÉTICO. 3.  
PRION. 4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA.

**NÃO EXISTE UM CAMINHO PARA A FELICIDADE**

**A FELICIDADE É O CAMINHO**

**(GANDHI)**

A percepção do desconhecido é a mais bela experiência que podemos viver  
É a verdadeira fonte de toda arte e ciência  
Aquele que nunca sentiu essa emoção, que não consegue mais se deslumbrar,  
Tem os olhos fechados para a vida,  
Os sentidos anestesiados, como num coma.  
Somente nossa intuição mais profunda é capaz de perceber  
Que o impenetrável existe e se manifesta  
Na mais radiante beleza e na mais alta sabedoria.  
(Albert Einstein)

## **DEDICATÓRIA**

**À minha mãe Marly Landemberger**

**Pelo apoio incondicional em todas as etapas de minha vida...**

**Pelo amor, carinho e compreensão sempre...**

**Pelo exemplo de força e perseverança mesmo nos momentos mais  
difíceis de nossa jornada....**

**Pela educação e ensinamentos que me fizeram ser quem eu sou...**

**A você MÃE**

**Muito Obrigada**

**Eu não teria chegado aqui sem você**

## MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS

À **Dra. Vilma Martins** pela oportunidade e confiança em todos estes anos. Por tudo que me ensinou de Ciência e de vida.

Ao meu co-orientador e amigo **Prof. Dr. Roger Walz**, um exemplo para mim.

Ao **Silvio Zanata** pelo grande incentivo e por tudo que me ensinou durante minha IC.

Ao **Prof. Ricardo Brentani** a quem tenho enorme admiração e que me deu o privilégio de discutir muitos experimentos.

Ao **Dr. Luiz Fernando Lima Reis** pela excelência de nossa pós-graduação e pelo grande apoio durante o curso de Bio Mol.

À Diretora do Instituto Ludwig **Dra. Luisa Villa** pelo esforço para manter a nossa filial.

Aos queridos amigos do BCM – **Cinthia e Cleiton** pelo enorme carinho, **Flavio, Tiago e Gabriel** pelas boas risadas, **Mari e Glau** por toda a ajuda científica, **Pamela, Zanith, Camila e Evânia** pelo convívio.

Aos amigos do Lab vizinho: **Fabio, Fabrício, Andréa e Simone**.

As secretárias **Eliane, Aline, Stella e Birgit** por toda a ajuda que me deram.

À amiga **Roseli Ziola** pelo apoio e amizade.

Aos amigos antigos do Ludwig, **Adriana Mercadante, Adriana Freitas, Kil, Regina Nomizo, Angelita, Ana Lucia, Luiz, Mônica e Beatriz Stolf**.

Aos Bioteristas **Sr. João, Éder, Wanderley e Oraci**.

Ao **Carlinhos, Severino e Sueli** pelo apoio técnico.

Aos funcionários da Administração, serviços gerais e manutenção pela eficiência.

Aos demais pesquisadores e colegas do Instituto Ludwig por todos estes maravilhosos anos de convivência.

À Dra. **Karina** pela ajuda com as análises estatísticas.

Ao pessoal da **pós-graduação**.

Ao pessoal da Biblioteca, especialmente a **Suely** pelo suporte com a TESE.

Aos **Drs. Bruce Chesebro e Giovanna Mallucci** pelos animais usados neste trabalho.

Ao **Dr. Américo Sakamoto** pelas amostras de pacientes.

Ao **Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer** e ao **Hospital do Câncer** por todo o suporte técnico durante minha permanência de quase 7 anos.

À **FAPESP**, principal financiadora deste trabalho.

À **Raquelzinha** pela imensa paciência na minha IC.

Aos amigos de RP **Érica e Bruno**.

Ao meu psiquiatra predileto **Ricardo Guarnieri**.

Ao **Iguatemi e Diogo**, pelo exemplo de amor a Ciência.

À **Professora Yukie** por acreditar em mim.

As amigas: **Fernanda, Carine, Wanda e Yonne.**

Ao **Tio Odair** e a **Fátima**

Aos meus queridos avós sempre presentes em meu coração: **Olga e Umberto, Aparecida e Mauro.**

À minha querida **MÃE** que moldou meu caráter e investiu em minha educação.

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

## RESUMO

Landemberger MC. **Papel de prion celular em modelos experimentais de convulsão e detecção de polimorfismos do gene *PRNP* em pacientes portadores de epilepsias.** São Paulo; 2006. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Prion celular (PrP<sup>c</sup>) é uma glicoproteína expressa em neurônios e nas células da glia. É muito conservada entre as espécies e sua função celular tem sido intensamente estudada nas últimas décadas. Nosso grupo mostrou que PrP<sup>c</sup> é capaz de promover adesão e diferenciação neuronais e proteger contra morte celular, através de sua associação a laminina e a STII. No presente trabalho avaliamos a sensibilidade aos agentes convulsivantes ácido cáinico (KA) e pentilenotetrazol (PTZ) em diferentes linhagens de animais *knockout* e transgênicos para PrP<sup>c</sup>. A depleção de PrP<sup>c</sup> leva a uma maior sensibilidade a crises convulsivas induzidas por KA ou por PTZ de maneira independente do *background* genético do animal. A maior sensibilidade foi observada tanto nos animais que não expressam a proteína desde o período embrionário quanto naqueles onde o gene de PrP<sup>c</sup> foi desligado apenas nos neurônios no período pós-natal, indicando que este fenótipo é causado por uma disfunção neuronal e não por um déficit de desenvolvimento. A presença de apenas uma cópia do gene de PrP<sup>c</sup> foi capaz de reverter o baixo limiar para convulsão dos animais *knockout*, enquanto que a superexpressão de PrP<sup>c</sup> levou a uma alta resistência às convulsões induzidas farmacologicamente. Portanto, o limiar de convulsão parece estar diretamente associado com as concentrações celulares de PrP<sup>c</sup>. A plausibilidade biológica destes resultados levou-nos a investigar prevalência de variantes alélicas no gene que codifica PrP<sup>c</sup> (*PRNP*) em pacientes com epilepsias focais e generalizadas primárias e comparar com controles hígidos. Para isso, validamos a padronização da técnica de DHPLC (cromatografia de fase líquida denaturante) que foi capaz de detectar adequadamente a presença de polimorfismos do gene *PRNP* em todas as amostras estudadas. A análise preliminar mostrou que há uma maior frequência do polimorfismo para valina em homozigose no códon 129 entre pacientes do que nos controles. Uma análise detalhada incluindo a

estratificação dos pacientes de acordo com o diagnóstico preciso das síndromes epiléticas bem como a correlação do genótipo e variáveis clínicas e demográficas é um ponto a ser investigado futuramente.

## SUMMARY

Landemberger MC. [The role of cellular prion in models of experimental seizure and evaluation of *PRNP* gene polymorphisms in patients with epilepsy]. São Paulo; 2006. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Cellular prion protein (PrP<sup>c</sup>) is a glycoprotein expressed in neurons and glia. It is highly conserved among species and its function is being consistently studied in the last decades. Our group showed that PrP<sup>c</sup> can promote neuronal adhesion and differentiation and protects against cell death through its association with laminin and STI1. In the present study, we evaluated the sensibility of different *Prnp* knockout and transgenic mice overexpressing PrP<sup>c</sup>, to seizures induced by Kainic acid (KA) and Pentylentetrazol (PTZ). The absence of PrP<sup>c</sup> leads to a higher sensibility to seizures induced by these two drugs despite of the animal genetic background. The elevated sensibility was observed both in the animals that do not express the protein since the embryonic period as well as in those where the PrP<sup>c</sup> was switched off only in the neurons at the post-natal period. Thus, indicating that this phenotype is caused by a neuronal dysfunction and not by a development deficit. The presence of just one *Prnp* allele was capable of reverting de lower seizure threshold observed in *Prnp* knockout mice, whereas PrP<sup>c</sup> overexpression leads to a higher resistance to pharmacological-induced seizures. Therefore, the seizure threshold seems to be directly associated to PrP<sup>c</sup> cellular concentrations. The biological relevance of these results leads us to investigate de presence of *PRNP* allelic variants in patients with different forms of epilepsy. Firstly, we validated the DHPLC (Denaturing High Performance Liquid chromatography) technique that was able to efficiently detect the *PRNP* polymorphisms in all samples that were evaluated. The preliminary analysis demonstrated a higher frequency of valine homozygosity at códon 129 when patients were compared to controls. A more detailed evaluation including patients' diagnosis, clinical and demographic parameters will be performed in order to correlate them with *PRNP* variant alleles.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Esquema de acasalamentos dos animais  $ZPrnp^{0/0}$ ,  $ZPrnp^{+/+}$  e Tg20. 39
- Figura 2** Esquema de acasalamentos dos animais  $EPrnp^{-/-}$ ,  $EPrnp^{+/+}$  e  $EPrnp^{+/-}$  40
- Figura 3** Esquema de acasalamento dos animais nocautes pós-natal. 41
- Figura 4** *Western Blot* para quantificação de PrPc no cérebro das cepas usadas neste estudo. 42
- Figura 5** Curva dose resposta de KA em animais  $ZPrnp^{0/0}$ , C57/BL6J,  $ZPrnp^{+/+}$  e Tg20. 45
- Figura 6** Convulsão induzida por KA nas linhagens  $EPrnp$  e *knockouts* pós-Natal. 49
- Figura 7** Convulsão induzida por PTZ em diferentes linhagens de camundongos *knockout* para *Prnp* ou transgênicos que superexpressam *Prnp*. 56
- Figura 8** Perfil de DHPLC para o protótipo e depleção de um *octarepeat* em *PRNP*. 61
- Figura 9** Perfil de DHPLC das variantes alélicas A117A sil e M129V de *PNRP*. 62
- Figura 10** Perfil de DHPLC das variantes alélicas G124G sil e M129V de *PRNP*. 63
- Figura 11** Perfil de DHPLC da variante alélica N171S de *PRNP*. 64
- Figura 12** Eletroesferogramas do seqüenciamento de *PRNP* na região do códon 129. 64

**Figura 13** Eletroesferogramas do seqüenciamento de *PRNP* na região do códon 171. 66

**Figura 14** Digestão da ORF de *PRNP* com enzimas de restrição para caracterização de variantes alélicas nos códons 117, 129 e 171. 67

## LISTA DE TABELAS

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Tabela 1</b>  | Principais Mutações descritas no gene <i>PRNP</i> .   | 15 |
| <b>Tabela 2</b>  | Principais polimorfismos descritos para o gene <i>PRNP</i> .  | 15 |
| <b>Tabela 3</b>  | Análise estatística dos animais <i>EPrnp</i> <sup>+/+</sup> , <i>EPrnp</i> <sup>-/-</sup> e <i>EPrnp</i> <sup>+/-</sup> machos tratados com KA usando o animal <i>EPrnp</i> <sup>+/+</sup> como parâmetro.    | 47 |
| <b>Tabela 4</b>  | Análise estatística dos animais <i>EPrnp</i> <sup>+/+</sup> , <i>EPrnp</i> <sup>-/-</sup> e <i>EPrnp</i> <sup>+/-</sup> machos tratados com KA usando o animal <i>EPrnp</i> <sup>+/-</sup> como parâmetro.    | 47 |
| <b>Tabela 5</b>  | Análise estatística dos animais <i>EPrnp</i> <sup>+/+</sup> , <i>EPrnp</i> <sup>-/-</sup> e <i>EPrnp</i> <sup>+/-</sup> fêmeas tratadas com KA usando o animal <i>EPrnp</i> <sup>+/+</sup> como parâmetro.    | 47 |
| <b>Tabela 6</b>  | Análise estatística dos animais <i>EPrnp</i> <sup>+/+</sup> , <i>EPrnp</i> <sup>-/-</sup> e <i>EPrnp</i> <sup>+/-</sup> fêmeas tratadas com KA usando o animal <i>EPrnp</i> <sup>+/-</sup> como parâmetro.    | 47 |
| <b>Tabela 7</b>  | Descrição da semiologia das crises convulsivas induzidas pelo tratamento com KA nos camundongos usados neste estudo.  | 53 |
| <b>Tabela 8</b>  | Análise estatística dos animais <i>ZPrnp</i> <sup>+/+</sup> , <i>ZPrnp</i> <sup>0/0</sup> e C57/BL6J machos tratados com PTZ que morreram usando o animal <i>ZPrnp</i> <sup>+/+</sup> como parâmetro.         | 57 |
| <b>Tabela 9</b>  | Análise estatística dos animais <i>ZPrnp</i> <sup>+/+</sup> , <i>ZPrnp</i> <sup>0/0</sup> e C57/BL6J machos tratados com PTZ que morreram usando o animal C57/BL6J como parâmetro.                            | 57 |
| <b>Tabela 10</b> | Análise estatística dos animais <i>EPrnp</i> <sup>+/+</sup> , <i>EPrnp</i> <sup>-/-</sup> e <i>EPrnp</i> <sup>+/-</sup> machos tratados com PTZ que morreram usando o animal <i>EPrnp</i> <sup>+/+</sup> como |    |

|  |    |
|--|----|
| parâmetro.   | 57 |
| <b>Tabela 11</b> Análise estatística dos animais $EPrnp^{+/+}$ , $EPrnp^{-/-}$ e $EPrnp^{+/-}$ machos tratados com PTZ que morreram usando o animal $EPrnp^{+/-}$ como parâmetro.                    | 58 |
| <b>Tabela 12</b> Análise estatística dos animais nocautes pós-natal e seus respectivos controles machos tratados com PTZ que morreram usando o animal Tg46* como parâmetro.                          | 58 |
| <b>Tabela 13</b> Análise estatística dos animais nocautes pós-natal e seus respectivos controles machos tratados com PTZ que morreram usando o animal CreTg37 como parâmetro.                        | 58 |
| <b>Tabela 14</b> Risco Relativo Estimado (RRE) e intervalo de confiança de 95% para epilepsia (n= 270) de acordo com a presença das variantes alélicas do gene <i>PRNP</i> .                         | 70 |
| <b>Tabela 15</b> Risco Relativo Estimado (RRE) e intervalo de confiança de 95% para epilepsia focal (n = 168) de acordo com as variantes alélicas do gene <i>PRNP</i> .                              | 70 |
| <b>Tabela 16</b> Risco Relativo Estimado (RRE) e intervalo de confiança de 95% para epilepsia generalizada idiopática (n = 40) de acordo com a presença das variantes alélicas do gene <i>PRNP</i> . | 71 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                         |  |
|-------------------------|--|
| <b>BSE</b>              | Encefalopatia Espongiforme Bovina                              |
| <b>CJD</b>              | Doença de Creutzfeld-Jakob                                     |
| <b>CWD</b>              | Doença Crônica Debilitante                                     |
| <b>DHPLC</b>            | Cromatografia Líquida de Fase Reversa Denaturante              |
| <b>DNA</b>              | Ácido Desoxirribonucléico                                      |
| <b>EDTA</b>             | Ácido Etilenodiamino Tetra Acético                             |
| <b>GABA<sub>A</sub></b> | Ácido $\gamma$ -aminobutírico tipo A                           |
| <b>GPI</b>              | Glicosilfosfatidilinositol                                     |
| <b>GSS</b>              | Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker                     |
| <b>IFF</b>              | Insônia Familiar Fatal   |
| <b>KA</b>               | Ácido Caínico  |
| <b>kDa</b>              | KiloDalton   |
| <b>LN</b>               | Laminina   |
| <b>MAPK</b>             | Preoteína Quinase Ativada por Mitógeno                         |
| <b>Min</b>              | Minutos  |
| <b>Neo</b>              | Neomicina  |
| <b>NMR</b>              | Ressonância Nuclear Magnética                                  |
| <b>pb</b>               | Pares de Bases   |
| <b>PCR</b>              | Reação em Cadeia de Polimerase                                 |
| <b>PI3K</b>             | Fosfatidil-Inositol-3 Quinase                                  |
| <b>PKA</b>              | Proteína Quinase dependente de AMP cíclico                     |
| <b><i>Prnp</i></b>      | Gene que codifica para a proteína Prion Celular em camundongos |

|                         |  |
|-------------------------|--|
| <b><i>PRNP</i></b>      | Gene que codifica para a proteína Prion Celular em humanos |
| <b>PrP<sup>c</sup></b>  | Proteína Prion Celular                                     |
| <b>PrP<sup>sc</sup></b> | Proteína Prion Scrapie                                     |
| <b>PTZ</b>              | Pentilenotetrazol  |
| <b>RB</b>               | Retinoblastoma   |
| <b>RRE</b>              | Razão de Risco Estimado                                    |
| <b>SDS</b>              | Dodecil Sulfato de Sódio                                   |
| <b>SDS</b>              | PAGE-Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS         |
| <b>STI 1</b>            | Stress Inducible Protein 1                                 |
| <b>TSE</b>              | Encefalopatias Espngiformes Transmissíveis                 |
| <b>vCJD</b>             | Nova variante da Doença de Creutzfeld-Jakob                |

# ÍNDICE

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1      | Prions  | 1         |
| 1.2      | Prion Celular   | 4         |
| 1.3      | Funções Celulares de PrP <sup>c</sup>   | 5         |
| 1.4      | PrP <sup>c</sup> e alterações na excitabilidade neuronal e no limiar de convulsão     | 8         |
| 1.5      | Epilepsias  | 11        |
| 1.6      | Variantes alélicas do gene de PrP <sup>c</sup>  | 14        |
| <br>     |   |           |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS</b>  | <b>19</b> |
| <br>     |   |           |
| <b>3</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b>   | <b>20</b> |
| 3.1      | Modelos animais   | 20        |
| 3.2      | Genotipagem dos camundongos <i>knockouts</i> e transgênicos                           | 22        |
| 3.3      | Modelos experimentais de convulsão  | 24        |
| 3.3.1    | Modelo de ácido cáínico   | 25        |
| 3.3.2    | Modelo de pentilenotetrazol   | 25        |
| 3.4      | Escala de Racine  | 26        |
| 3.5      | Análise estatística   | 26        |
| 3.6      | Quantificação da expressão de PrP <sup>c</sup> por imunodeteção em extratos cerebrais | 27        |
| 3.7      | Humanos   | 28        |
| 3.7.1    | Casos: Pacientes portadores de epilepsia  | 28        |
| 3.7.2    | Controles   | 28        |
| 3.8      | Coleta de Material Biológico  | 29        |
| 3.9      | Extração de DNA de Leucócitos   | 29        |
| 3.10     | Seqüenciamento do gene <i>PRNP</i>  | 30        |
| 3.10.1   | Reação de amplificação por PCR  | 30        |
| 3.10.2   | Seqüenciamento de <i>PRNP</i>   | 32        |
| 3.11     | DHPLC (Cromatografia líquida de fase reversa denaturante)                             | 33        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 3.12     | Identificação de polimorfismos/mutações no gene de <i>PRNP</i> por digestão do DNA com Endonucleases                                    | 35        |
| 3.13     | Análise Estatística   | 36        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS I – ANIMAIS</b>   | <b>37</b> |
| 4.1      | Avaliação da presença do gene <i>Prnp</i> e expressão de PrP <sup>c</sup> nos animais do estudo   | 37        |
| 4.2      | Modelo de convulsão induzida quimicamente por ácido caínico em camundongos  | 43        |
| 4.3      | Descrição da semiologia das crises convulsivas  | 50        |
| 4.4      | Modelo de convulsão induzida quimicamente por pentilenotetrazol em camundongos  | 53        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS II – HUMANOS</b>  | <b>59</b> |
| 5.1      | Padronização da técnica de DHPLC (cromatografia líquida de fase reversa denaturante) para detecção de polimorfismos no gene <i>PRNP</i> | 59        |
| 5.2      | Avaliação de polimorfismos no gene <i>PRNP</i> em pacientes portadores de síndromes epiléticas e em indivíduos normais                  | 68        |
| <b>6</b> | <b>DISCUSSÃO I</b>  | <b>72</b> |
| <b>7</b> | <b>DISCUSSÃO II</b>   | <b>79</b> |
| <b>8</b> | <b>CONCLUSÕES</b>   | <b>84</b> |
| <b>9</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>   | <b>85</b> |

## **ANEXO**

**Anexo 1** Artigo publicado na revista **J Neurosci Methods**, intitulado High capacity and low cost detection of prion protein gene variant alleles by denaturing HPLC.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 PRIONS

As encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSE) são um grupo de doenças neurodegenerativas fatais que atingem tanto humanos quanto animais. Entre as formas humanas estão a Doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), a Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), a Insônia Familiar Fatal (PRUSINER 1993), além do Kuru, doença infecciosa associada a rituais canibalísticos praticados por nativos da Papua Nova Guiné que mantinham a tradição de ingerir vísceras de seus antepassados mortos (GAJDUSEK 1977). As desordens neurológicas que atingem os animais são o *scrapie* em gado ovino, a Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE) em gado bovino e a doença crônica debilitante (chronic wasting disease, CWD) em cervídeos. A BSE foi a TSE mais alarmante durante as décadas de 80 e 90, pois atingiu grande parte do gado do Reino Unido e foi responsável pelo surgimento de uma nova doença no homem, denominada nova variante de CJD (vCJD), ocasionada à ingestão de derivados de carne contaminada (AGUZZI 1996; BUTLER 1996). Isso transformou as doenças priônicas em um grande problema econômico e de saúde pública mundial.

As TSE são caracterizadas por demência progressiva, ataxia, associada por degeneração espongiforme do cérebro com eventual deposição de material amilóide no sistema nervoso central (revisado por MALLUCCI e COLLINGE 2004). Embora a etiologia destas doenças tenha permanecido obscura durante muitos anos, sendo

atribuída a uma infecção por vírus de ação lenta ou viróides (CHO 1976), sabe-se hoje que elas são causadas pelo acúmulo intracerebral progressivo da proteína extremamente insolúvel conhecida como prion ou PrP<sup>Sc</sup> (Revisado por PRUSINER 1991, 1997 e 1998).

O termo prion foi designado em 1982 por Stanley Prusiner e deriva da expressão em inglês de *proteinaceous infectious only*. Esta foi proposta após muitos anos de tentativas de isolamento do agente infeccioso a partir de amostras de cérebros infectados com TSE. A idéia causou uma grande polêmica na comunidade científica, por quebrar o dogma central da biologia molecular, onde a replicação de um organismo, neste caso um agente infeccioso, dependia de ácidos nucleicos. Entretanto, o agente infeccioso responsável pelas TSEs apresentava características físico-químicas incomuns àquelas dos patógenos conhecidos até então, como por exemplo, a resistência a altas temperaturas e a desnaturação por formaldeído. Diversos métodos conhecidos por solubilizar partículas infecciosas foram ineficientes, tais como o uso de detergentes, de sais, alterações de pH e sonicação. (MCKINLEY et al. 1983, 1986; BOLTON et al. 1984). Outros métodos físico-químicos, eficientes em alterar ácidos nucleicos, tais como radiação ultravioleta, ação de nucleases e dietil pirocarbonato, também foram incapazes de alterar a capacidade infecciosa deste agente (revisado por PRUSINER 1992). Entretanto, métodos que desnaturavam proteínas, como altas temperaturas, uréia e detergentes catiônicos como o Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) foram eficientes tanto na solubilização dessas partículas como na diminuição de sua capacidade infectante (PRUSINER 1982 e revisado por PRUSINER 1997).

Estudos demonstraram que cérebros de animais não infectados apresentavam uma forma similar da proteína infecciosa (OESCH et al. 1985). Esta proteína foi denominada de proteína prion celular ( $\text{PrP}^c$ ), enquanto a infecciosa depositada no cérebro dos animais infectados foi designada de proteína prion scrapie ( $\text{PrP}^{\text{sc}}$ ). O uso de espectroscopia de ressonância nuclear magnética (NMR) determinou a presença de diferenças nas estruturas secundárias das duas proteínas, indicando que no processo infeccioso ocorrem alterações conformacionais que levam a conversão de estrutura de  $\alpha$  hélice presente principalmente em  $\text{PrP}^c$  para folha  $\beta$ -pregueada, abundante em  $\text{PrP}^{\text{sc}}$  (GASSET et al. 1992).

Desta forma, PRUSINER (1988) supôs que a partícula infecciosa responsável pelas TSEs era composta unicamente por proteína,  $\text{PrP}^{\text{sc}}$ , sendo que, a propagação do agente infeccioso ocorreria pela capacidade de  $\text{PrP}^{\text{sc}}$  em promover a conversão da estrutura de sua isoforma celular  $\text{PrP}^c$  gerando exponencialmente novas moléculas infecciosas.

A geração de camundongos que não expressam o gene de  $\text{PrP}^c$  foi crucial para a comprovação de que  $\text{PrP}^c$  é absolutamente necessária para o estabelecimento da doença, uma vez que estes animais são totalmente resistentes à infecção (BÜELER et al. 1992; SAKAGUCHI et al. 1995; MOORE et al. 1999; MONTRASIO et al. 2001; MALLUCCI et al. 2002).

A proposta de Prusiner ganhou um suporte experimental importante em ensaios recentes onde foi possível amplificar a proteína infecciosa *in vitro* a partir de extratos de cérebro ou de proteína recombinante e produzir infecção *in vivo* (LEGNAME et al. 2004; CASTILLA et al. 2005).

Admite-se que as doenças priônicas são causadas por ganho de função da proteína prion celular que adquire novas características, em particular a neurotoxicidade, ao se transformar em prion. Entretanto, é plausível pensar que a patogênese destas doenças pode também estar relacionada à perda de função de PrP<sup>c</sup> (SAMAIA e BRENTANI 1998; MARTINS et al. 2002; HETZ et al. 2003; SOTO e CASTILLA 2004). Desta forma tornou-se essencial buscar um maior entendimento de PrP<sup>c</sup> e sua relevância biológica.

#### 1.4 PRION CELULAR

Prion celular ou PrP<sup>c</sup> é uma glicoproteína abundantemente encontrada em neurônios e glia, extremamente conservada entre as espécies o que sugere que tenha uma função celular importante (PRUSINER 1991).

Os genes que codificam a proteína prion celular do homem, hamster, camundongo, rato, cabra e galinha já foram seqüenciados há pelo menos uma década (KRETZSCHMAR et al. 1986; BASLER et al. 1986; LOCHT et al. 1986; WESTAWAY et al. 1987; LIAO et al. 1987; HARRIS et al. 1991). O gene de PrP<sup>c</sup> humano é denominado de *PRNP* e o de camundongo *Prnp*. Todos codificam proteínas de aproximadamente 250 aminoácidos, e 27kDa com um peptídeo sinalizador de 22 aminoácidos na extremidade amino-terminal e um peptídeo hidrofóbico de 23 aminoácidos na porção carboxi-terminal.

PrP<sup>c</sup> é sintetizado no retículo endoplasmático rugoso, encaminhado para o Golgi e transportado até a superfície celular (revisado por HARRIS 1999). No retículo endoplasmático rugoso o peptídeo sinal N-terminal (resíduos 1-22) e o

segmento hidrofóbico C-terminal (resíduos 231-253) são clivados, seguindo-se a adição da âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (STAHL et al. 1987).

PrP<sup>c</sup> sofre ainda outras modificações pós-traducionais como adição de oligossacarídeos N-ligados em regiões consenso e formação de uma ponte de dissulfeto intramolecular entre os resíduos de cisteína 179 e 214. (CAUGHEY et al. 1989; RUDD et al. 2002).

Na membrana plasmática, foi demonstrado que PrP<sup>c</sup> encontra-se em microdomínios ricos em colesterol, denominados de *rafts* (KESHET et al. 2000). Entretanto, PrP<sup>c</sup> pode também ser encontrado em outras organelas celulares como o complexo de Golgi e endossomos de reciclagem (LEE et al. 2001) ou no compartimento citoplasmático uma vez que esta sofre ubiquitinação e degradação pelo sistema de proteassoma (MA e LINDQUIST 2001).

### 1.3 FUNÇÕES CELULARES DE PRP<sup>C</sup>

Uma importante propriedade de PrP<sup>c</sup> é a sua capacidade de ligar íons Cu<sup>2+</sup> através de 4 resíduos de histidina contidos em 4 ou 5 regiões repetidas, de oito aminoácidos cada, denominada de *octarepeat*, localizada na porção amino-terminal da molécula compreendendo os aminoácidos 51 a 90 em humanos (BROWN et al. 1997a). Animais que tiveram o gene que codifica PrP<sup>c</sup> removido, possuem 20 vezes menos cobre no cérebro que animais normais, indicando que a associação é fisiológica (BROWN et al. 1997a). Além disso, células de cerebelo de animais que não expressam PrP<sup>c</sup> são mais sensíveis a radicais livres que células normais (BROWN et al. 1997b). Uma vez que a ligação a cobre é importante para a atividade

catalítica de muitas enzimas envolvidas com o estresse oxidativo, incluindo a superóxido dismutase (BROWN et al. 1999), foi sugerido que PrP<sup>c</sup> possa atuar como um depósito de íons cobre destinado à ligação a enzimas que previnem o estresse oxidativo (BROWN et al. 1997a; BROWN et al. 1999).

Dados da literatura sugerem ainda que PrP<sup>c</sup> poderia ser um sensor de estresse celular que desencadearia um processo de sinalização ativando os sistemas antioxidantes e as defesas celulares (RACHIDI et al. 2003). PrP<sup>c</sup> participa ainda na modulação da ativação de plasminogênio tecidual de maneira dependente de íons cobre (ELLIS et al. 2002).

A caracterização de ligantes celulares de PrP<sup>c</sup> tem proporcionado um avanço importante na determinação do seu papel biológico. Foi demonstrado que o receptor de laminina de 37/67KDa interage com PrP<sup>c</sup> e participa de sua internalização (GAUCZYNSKI et al. 2001). Além disso, o receptor de laminina é requerido para a propagação de PrP<sup>sc</sup> em células neuronais infectadas com scrapie (LEUCHT et al. 2003). PrP<sup>c</sup> interage ainda com plasminogênio (ELLIS et al. 2002) e com caseína quinase (MEGGIO et al. 2000) modulando suas atividades. Diversas moléculas da matriz extracelular também já foram descritas como ligantes de PrP<sup>c</sup>, entre elas os glicosaminoglicanos (GONZALEZ-IGLESIAS et al. 2002), os proteoglicanos (KESHET et al. 2000), a heparina (WARNER et al. 2002) e a molécula de adesão celular neural (NCAM) (SCHMITT-ULMS et al. 2001).

Foi descrito também o envolvimento de PrP<sup>c</sup> no estímulo de vias de sinalização, como as vias fosfatidil-inositol-3 quinase (PI3K), proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA) e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (CHEN et al. 2003).

Nosso grupo demonstrou que PrP<sup>c</sup> pode se ligar a três outras proteínas: STII (stress inducible protein 1), Vitronectina e Laminina (LN). A ligação entre PrP<sup>c</sup> e STII é específica e de alta afinidade no sítio que compreende os aminoácidos 113-128 da molécula de PrP<sup>c</sup> e nos resíduos 230-245 de STII. A interação entre as duas proteínas desencadeia sinais de proteção dependentes da via de PKA em neurônios retinianos (ZANATA et al. 2002; CHIARINI et al. 2002), promove crescimento neurítico, além de proteger neurônios hipocâmpais da morte celular induzida por estaurosporina (LOPES et al. 2005).

PrP<sup>c</sup> interage com vitronectina através de uma ligação específica e de alta afinidade que está mapeada entre os resíduos 105 a 119 da molécula de PrP<sup>c</sup> e nos resíduos 309-322 na molécula de vitronectina. Esta interação promove crescimento axonal de gânglios da raiz dorsal e diferenciação de neurônios hipocâmpais (dados enviados para publicação).

Em 2000 demonstramos a interação de alta afinidade e especificidade entre PrP<sup>c</sup> e a região carboxi-terminal da cadeia  $\gamma$ 1 de LN, mais especificamente o peptídeo RNIAEIIKDI. Esta associação é responsável por mediar a formação e manutenção de neuritos “in vitro” (GRANER et al, 2000 a e b). Além disso, mostramos que esta interação é importante para a consolidação da memória (COITINHO et al. 2006).

Laminina é uma molécula em forma de cruz composta por três cadeias polipeptídicas:  $\alpha$  de 400 kDa (isoformas 1 a 5),  $\beta$  de 210 kDa (isoformas 1 a 3) e  $\gamma$  de 200 kDa (isoformas 1 a 3). Essa glicoproteína possui múltiplos domínios e é um dos principais componentes não colagênicos das membranas basais, tais como as

alinhadas ao epitélio, as que circundam os vasos e nervos e as que estão localizados sob a pia máter do cérebro (TIMPL e DZIADEK 1986).

Sabe-se ainda que LN é uma molécula vital nos processos de adesão e diferenciação celulares em particular os que envolvem a neuritogênese (BECK et al. 1990). Esta função da molécula é determinada por domínios específicos, entre eles o decapeptídeo da cadeia  $\gamma$  1 RNIAEIIKDI (LIESI et al. 1989), que até a determinação de sua interação com PrP<sup>c</sup>, pelo nosso grupo (MERCADANTE 2000; GRANER et al. 2000a), não se conhecia o ligante celular que se associava a esta região da LN.

A LN foi descrita ainda como alvo de degradação por ativador de plasminogênio que é induzido por ácido caínico, um análogo de glutamato, que por sua vez induz processos epileptogênicos e morte neuronal. (CHEN e STRICHLAND 1997). Os autores argumentam que não se conhecia o receptor celular de laminina que estava implicado neste processo, mas que este não parecia ser uma das integrinas, receptores clássicos de proteínas da matriz extracelular (CHEN e STRICHLAND 1997).

#### **1.4 PRP<sup>C</sup> E ALTERAÇÕES NA EXCITABILIDADE NEURONAL E NO LIMIAR DE CONVULSÃO**

Experimentos com camundongos *knockouts* para PrP<sup>c</sup>, demonstraram que esses animais têm desenvolvimento e comportamento aparentemente normais (BÜELER et al. 1992; MANSON et al. 1994). Foi também descrito que eles apresentam um nível de ansiedade normal, porém com um discreto aumento na

atividade locomotora durante a exploração de um campo aberto (ROESLER et al. 1999).

Estudos eletrofisiológicos demonstraram uma redução do bloqueio na inibição rápida do receptor GABA<sub>A</sub> (ácido  $\gamma$ -aminobutírico tipo A) na linhagem ZrchI (BÜELER et al. 1992) de animais *knockouts* de PrP<sup>c</sup>. Foi observada ainda uma diminuição na potenciação de longo prazo (LTP) no hipocampo em duas linhagens de camundongos que não expressam PrP<sup>c</sup>, Zrch I e Npu (COLLINGE et al. 1994; MANSON et al. 1994; WHITTINGTON et al. 1995; HERMS et al. 2000) além de um distúrbio nas correntes de K<sup>+</sup> ativadas por Ca<sup>2+</sup>, tanto em neurônios hipocámpais como em células de Purkinje no cerebelo (COLLING et al. 1996; HERMS et al. 2000). Da mesma forma, animais *knockouts* condicionais onde a expressão de PrP<sup>c</sup> é abolida apenas em neurônios após a décima segunda semana de vida pós-natal, apresentam uma diminuição dos potenciais de pós-hiperpolarização em células da região CA1 do hipocampo (MALLUCCI et al. 2002). Estes últimos experimentos são particularmente importantes, pois demonstram que uma disfunção neuronal ao invés de um déficit de desenvolvimento está presente nestes animais.

As alterações descritas previamente são consistentes com os achados do nosso grupo que mostram que animais *knockouts* da linhagem Zrch I apresentam maior suscetibilidade à convulsão induzida por três agentes, ácido caínico, pentilenotretazol e pilocarpina, que têm mecanismos de ação distintos (WALZ et al. 1999). Interessantemente, como já comentado previamente, o ácido caínico foi descrito por mediar a ativação de plasmina que tem a laminina cerebral como substrato (CHEN e STRICKLAND 1997).

Entretanto, resultados obtidos com modelos animais onde genes são removidos ou adicionados ainda são muito discutíveis. Alterações detectadas nestes camundongos podem ser causadas pelo *background* genético do animal, manipulação genética ou ainda por mecanismos compensatórios. O animal *knockout* de PrP<sup>c</sup> denominado ZrchI (BÜELER et al. 1992) que foi usado no nosso estudo anterior (WALZ et al. 1999) é passível de críticas importantes. Primeiro, porque possui um *background* misto das cepas 129Sv e C57/BL6J e segundo, este animal é um *knockout* constitutivo, portanto, a ausência de expressão deste gene durante a embriogênese pode ter levado ao aparecimento de mecanismos compensatórios. Desta forma, é de fundamental importância que estas diferenças no limiar de convulsão previamente mostrados por nós no animal ZrchI possam ser reproduzidas em outras linhagens de animais *knockouts* constitutivos e condicionais para PrP<sup>c</sup>.

É ainda notável que os animais *knockouts* para PrP<sup>c</sup> apresentam modificações na reorganização sináptica das fibras musgosas do hipocampo (COLLING et al. 1996), semelhantes em parte, ao observado no hipocampo de pacientes portadores de epilepsia de lobo temporal mesial relacionada à esclerose hipocampal (ELTM-EH) (MATHERN et al. 1995).

Portanto, estes dados apontam que PrP<sup>c</sup> pode estar envolvido no controle da excitabilidade neuronal e portanto no limiar de convulsão. Além disso, é relevante pensar que modificações na atividade funcional de PrP<sup>c</sup> causada pela presença de certos polimorfismos possam participar nos processos associados à epilepsia.

## 1.5 EPILEPSIAS

As epilepsias são doenças crônicas e representam um grave problema de saúde pública com uma prevalência em torno de 5 a cada 1.000 habitantes nos países desenvolvidos e superior nos países em desenvolvimento. Embora as razões para a maior prevalência das epilepsias em países em desenvolvimento não estejam claramente determinadas, parece provável que essa diferença esteja relacionada à assistência pré-natal e maternal insuficiente, aos traumas de parto, maior número de infecções e parasitoses do sistema nervoso central e traumatismos cranianos. Além de afetar pessoas de todas as idades e raças (HAUSER et al. 1998), as epilepsias representam a segunda maior causa de incapacidade mental, principalmente em pacientes jovens (KALE 1997).

Muitas patologias adquiridas são fatores de risco para epilepsia, incluindo traumatismos, infecções, tumores cerebrais e crises convulsivas prolongadas na infância (ENGEL 1996). Acredita-se que, no caso das epilepsias secundárias a lesões identificáveis (sintomáticas), após a injúria ocorram diversos mecanismos adaptativos envolvendo neuroplasticidade, que em última análise podem contribuir para o processo de epileptogênese. Embora alterações genéticas tenham sido descritas em formas familiares de epilepsia (revisado por STEINLEIN 2001), na maioria das vezes elas são causadas por uma interação de fatores genéticos e ambientais (revisado por BERKOVIC e JACKSON 2000). Além disso, estudos experimentais sugerem que o processo de epileptogênese seja decorrente de modificações herdadas ou adquiridas na fisiologia intrínseca dos neurônios e da rede neural da qual fazem parte (ENGEL e PEDLEY 1998).

De acordo com a etiologia, a Liga Internacional de Combate a Epilepsia classifica as epilepsias em (ENGEL e PEDLEY 1998):

**1- Primárias, idiopáticas ou essenciais:** são aquelas que não estão associadas a lesões cerebrais ou anormalidades neurológicas. Os fatores genéticos são bastante importantes neste tipo de epilepsias;

**2- Secundárias, sintomáticas ou adquiridas:** São epilepsias em que há uma causa identificável e estão sempre associadas a lesões;

**3- Criptogênicas:** São epilepsias secundárias, também estão associadas a lesões, porém não se consegue identificar a etiologia.

Nas epilepsias idiopáticas, entende-se que o processo de “epileptogênese” depende principalmente de expressão e repressão de genes ao longo da formação e desenvolvimento do cérebro. Nas epilepsias sintomáticas, o processo de epileptogênese depende do tipo de insulto, da região cerebral afetada, e da resposta tecidual, sendo esta última dependente das duas primeiras, das características genéticas do indivíduo e da faixa etária na qual ocorreu o primeiro insulto ou evento.

Nos casos de epilepsias secundárias e criptogênicas, os fatores genéticos possuem mecanismos complexos. No entanto, acredita-se, como já comentado, que em praticamente todos os casos de epilepsia há uma relativa interação entre fatores adquiridos e predisposição genética. (ENGEL e PEDLEY 1998).

Nas epilepsias focais existe uma região cortical ou sub-cortical (hipocampo, amígdala) que é capaz de promover uma atividade hiperexcitável e hipsincrônica anormal. Esta região é denominada de zona epileptigênica. Esta atividade anormal pode propagar-se ao longo do córtex levando em última análise a uma crise generalizada. Em termos clínicos as crises podem ser focais (também chamadas de

parciais) seguidas ou não de generalização secundária. As manifestações clínicas sejam elas sinais ou sintomas, vão depender de qual região está sendo envolvida pela crise naquele determinado momento (WALZ et al. 2003).

No caso das epilepsias generalizadas primárias, a atividade epileptiforme intercrítica (fora da crise) ou mesmo a atividade ictal (crise propriamente dita), se manifesta simultaneamente em toda a superfície cortical. Eletroencefalograficamente não é possível detectar um início focal e uma eventual propagação como no caso das epilepsias focais. Nestes casos, a atividade epileptiforme é captada simultaneamente em toda a superfície cortical e resulta de um mecanismo de sincronização tálamo-cortical. Não está completamente elucidado se esta manifestação se dá por um gatilho cortical com rápida propagação para o tálamo ou se é iniciada diretamente no tálamo. Clinicamente o protótipo das epilepsias generalizadas primárias são as crises de ausência, nas quais o paciente tem uma diminuição ou perda completa da reatividade ao meio, com duração de segundos, seguida de restabelecimento imediato da consciência. Durante este período observa-se uma atividade eletroencefalográfica generalizada (ambos os hemisférios) e síncrona, com morfologia e frequência específicas (WALZ et al. 2003).

Assim, em termos gerais as epilepsias podem ser classificadas do ponto de vista clínico e eletroencefalográfico em dois grandes grupos. As focais, nas quais a atividade ictal se inicia em uma região do córtex, e as generalizadas, onde a atividade epileptiforme é bilateral e síncrona. Existem diferentes tipos de epilepsias focais e generalizadas, cujos aspectos clínicos, demográficos, prognóstico e etiologia são variáveis (WALZ et al. 2003).

## 1.6 VARIANTES ALÉLICAS DO GENE DE PRP<sup>C</sup>

O gene de PrP<sup>c</sup> em humanos (PRNP) está localizado no braço curto do cromossomo 20 e é composto por 2 exons, sendo que a fase aberta de leitura está inteira contida no segundo exon que é composto por 737 pares de base. Existem atualmente descritas na literatura 55 mutações no gene *PRNP* associadas a doenças priônicas hereditárias (Tabela 1) e 16 polimorfismos identificados em humanos (Tabela 2). Isto inclui 24 mutações “missenses” (tradução da proteína com troca de aminoácidos), 27 mutações por inserção, 2 mutações por deleção, 2 mutações “nonsense” (tradução de proteína truncada), 12 polimorfismos que não resultam em modificação do aminoácido e 4 que resultam em modificação do aminoácido (PARCHI et al. 1996; PRUSINER 1997; JACKSON e COLLINGE 2001).

O códon 129 de PRNP é polimórfico na população humana sendo que cerca de 43% do indivíduos são homoziotos para metionina (M129M), 49% são heterozigotos metionina valina (M129V) e 8% são homozigotos para valina V129V na população caucasiana (ZIMMERMANN et al. 1999). Na população japonesa e chinesa a distribuição é bem diferente, sendo 92% M129M, 8% M129V e 0% V129V nos japoneses e nos chineses 97% M129M, 3% M129V e 0% V129V (DOH-URA et al. 1991; TSAI et al. 2001).

**Tabela 1** - Principais Mutações descritas no gene *PRNP*.

| Códon | Mutação              | Patologia associada | Referência                               |
|-------|----------------------|---------------------|--|
| 51-91 | Inserção 48 a 216 pb | CJD /GSS            | GOLDFARB et al. 1993                     |
| 102   | Pro→Leu              | GSS                 | HSIAO et al. 1989                        |
| 105   | Pro→Leu              | GSS                 | YAMADA et al. 1993                       |
| 117   | Ala→Val              | GSS                 | DOH-URA et al. 1989                      |
| 145   | Tyr→STOP             | GSS                 | GHETTI et al. 1996                       |
| 171   | Asn→Ser              | Esquizofrenia       | SAMAIA et al. 1997                       |
| 178   | Asp→Asn              | IFF/CJD             | GOLDFARB et al. 1991, MEDORI et al. 1992 |
| 180   | Val→Ile              | CJD                 | KITAMOTO et al. 1993                     |
| 183   | Thr→Ala              | CJD                 | NITRINI R et al. 1997                    |
| 187   | His→Arg              | GSS                 | CERVENAKOVA et al. 1999                  |
| 188   | Trh→Lys              | Demência            | FINCKH et al. 2000                       |
| 196   | Glu→Lys              | CJD                 | PEOC'H et al. 2000                       |
| 198   | Phe→Ser              | GSS                 | HSIAO et al. 1992                        |
| 200   | Glu→Lys              | CJD                 | GOLDFARB et al. 1990                     |
| 202   | Asp→Asn              | GSS                 | PICCARDO et al. 1998                     |
| 208   | Arg→His              | CJD                 | MASTRIANNI et al. 1996                   |
| 210   | Val→Ile              | CJD                 | POCCHIARI et al. 1993                    |
| 211   | Glu →GLN             | CJD                 | PEOC'H et al. 2000                       |
| 212   | GLN→Pro              | GSS                 | PICCARDO et al. 1998                     |
| 217   | GLN→Arg              | GSS                 | HSIAO et al. 1989                        |
| 232   | Met→Arg              | CJD                 | KITAMOTO et al. 1993                     |

**Tabela 2** - Principais polimorfismos descritos para o gene *PRNP*.

| Códon | Polimorfismo            | Frequências na população   | Referência              |
|-------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|
| 51-91 | Depleção 24pb           | 9%                         | PERRY et al. 1995       |
| 51-91 | Inserção 24pb           | ~1%                        | CERVENAKOVA et al. 1994 |
| 114   | Depleção                | 45%                        | SALVATORE et al. 1994   |
| 117   | Silenciosa <sup>#</sup> | 5.4%                       | HSIAO et al. 1989       |
| 124   | Silenciosa <sup>#</sup> | ~1%                        | PRUSINER et al. 1997    |
| 129   | Met→Val                 | M/V 50%; V/V 10%           | DOH-URA et al. 1989     |
| 171   | Asn → Ser               | 7 a 10% da população negra | MEAD et al. 2003        |
| 188   | Thr→Arg                 | ~1%                        | WINDL et al. 1999       |
| 219   | Glu→Lys                 | 12%                        | KITAMOTO et al. 1993    |

As frequências constantes são as descritas na literatura (WINDLT et al. 1999; LAMPE et al. 1999). As referências são as dos autores que citaram esses polimorfismos pela primeira vez. Alterações silenciosas também já foram descritas em pacientes e populações controle (<sup>#</sup>).

A presença de metionina neste códon está associada a maior susceptibilidade a doenças de prion esporádicas bem como a nova variante de CJD (WADSWORTH et al. 2004). O aminoácido presente neste códon é ainda determinante na distinção de que tipo de doença hereditária de prion está associada à mutação no códon 178. A presença de metionina no códon 129 no mesmo alelo da mutação em 178 causa Insônia Familiar Fatal enquanto que valina nesta posição leva a um quadro de CJD (GOLDFARB et al. 1992). Portanto, o códon 129 parece ter um papel primordial na estrutura da molécula de PrP<sup>c</sup> e estudos mostram uma maior propensão a formação de folha  $\beta$ -pregueada quando metionina está nesta posição (PETCHANIKOW et al. 2001). Portanto, é plausível admitir que a presença de um ou outro aminoácido neste códon possa interferir não só com a patologia das doenças de prion, mas também com a função fisiológica de PrP<sup>c</sup>.

Interessantemente, variantes alélicas do códon 129 já foram associadas com melhor desempenho cognitivo em pacientes idosos, em indivíduos com síndrome de Down, com doença de Alzheimer (RUJESCU et al. 2003; DEL BO et al. 2003 e 2006; GACIA et al. 2006).

Além disso, este polimorfismo pode influenciar o aparecimento de sintomas neurológicos e hepáticos na Doença de Wilson (GRUBENBECHER et al. 2006). Alterações na frequência alélica do códon 129 também já foram correlacionadas com quadros de afasia primária progressiva (LI et al. 2005) e com as medidas neuropsicológicas e psicopatológicas de desordens psiquiátricas (MARTORELL et al. 2006). Uma melhor memória de longa duração foi ainda associada com o alelo 129 metionina em adultos jovens normais (PAPASSOTIROPOULOS et al. 2005).

Um outro polimorfismo no gene *PRNP* está presente na região conhecida por *octarepeats*, que contém o domínio de interação ao íon cobre, este domínio de oito aminoácidos está repetido cinco vezes em cerca de 90% da população humana, sendo que os restantes 10% apresentam apenas 4 repetições (PERRY et al. 1995). A presença de três ou mais que 7 *octarepeats* foi associada a doenças de prion (GOLDFARB et al. 1993). Entretanto, não se sabe se este polimorfismo (4 ou 5 repetições) pode alterar as funções normais de PrP<sup>c</sup>.

Em 1997 SAMAIA et al. mostraram uma possível relação entre uma variante no códon 171 de *PRNP* e uma forma atípica de esquizofrenia familiar (SAMAIA et al. 1997), sugerindo que outras doenças neurológicas de causa desconhecida podem estar associadas à perda total ou parcial da função de PrP<sup>c</sup>. Este polimorfismo foi ainda encontrado em algumas formas de epilepsia (WALZ et al. 2003, 2004), entretanto estes dados não foram reproduzidos por outro grupo (CAVALLERI et al. 2005). O códon 171 encontra-se próximo ao sítio de ligação de PrP<sup>c</sup> a laminina (COITINHO et al. 2006) e simulações estruturais mostram que a mudança do aminoácido nesta posição altera a hidrofobicidade dos aminoácidos vizinhos. Nós especulamos que o polimorfismo descrito nesta região, onde uma asparagina é trocada por uma serina (N171S), possa modificar a interação PrP<sup>c</sup>-laminina e em última análise favorecer o processo de epileptogênese. Embora não se possa excluir a possibilidade de co-segregação de outros genes não estudados nestes trabalhos (WALZ et al. 2003 e 2004), a hipótese do envolvimento do PrP<sup>c</sup> no processo de epileptogênese em humanos é biologicamente plausível considerando as diversas alterações vistas nos animais *knockouts* para esta proteína.

Desta forma, o presente trabalho pretende primeiramente tornar mais robusta a plausibilidade biológica do papel de PrP<sup>c</sup> sobre a sensibilidade a convulsões. Para isso usaremos modelos farmacológicos de convulsão que serão testados em diferentes linhagens de camundongos onde a expressão de PrP<sup>c</sup> é abolida ou contrariamente onde ela é muito alta. Com intuito de descartar falsas respostas ocasionadas pela presença de algum tipo específico de *background* genético ou ainda de mecanismos compensatórios estabelecidos durante embriogênese, usaremos animais com diferentes *backgrounds* genéticos e ainda que tiveram o gene *Prnp* removido durante a fase embrionária ou apenas na fase adulta.

Em segundo lugar avaliaremos os polimorfismos do gene *PRNP* em pacientes portadores de diferentes síndromes epiléticas na tentativa de demonstrar a existência de uma correlação entre a presença de variantes alélicas deste gene e o processo de epileptogênese.

## 2 OBJETIVOS

- ✓ Avaliar o papel de PrP<sup>c</sup> na sensibilidade a convulsões. Modelos farmacológicos de convulsão por ácido cáinico e PTZ serão testados em diferentes linhagens de camundongos onde a expressão de PrP<sup>c</sup> é abolida ou é muito alta. Com intuito de descartar falsas respostas ocasionadas pela presença de algum tipo específico de *backgrond* genético ou ainda de mecanismos compensatórios estabelecidos durante embriogênese, usaremos animais com diferentes *backgronuds* genéticos e ainda que tiveram o gene *Prnp* removido durante o período embrionário ou pós natal.
- ✓ Validar a técnica de DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) na determinação de variantes alélicas do gene *PRNP* usando amostras de DNA de pacientes com diferentes síndromes epiléticas.
- ✓ Determinar a frequência das variantes alélicas no gene *PRNP* em pacientes portadores de epilepsias focais e generalizadas e compará-las com as observadas em controles hígidos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MODELOS ANIMAIS

**Camundongos Zrch ou ZPrnp<sup>0/0</sup>** - Construídos por BÜELER et al. (1992) tiveram o gene *Prnp* deletado na região dos aminoácidos 4 a 186, sendo que esta foi substituída por um cassete de neomicina. Estes animais têm *background* genético misto C57/BL6J X 129 Sv.

**Camundongos Tg-20** - Estes animais são transgênicos construídos a partir de blastocistos do camundongo ZPrnp<sup>0/0</sup>. Neles foram inseridas cópias adicionais do gene de PrP<sup>c</sup> que levam a expressão de aproximadamente 6 vezes mais proteína no cérebro que os animais selvagens (FISCHER et al. 1996). Estes animais têm, portanto, o mesmo *background* genético dos ZPrnp<sup>0/0</sup>.

**Camundongos controle Zrch Prnp<sup>+/+</sup> (ZPrnp<sup>+/+</sup>)** - foram gerados de um acasalamento entre os animais C57/BL6J e 129 Sv. O cruzamento contínuo a partir dos F1 destes animais gerou a cepa tipo selvagem de *background* misto que é controle para os camundongos ZPrnp<sup>0/0</sup> e Tg20.

**Camundongos Edbg Prnp<sup>-/-</sup>, Edbg Prnp<sup>+/-</sup> e Edbg Prnp<sup>+/+</sup>** - Estes animais foram construídos por MANSON et al. (1994), e neles o cassete de neomicina foi inserido no sítio de restrição da enzima Kpn-1 presente na ORF de *Prnp*. Esta linhagem possuía *background* puro 129SV, que não é bem aceita para ensaios cognitivos. Nos últimos anos estes animais foram re-acasalados com animais de

background C57/BL10 por 4 gerações no Laboratório do Dr Bruce Chesebro (Rocky Mountains NIH).

Na tentativa de controlar o *background* genético desta linhagem dentro dos experimentos, animais heterozigotos (Edbg *Prnp*<sup>+/-</sup>) são continuamente acasalados com C57/BL10 (*backcross*). Os 25% de animais heterozigotos provenientes destes acasalamentos são acasalados entre si e geram uma prole onde 25% dos animais são homozigotos para a depleção (*EPrnp*<sup>-/-</sup>), 25% são controles homozigotos sem depleção *EPrnp*<sup>+/+</sup> e 50% são heterozigotos (*EPrnp*<sup>+/-</sup>). Estas proles então são usadas para os experimentos, pois têm o mesmo *background* e o controle tipo selvagem vindo do mesmo acasalamento.

**Camundongos Tg46\*, Cre-Tg46, Tg37\* e Cre-Tg37** – Estes camundongos são *knockouts* pós-natal, onde o gene *Prnp* é mantido durante toda a embriogênese e desligado em torno de 14 semanas pós-natal apenas em neurônios. Para a construção deste animal foi usado um vetor com a região aberta de leitura do gene de PrP<sup>c</sup> flanqueado por sítio MloxP. Este foi microinjetado em oócitos FVB *Prnp*<sup>0/0</sup> para a produção das matrizes cuja progênie expressava PrP<sup>c</sup>. Foram gerados desta forma 2 cepas Tg46 e Tg37, sendo que a primeira apresenta a expressão de PrP<sup>c</sup> semelhante ao animal tipo selvagem e a segunda apresenta aproximadamente 3 vezes mais proteína no cérebro.

Foi então gerado um terceiro camundongo expressando a enzima Cre recombinase do fago P1 sob controle do promotor do gene de neurofilamento H (NFH) que é especificamente ativado a partir da décima quarta semana pós-natal apenas em neurônios. A proteína Cre codificada por fago P1 é uma proteína de 38 kDa que promove recombinação do DNA. A recombinação ocorre num sítio

específico chamado Lox (cada sítio com 34 pb) e pode ser tecido específica se Cre estiver sob controle de promotores tecido-específicos (SAUER e HENDERSON 1988). Oócitos FVB *Prnp*<sup>0/0</sup> foram usados para a introdução deste vetor. O animal onde o gene de PrP<sup>c</sup> vai ser desligado após a 14 semanas pós-natal é um F1 proveniente do cruzamento de animais *Prnp*<sup>0/0</sup> lox (Tg46 ou Tg37) e CRE NFH, denominado NFH-Cre-MloxP. Os animais do mesmo acasalamento que não possuem CRE são os controles dos experimentos, pois não têm o gene de PrP<sup>c</sup> desligado e os animais que sofrerem recombinação tem o gene de PrP<sup>c</sup> desligado apenas nos neurônios.

### **3.2 GENOTIPAGEM DOS CAMUNDONGOS *KNOCKOUTS* E TRANSGÊNICOS**

Todos os animais nocautes constitutivos Edgb e condicionais Tg46\*, CreTg46, Tg37\* e CreTg37, foram genotipados antes da realização de cada experimento.

Para a genotipagem dos animais Edbg, DNA extraído da cauda foi amplificado em duas reações multiplex. A primeira delas para amplificar o gene de neomicina usando 0,25 µM dos iniciadores 5' – TTG AGC CTG GCG AAC AGT TC – 3' e 5' – GAT GGA TTG CAC GCA GGT TC – 3' e 0,5 µM dos iniciadores 5' – AAT AGA GGC ACT CCC TTC AC – 3' e 5' – GGT AAG CCC TTG ACC TAA AA – 3' para amplificar o gene de retinoblastoma, usado como controle interno da reação. As condições de ciclagem foram 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de

94°C por 1 min, 57°C por 1 min e 72°C por 45 seg, seguidos de uma extensão final de 72°C por 5 min.

A segunda reação para amplificar o gene de *Prnp* usando 0,25µM dos iniciadores 5' – AAC CGT TAC CCA CCT CAG GGT -3' e 5' – GCG CTC CAT CAT CTT CAC A – 3' e 0,25µM dos iniciadores para amplificar o gene de retinoblastoma como descrito acima. As condições de ciclagem foram 35 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 45 seg seguidos de uma extensão final de 72°C por 5 min. As amostras foram amplificadas por PCR, utilizando-se o Kit de amplificação Taq DNA polimerase (Promega, WI, USA). As reações foram feitas em um volume de 10 µL contendo 25 µg de DNA genômico, 20 mM Tris HCl pH 8,0; 50 mM KCl; 25 mM MgCl<sub>2</sub>; 500 µM dNTP (Life Technologies, Gibco BRL); 0,5µM de iniciadores (*Forward* e *Reverse*), DMSO 10% e 1 U de Taq DNA polimerase.

Para a genotipagem dos animais Tg46\*, Cre-Tg46, Tg37\* e Cre-tg37, DNA extraído da cauda dos animais de interesse foi amplificado em uma reação multiplex, usando 0,25µM dos iniciadores 5' – ATC AGT CAT CAT GGC GAA C – 3' e 5' – AGA GAA TTC TCA GCT GGA TCT TCT CCC GTC – 3' para amplificar o gene de *Prnp* e 5' – TCG ACC ATG CCC AAG AAG AAG – 3' e 5' – ACG TTT TCT TTT TCG GAT CCG CCG CAT – 3' para amplificar o gene de Cre. As condições de ciclagem foram 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 45 seg, 60°C por 50 seg e 72°C por 90 seg, seguidos de uma extensão final de 72°C por 10 min.

As amostras foram amplificadas por PCR, utilizando-se o Kit de amplificação Taq DNA polimerase (Promega, WI, USA). As reações foram feitas em um volume de 10 µL contendo 25 µg de DNA genômico, 20 mM Tris HCl pH 8,0; 50 mM KCl;

25 mM MgCl<sub>2</sub>; 500 μM dNTP (Life Technologies, Gibco BRL); 0,5μM de iniciadores (*Forward* e *Reverse*), DMSO 10% e 1 U de Taq DNA polimerase.

### **3.3 MODELOS EXPERIMENTAIS DE CONVULSÃO**

Nos modelos experimentais de crise convulsiva em camundongos induzida quimicamente, foram usadas diferentes doses de Ácido Cáinico (KA) e Pentilenotetrazol (PTZ).

Os animais foram separados por grupo, com 4 ou 5 animais por caixa e pesados antes da injeção da droga (KA ou PTZ). Após a injeção intraperitoneal dos agentes, os animais foram observados durante 120 min. Durante este período os animais foram avaliados quanto a presença de crises convulsivas as quais foram classificados quanto a sua intensidade usando a Escala de Racine (RACINE 1977).

Seguindo o protocolo usado por WALZ et al. (1999) a solução de ácido cáinico foi preparada a fresco diluída em PBS na concentração 1 mg/mL ou 2 mg/mL e a solução de PTZ foi também preparada a fresco e diluída em PBS na concentração 40 mg/mL ou 60 mg/mL.

Os animais permaneceram em um sistema de iluminação artificial, períodos claro e escuro 12/12, e com livre acesso a comida e água. Todos os experimentos foram conduzidos em temperatura controlada entre 22-24° C e os procedimentos realizados com estes animais foram realizados de maneira a minimizar qualquer sofrimento e o número de animais utilizados. Em todos os experimentos o guia “Principles of laboratory animals care” (NIH # 85-23, revisado em 1996) foi estritamente seguido.

### 3.3.1 Modelo de Ácido Caínico

O ácido caínico (cainato) é uma toxina análoga do glutamato, extraído da *Digenea simplex*, um tipo de alga vermelha, que cresce em águas quentes. É um potente agonista de aminoácidos excitatórios e sua potente atividade neurológica tem sido atribuída a sua semelhança estrutural com o neurotransmissor ácido L-glutâmico. É um importante modelo para o estudo de neurotoxicidade e tem sido vastamente usado como modelo de epilepsia de lobo temporal, uma vez que os achados histopatológicos são semelhantes à esclerose hipocampal em humanos, ocorrendo reorganização sináptica e brotamento das fibras musgosas.

### 3.3.2 Modelo de Pentilenotetrazol

O Pentilenotetrazol é um agente farmacológico estimulador do sistema nervoso central e respiratório. É considerado um antagonista não competitivo de GABA.

O modelo de convulsão induzida por pentilenotetrazol (PTZ) é reconhecidamente um modelo agudo de crise generalizada. O PTZ, um inibidor da transmissão de receptor GABAérgico em doses altas (60-70 mg/kg) induz inicialmente abalos mioclônicos, seguidos de uma crise generalizada do tipo tônico-clônica com duração de segundos, evoluindo para um período pós-ictal de minutos (SEJIMA et al. 1997).

Em doses muito baixas (10-20 mg/Kg, intra-peritoneal) o PTZ induz o surgimento de crises do tipo ponta-onda em roedores, sendo útil no estudo do entendimento dos circuitos tálamo-corticais envolvidos nas descargas do tipo ponta-

onda e comumente usado na varredura de drogas para tratamento de ausência (MODY et al. 1997).

### **3.4 ESCALA DE RACINE**

A observação das crises convulsivas foi feita usando a Escala de Racine:

1. Automatismos orofaciais
2. Mioclonia cefálica
3. Mioclonia de membros superiores
4. Rearing ou levantamento
5. Levantamento seguido de queda por perda de equilíbrio

Estágios 1 e 2 são caracterizados por comportamentos muito sutis e difícil observação. Desta forma só foi considerado o início da crise convulsiva quando o animal atingia o estágio 3. As classes 4 e 5 foram consideradas crises generalizadas.

### **3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Foi analisada a proporção de convulsão e mortalidade nas diferentes cepas de animais estudados utilizando o teste de Qui-Quadrado. A magnitude de associação entre a presença de Prnp e a ocorrência de convulsão e mortalidade foi medida pela razão de risco estimado (RRE, do inglês *odds ratio*) e o respectivo intervalo de confiança de 95% (IC 95%) usando um modelo de regressão logística incondicional

através do programa de estatística SPSS versão 12.0 (Chicago, IL). Foram considerados estatisticamente significativos  $p < 0,05$ .

### **3.6 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PRP<sup>C</sup> POR IMUNODETECÇÃO EM EXTRATOS CEREBRAIS.**

Extratos cerebrais provenientes de animais adultos (4 meses) das cepas *ZPrnp<sup>+/+</sup>*, C57/BL6J, Tg20, *EPrnp<sup>+/+</sup>*, *EPrnp<sup>+/-</sup>*, Tg46 e Tg37 foram adquiridos através da maceração em tampão de lise [50mM Tris-HCl pH 7,4; 1mM EDTA; 0,2% de deoxilato de sódio; 0,5% Triton X-100; + 10% de inibidores de protease (Complete, Mini, ROCHE, cat. n° 1836153). As proteínas foram dosadas através de ensaio colorimétrico pelo reagente de Bradford, separadas eletroforéticamente em gel de poliacrilamida a 10% contendo SDS (SDS-PAGE), transferidas e imobilizadas em membrana de nitrocelulose (0,45µm - Schleicher e Shuell, Alemanha). A membrana foi incubada durante 1 hora, com TBST (120mM de NaCl, 20mM de Tris e 0,05% de Tween 20) contendo 5% de leite desnatado liofilizado (Molico-Nestlé) para bloquear as ligações inespecíficas. Em seguida, incubações de 12 horas a 4°C com anticorpos primários - policlonal anti PrP<sup>C</sup> e β actina (policlonal da Sigma cat. n° A 2066), diluídos em Molico/TBST, 1:5000 ou 1:1000 respectivamente foram feitas. Após três lavagens de 10 minutos com TBST, a membrana foi incubada com anticorpo secundário (anticorpo anti Ig de camundongo ou coelho conjugado à peroxidase) diluídos 1:5000 ou 1:3000 respectivamente em Molico/TBST por 1 hora à temperatura ambiente. Após nova seqüência de lavagens a reação foi revelada

utilizando o "kit ECL Western Blotting Analysis System" (Amersham-Pharmacia) seguida de exposição de um filme de raio X à membrana.

As bandas do filme radiográfico foram quantificadas usando-se o programa Scion Image e a expressão de PrP<sup>c</sup> normalizada pela expressão de  $\beta$  actina em cada linha.

### **3.7 HUMANOS**

#### **3.7.1 Casos: *Pacientes portadores de epilepsia***

Foram analisadas 270 amostras de DNA humano de pacientes portadores de epilepsia, sendo que 168 apresentavam epilepsia focal (com ou sem generalização secundária) e 40 tinham epilepsia do tipo generalizada primária. Em 62 casos o diagnóstico do tipo de epilepsia não foi revisado pelos pesquisadores.

Estes pacientes estão em acompanhamento no Centro de Cirurgia de Epilepsia, HC-Ribeirão Preto, USP e todos assinaram um consentimento informado concordando na doação do seu sangue para extração de DNA e a avaliação de polimorfismos no gene PRNP. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCRP 6949/99) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital do Câncer A.C. Camargo (482/03).

#### **3.7.3 Controles**

No grupo controle foram recrutados 202 indivíduos sadios, sem doença neurológica ou psiquiátrica prévia ou história familiar destas doenças descritos no momento da entrevista e sem nenhum grau de parentesco com os pacientes. Dele

fazem parte colaboradores do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer e de acompanhantes de pacientes do Centro de Cirurgia de Epilepsia, HC-Ribeirão Preto, USP. Todos os controles assinaram um consentimento informado concordando na doação do seu sangue para extração de DNA e a avaliação de polimorfismos no gene PRNP.

### **3.8 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO**

Após a assinatura do consentimento pós-informado, foi coletada uma amostra de 5 mL de sangue através de punção venosa da veia braquial, na presença de agente anti coagulante EDTA, sendo as amostras divididas no estudo em casos e controles. A coleta de sangue foi feita no CIREP – Centro de Cirurgia em Epilepsia (casos e controles) e no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer (controles).

### **3.9 EXTRAÇÃO DE DNA DE LEUCÓCITOS**

Para a extração de DNA de todas as amostras incluídas neste estudo, foi usado o Kit Wizard Genomic DNA Purification<sup>®</sup> da Promega, catálogo A1120, que tem se mostrado um kit rápido e eficaz na purificação de DNA genômico.

Seguindo o protocolo do fabricante, as amostras de sangue foram homogeneizadas por 15 minutos, 3 mL de sangue foram adicionados a 9 mL de solução de lise, a amostra incubada sob agitação a temperatura ambiente por 10 minutos, seguido de centrifugação por 10 minutos a 1700 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado homogeneizado vigorosamente. A seguir foram

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

Após a extração, o DNA foi dosado pela absorbância, em comprimento de onda de 260nm e submetido à eletroforese em gel de agarose para verificação de sua integridade e pureza. O material foi então catalogado e armazenado a -20°C em nosso banco de DNAs para posterior seqüenciamento do gene *PRNP*.

### **3.10 SEQÜENCIAMENTO DO GENE *PRNP***

#### **3.10.1 Reação de amplificação por PCR**

A região codificadora (fase aberta de leitura) do gene *PRNP* foi dividida em duas porções que se sobrepõem: Fragmento 1, que corresponde a 423 pb, com início no nucleotídeo 65 (ATG inicial) e término no 488 e Fragmento 2, que contém 404 pb, com início no nucleotídeo 455 e término no 858, 53 pares de base do códon

terminal. Os iniciadores foram analisados quanto a possíveis associações entre eles (*hairpin* e formação de dímeros) em *software Premier Primer*. Os iniciadores foram sintetizados pela Life Technologies do Brasil (S.P., Brasil):

As amostras foram amplificadas por PCR, utilizando-se o Kit de amplificação Taq DNA polimerase (Promega, WI, USA). As reações foram feitas em um volume de 20 µL contendo 50 µg de DNA genômico (diluído em água Dnase/Rnase Free, Invitrogen), 20 mM Tris HCl pH 8,0; 50 mM KCl; 25 mM MgCl<sub>2</sub>; 500 µM dNTP (Life Technologies, Gibco BRL); 0,5 µM de iniciadores (*Forward* e *Reverse*) e 1 U de Taq DNA polimerase. A amplificação da primeira metade do gene *PRNP* foi realizada usando-se os iniciadores *Forward1*: 5'ATG CTG GTT CTC TTTGTG 3' e *Reverse1*: 5'AAC GGT CCT CAT AGT CAC TGC 3'. As condições de ciclagem foram 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 1 min seg, 64°C por 1 min e 72°C por 1 min, seguidos de uma extensão final de 72°C por 10 min.

A amplificação da segunda metade do gene de PRNP foi feita usando-se os iniciadores *Forward2*: 5' TCA TGG TGG TGG CTG GGG TCA 3' e *Reverse2*: 5' CGC CTC CCT CAA GCT GGA AAA 3'.

As condições de ciclagem foram 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 1 min seg, 66°C por 1 min e 72°C por 1 min, seguidos de uma extensão final de 72°C por 10 min.

Os produtos de PCR amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, diluídos na proporção 5:1 em TBE (TRIS Borato EDTA). Após a corrida, o gel foi incubado por 40 minutos com sybr gold (Invitrogen - cat S11494) e os produtos amplificados visualizados em Luz UV.

Os produtos destas ampliações foram usados subseqüentemente nas reações de seqüenciamento.

### 3.10.2 Seqüenciamento de *PRNP*

Após ter o DNA amplificado (item 3.10.1) foi utilizado o kit DYEnamic ET terminator<sup>®</sup> (Amersham Pharmacia Biotech, Inc, USA) para a reação de seqüenciamento. As reações foram realizadas segundo as especificações do fabricante, em um volume final de 10 $\mu$ L contendo 0,2 pmoles de DNA genômico e 0,5 pmoles de iniciador, adicionados a mistura reagente contendo os dNTPs fluorescentes. A amplificação foi feita em termociclador DNA Thermal Cycler PTC-100 (MJ Research, Inc), utilizando-se um programa que consta de uma desnaturação inicial de 1 minuto a 94°C, 1 minuto e 15 segundos a 60° C e 20 segundos a 94° C por 25 ciclos. Nestas reações foram usados iniciadores sintetizados pela Life Technologies do Brasil (S.P., Brasil). Primeira metade da seqüência aberta de leitura de *PRNP*: F1seq – 5' CTG GTT CTC TTT GTG GCC 3' ou R1seq – 5' AAC GGT CCT CAT AGT CAC TGC 3', para a segunda metade da seqüência aberta de leitura de *PRNP*: F2 seq – 5'TGG TGG TGG CTG GGG TCA AGG 3' e R2 seq – 5' CTC CCT CAA GCT GGA AAA AGA 3'.

Após esta reação de ciclagem, foi adicionado 1 $\mu$ L de AcNa/EDTA e 40 $\mu$ L de etanol 95% e o material permanecer por 15 min no escuro e a 4° C. Este foi a seguir submetido a centrifugação a 10.600 x g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi aspirado e o precipitado lavado com 250  $\mu$ L de etanol 70%, seguido de centrifugação por 10.600 xg por 5 min a 4° C. O sobrenadante foi aspirado e o precipitado seco a 55°C. As amostras foram aplicadas em gel e a leitura da seqüência foi feita em

seqüenciador ABI 3100 Genetic Analyzer da Applied Biosystems (New Jersey, USA).

### **3.11 HPLC (CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE FASE REVERSA DENATURANTE)**

Os DNAs extraídos de leucócitos de cada um dos pacientes e controles foram amplificados por PCR, utilizando-se o Kit de amplificação AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, New Jersey, USA). As reações foram feitas em um volume de 50  $\mu$ L contendo 100  $\mu$ g de DNA genômico (diluído em água Dnase/Rnase *Free*, Invitrogen), 100 mM Tris HCl pH 8,3; 500 mM KCl; 25 mM MgCl<sub>2</sub>; 500  $\mu$ M dNTP (Life Technologies, Gibco BRL); 0,5  $\mu$ M de iniciadores (*Forward* e *Reverse*) e 5 U de AmpliTaq Gold. Os iniciadores utilizados foram sintetizados pela Life Technologies do Brasil (S.P., Brasil). A primeira metade da fase aberta de leitura de PRNP foi amplificada usando o par de iniciadores *Forward*: 5'ATG CTG GTT CTC TTTGTG 3' e *Reverse*: 5'AAC GGT CCT CAT AGT CAC TGC 3'. Para a segunda metade foram usados os iniciadores *Forward*: 5' ATC ATA CAT TTC GGC AGT 3' *Reverse*: 5' CTC CCT CAA GCT GGA AAA AGA 3'. Para a amplificação foi utilizado programas *touchdown*.

Para a 1ª metade de *PRNP* as condições de ciclagem foram 95°C por 10 min, seguido de 10 ciclos de 95°C por 1 min 63° C por 1 min e 72° C por 1 min, 10 ciclos de 95°C por 1 min 61° C por 1 min e 72° C por 1 min, 10 ciclos de 95°C por 1 min 59° C por 1 min e 72° C por 1 min, seguidos de uma extensão final de 72°C por 10 min.

Para a 2ª metade de *PRNP* as condições de ciclagem foram 95°C por 10 min, seguido de 10 ciclos de 95°C por 1 min 62° C por 1 min e 72° C por 1 min, 10 ciclos de 95°C por 1 min 60° C por 1 min e 72° C por 1 min, 10 ciclos de 95°C por 1 min 58° C por 1 min e 72° C por 1 min, seguidos de uma extensão final de 72°C por 10 min.

As amostras de DNA amplificadas por PCR foram submetidas à cromatografia líquida de fase reversa denaturante usando-se o equipamento Wave-nucleic acid Fragment Analysis System da Transgenomic (CA, USA), para a pesquisa da presença de variantes alélicas (fitas de DNA em heteroduplex). Para isso os produtos de PCR são primeiramente aquecidos a 95° C por 5 minutos, para denaturação total das fitas duplas de DNA e resfriados gradativamente até a temperatura ambiente para renaturação. Em seguida as amostras são colocadas no cromatógrafo onde, primeiramente 8 µL destas são aquecidos a uma temperatura de 50°C onde se verifica a qualidade do DNA amplificado (denominada "double-stranded sizing – single fragment") e em seguida 12 µL do produto de PCR são aquecidos à temperatura de anelamento, onde se faz a pesquisa de mutações/polimorfismos por formação de heteroduplex (HUBER et al. 1992). Esta temperatura foi calculada pelo *software* do aparelho e se mostrou ótima para a resolução total dos heteroduplex em 65°C para o fragmento 1 (primeira metade) e 61°C ou 63°C para o fragmento 2 (segunda metade).

Os parâmetros de gradiente e fluxo de tampões (tampão A = TEEA 5% e tampão B = acetonitrila a 25%) foram ajustados utilizando-se o *software Wavemaker system control software* (Transgenomic Inc, CA, USA).

Amostras que revelaram somente um pico de saída no cromatograma (homoduplex) são misturadas em igual quantidade com DNA protótipo e desnaturadas a 95° C por 5 minutos para a formação de possíveis heteroduplex, caso a amostra contenha uma mutação/polimorfismo em homozigose. A seguir as amostras são submetidas novamente à análise cromatográfica como descrito anteriormente.

### **3.12 IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS/MUTAÇÕES NO GENE DE *PRNP* POR DIGESTÃO DO DNA COM ENDONUCLEASES**

Para a digestão do DNA com enzimas de restrição foram feitas ampliações de toda a fase aberta de leitura do gene *PRNP*. Para isso usamos os iniciadores F1 - 5'ATG CTG GTT CTC TTTGTG 3' e R2seq - 5' CTC CCT CAA GCT GGA AAA AGA 3', kit Taq DNA polimerase recombinante (Gibco, USA), seguindo as especificações do fabricante, em um volume de 20µL por reação, utilizando também um programa *touchdown*, com uma temperatura inicial de anelamento de 63°C. O produto assim obtido foi purificado através de uma precipitação inicial com 400µL de 2-propanol (P.A, Merck, Germany), seguida de outra com 400µL de 70% etanol (Merck, Germany). O DNA foi ressuspendido em água estéril para uma concentração aproximada de 20ng/uL e avaliado através de eletroforese em agarose. As endonucleases *PvuII*, *NspI* and *BbvI* (New England Biolabs and Amersham Biosciences) foram usadas para a análise dos códons 117, 129 e 171 respectivamente (WINDL et al. 1999; FINK et al. 1994). Para a digestão foi usada 1U enzima/ug de DNA. As reações foram incubadas por 16 horas a 37°C seguidos de 20 minutos a

65°C para inativação da enzima e término da reação. Os produtos assim obtidos foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% e revelados por coloração de prata.

### 3.14 ESTATÍSTICA

Foi analisada a proporção de casos que apresentavam alelos variantes para o gene *PRNP*. A magnitude de associação entre a presença dos alelos variantes e a ocorrência de epilepsia foi medida pela razão de risco estimado (RRE, do inglês *odds ratio*) e o respectivo intervalo de confiança de 95% (IC 95%) usando um modelo de regressão logística incondicional através do programa de estatística SPSS versão 12.0 (Chicago, IL). A mesma análise foi feita separadamente para pacientes portadores de epilepsias focais (n = 168) e generalizadas primárias (n = 40). Nesta segunda análise os casos cujos diagnósticos não tenha sido revisado (n = 62). Em todas as análises foi calculado o RRE ajustado para sexo e a presença de alelos variantes nos códons 117, 129 e depleção do *octarepeat*.

## 4 RESULTADOS I - ANIMAIS

### 4.1 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO GENE *PRNP* E EXPRESSÃO DE PRP<sup>C</sup> NOS ANIMAIS DO ESTUDO

Os esquemas das figuras 1, 2 e 3 mostram o procedimento de acasalamento das linhagens de animais usadas no estudo.

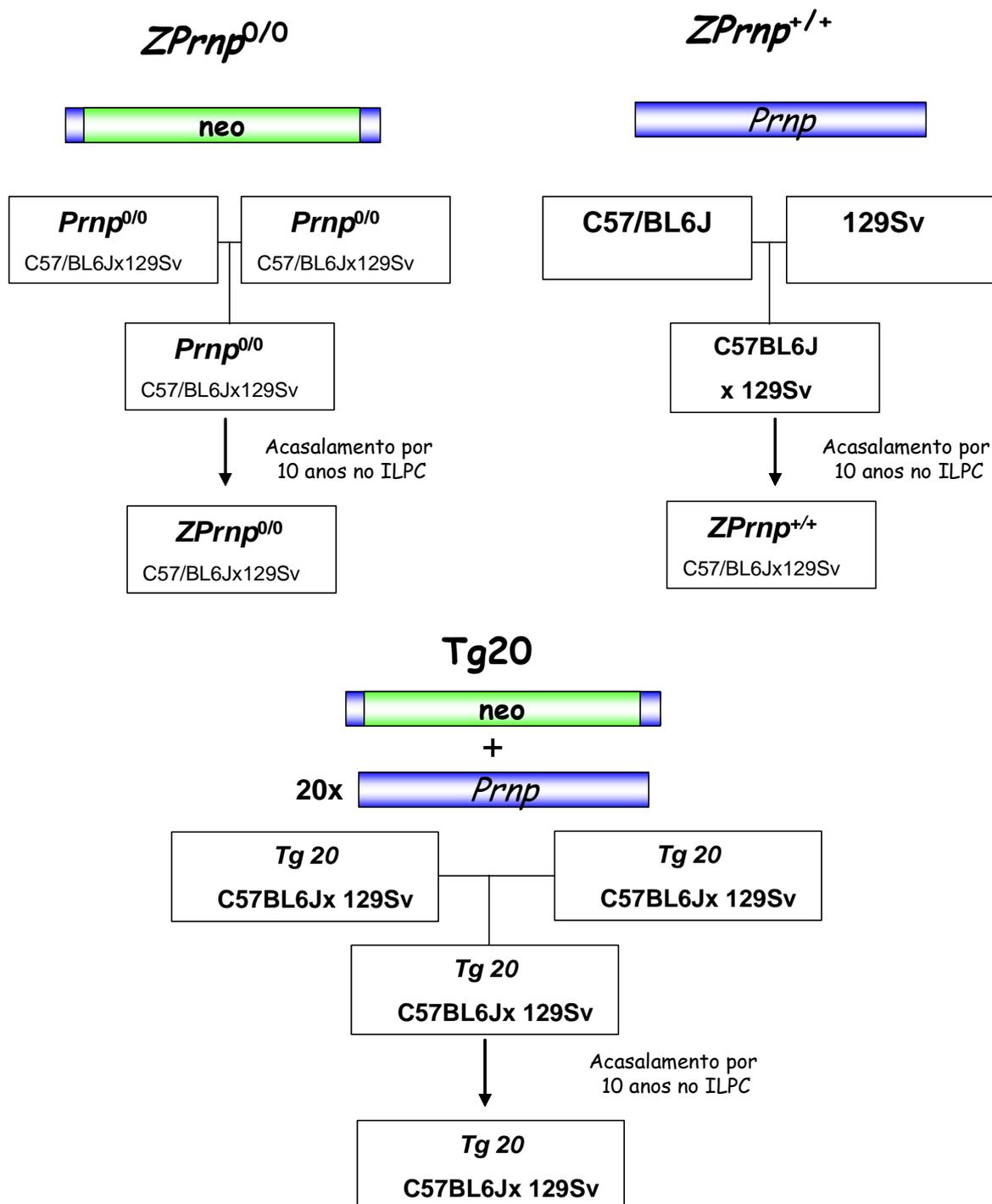
Na Figura 1 estão mostrados os animais **ZrchI** (BÜELER et al. 1992) *ZPrnp*<sup>0/0</sup> e seu respectivo controle *ZPrnp*<sup>+/+</sup> assim como o animal que superexpressa PrP<sup>C</sup>, denominado Tg20. Estes três animais têm um *background* misto C57/BL6J x 129Sv e suas genotipagens não são feitas rotineiramente uma vez que as linhagens são mantidas isoladas, isto é não há acasalamento entre elas.

A Figura 2 apresenta o esquema de acasalamento dos animais da linhagem **Edbg** (MANSON et al. 2004). Os animais são mantidos com a depleção de *Prnp* em heterozigose e acasalados entre eles para a geração de animais com os diferentes genótipos na mesma ninhada. Todos estes animais são genotipados e os produtos das reações de PCR usados para identificação dos genótipos estão mostrados na Figura 2C.

A Figura 3 mostra o esquema de obtenção dos animais *knockouts* condicionais Tg46\*, Cre-Tg46, Tg37\* e Cre-tg37. As linhagens originais contendo o gene *Prnp* flanqueado por Mlox são também denominadas Tg37 e Tg46 e a linhagem contendo o gene da CRE recombinase modulado pelo promotor de neurofilamento H é denominado Tg63. Os animais gerados dos acasamentos entre Tg37 x Tg63 ou

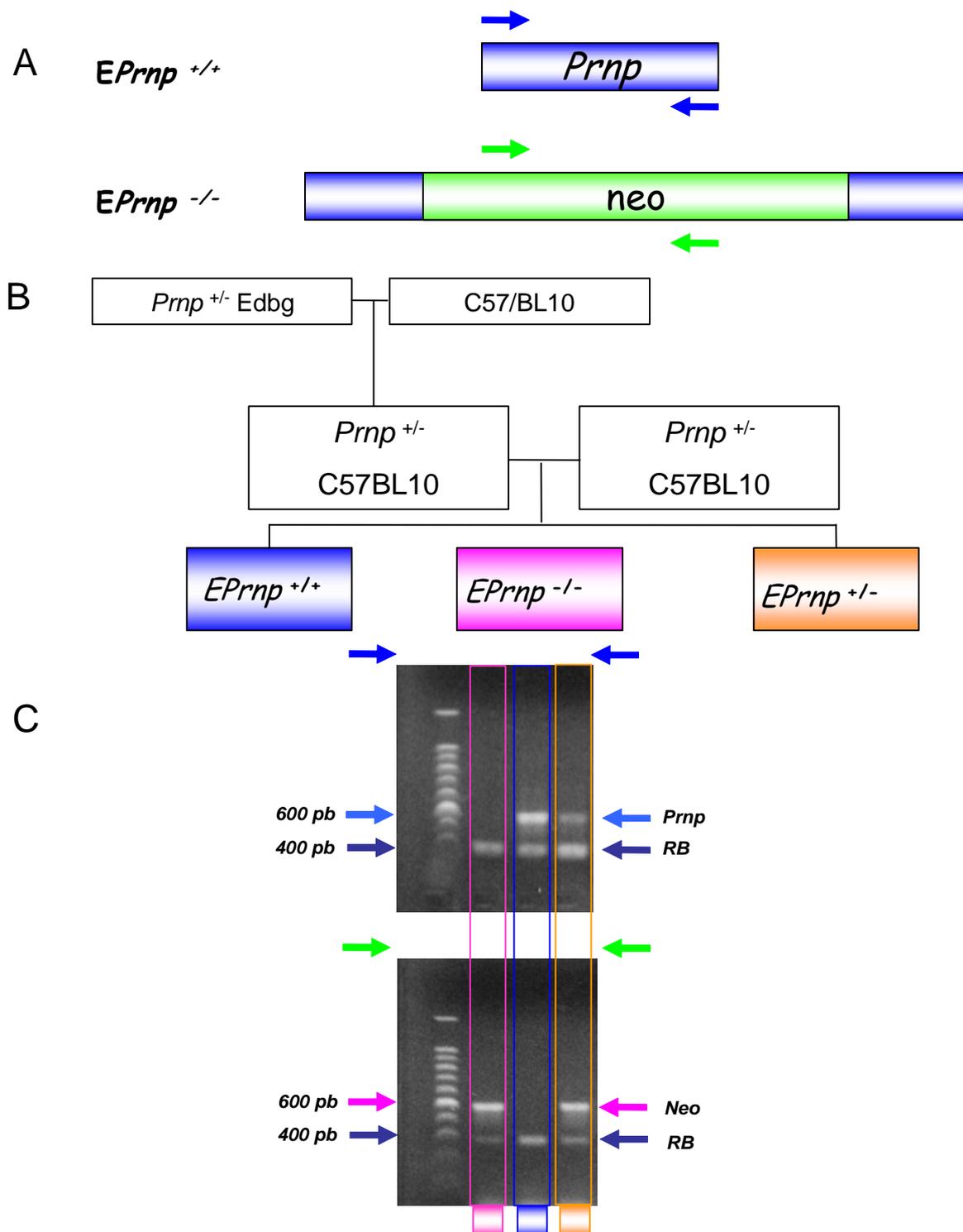
Tg46xTg63 (Tg46\*, Cre-Tg46, Tg37\* e Cre-tg37) são todos genotipados e os produtos das reações de PCR usados para identificação dos genótipos estão mostrados na Figura 3C.

Para confirmar a expressão de PrP<sup>c</sup> nas cepas de animais Tg20 e naqueles que dão origem aos animais *knockout* condicionais Tg37 e Tg46, extratos de cérebro de cada um destes camundongos foram avaliados por *Western Blot* usando-se anticorpos contra PrP<sup>c</sup> e  $\beta$ -actina como controle de carregamento (Figura 4A). Na Figura 4B os valores relativos da expressão de PrP<sup>c</sup> foram determinados a partir da relação entre a intensidade das bandas obtidas para PrP<sup>c</sup> e as respectivas intensidades de  $\beta$ -actina. Assim, podemos observar que o animal Tg37 apresenta três vezes mais PrP<sup>c</sup> no cérebro do que o animal Tg46, enquanto o Tg20 expressa aproximadamente 6 vezes mais PrP<sup>c</sup> quando comparado com o controle C57/BL6J. Estes dados são consistentes com os descritos previamente (FISHER et al. 1996; MALLUCCI et al. 2002).



**Legenda:** Obtenção das linhagens de camundongos  $ZPrnp^{0/0}$ ,  $ZPrnp^{+/+}$  e Tg20. Estes animais têm sido mantidos neste esquema de acasalamento nos últimos 10 anos.

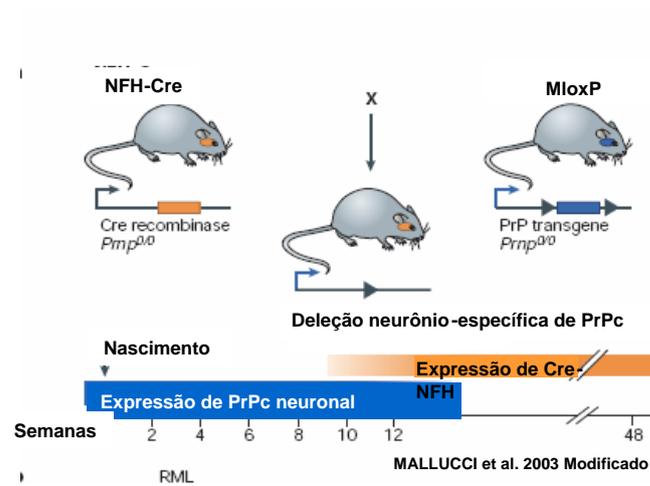
**Figura 1** - Esquema de acasalamentos dos animais  $ZPrnp^{0/0}$ ,  $ZPrnp^{+/+}$  e Tg20.



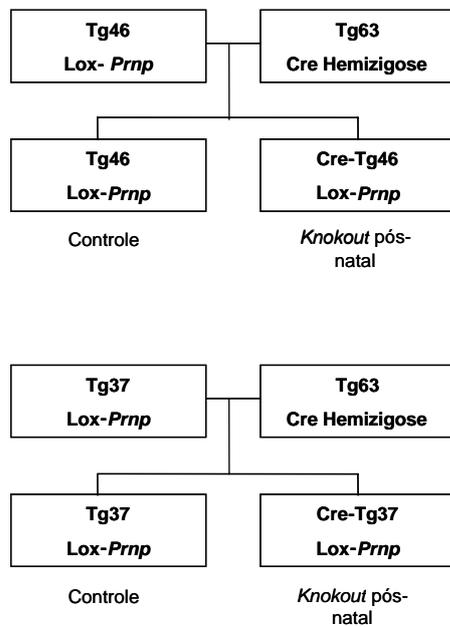
**Legenda:** Obtenção dos animais *EPrnp*<sup>-/-</sup>, *EPrnp*<sup>+/+</sup> e *EPrnp*<sup>+/-</sup> provenientes do acasalamento de dois heterozigotos para *Prnp* e gel mostrando reação de PCR realizada para a genotipagem destes animais.

**Figura 2 -** Esquema de acasalamentos dos animais *EPrnp*<sup>-/-</sup>, *EPrnp*<sup>+/+</sup> e *EPrnp*<sup>+/-</sup>

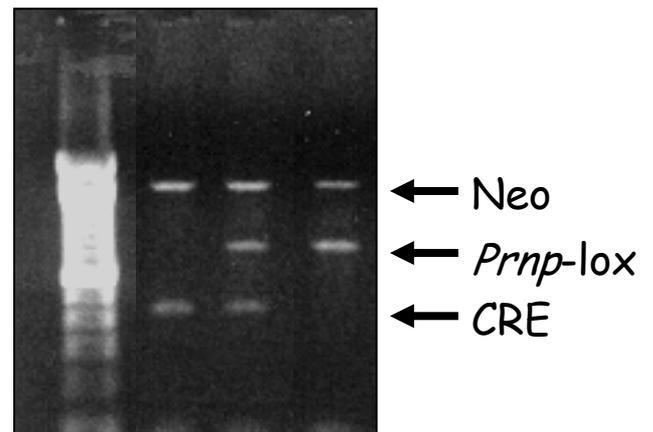
A



B

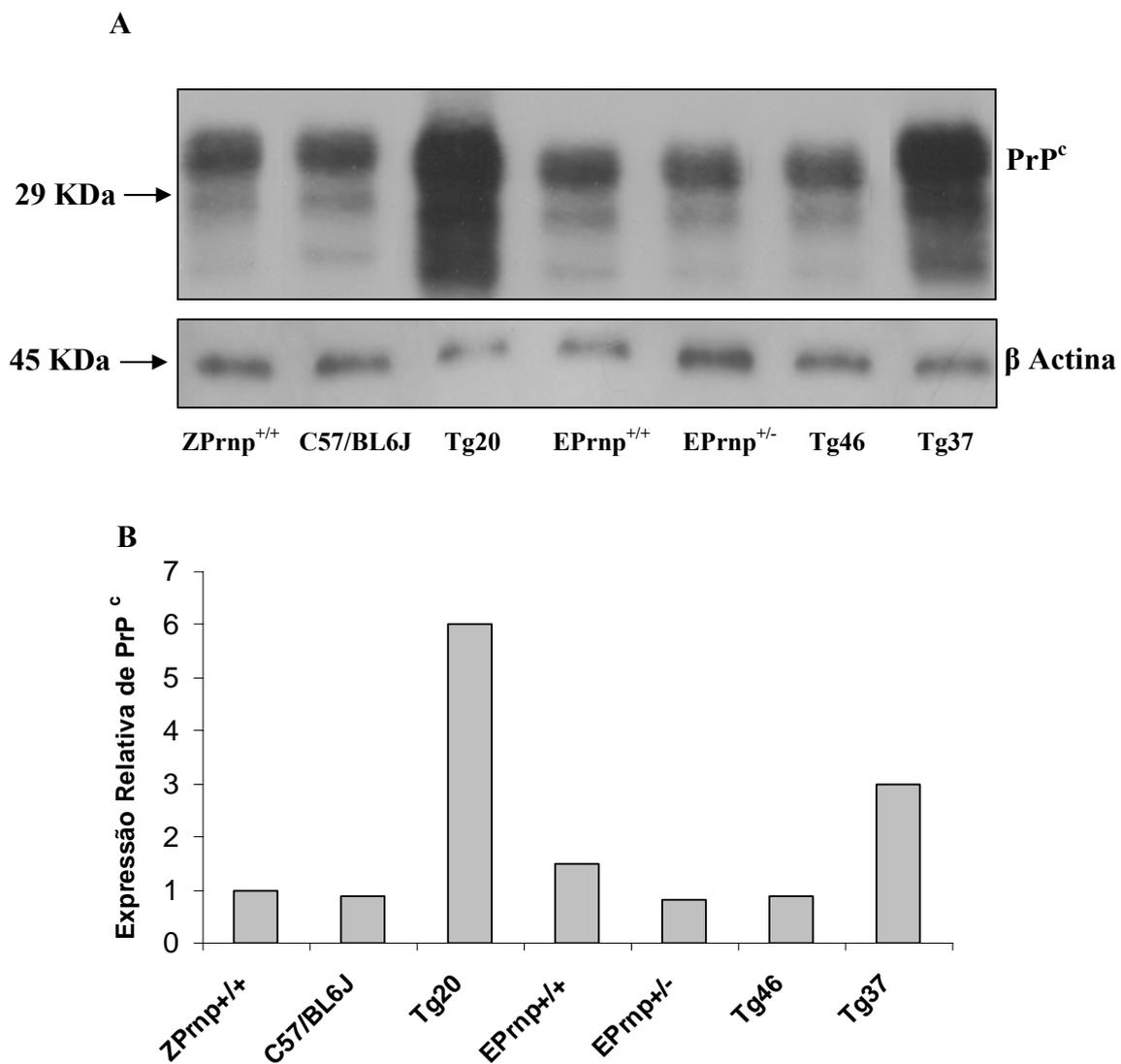


C



**Legenda:** Em A esquema de depleção de *Prnp* neurônio-específica modificado de MALLUCCI et al. (2003). Em B, esquema de acasalamento dos animais *knockouts* pós-natal e em C gel mostrando reação de PCR realizada para a genotipagem destes animais.

**Figura 3** - Esquema de acasalamento dos animais nocautes pós-natal.



**Legenda:** (A) Reação de *western blot* para PrP<sup>c</sup> e β-actina em extratos de cérebro de camundongos C57BL6J, Tg20, Tg46 e Tg37. (B) Expressão relativa de PrP<sup>c</sup>. Os valores representam a intensidade da reação para PrP<sup>c</sup> de cada animal normalizada pela expressão respectiva de β-actina.

**Figura 4 -** *Western Blot* para quantificação de PrP<sup>c</sup> no cérebro das cepas usadas neste estudo.

## 4.2 MODELO DE CONVULSÃO INDUZIDA QUIMICAMENTE POR ÁCIDO CAÍNICO EM CAMUNDONGOS

Dados anteriores do grupo mostraram que animais *knockouts* para PrP<sup>c</sup>, **Zrch** *Prnp*<sup>0/0</sup> apresentavam um limiar mais baixo de sensibilidade à convulsão induzida farmacologicamente que animais do tipo selvagem (WALZ et al 1999).

O modelo experimental de ácido caínico usado por WALZ em 1999 foi ampliado com o uso de várias doses desta droga nos animais tipo selvagem (*ZPrnp*<sup>+/+</sup>) e *knockouts* (*ZPrnp*<sup>0/0</sup>) e ainda em animais Tg20, que expressam 6x mais PrP<sup>c</sup> do que animais selvagens (Fisher et al, 1996). Além disso, foram avaliadas outras linhagens de animais *knockouts* para *Prnp*.

A Figura 5A mostra os experimentos de convulsão induzida por doses crescentes de ácido caínico em machos tipo selvagem, *ZPrnp*<sup>+/+</sup> e C57/BL6J, em *knockouts* *ZPrnp*<sup>0/0</sup> e em camundongos que superexpressam PrP<sup>c</sup>, Tg20. Os animais *ZPrnp*<sup>+/+</sup> receberam doses intraperitoniais de 10, 12,5 e 15 mg de ácido caínico/kg. Na dose 10mg/kg, 10% dos animais *ZPrnp*<sup>+/+</sup> apresentaram convulsão (3/30), em 12,5mg/kg, 80% (16/20) e em 15mg/kg 100% (10/10). Os animais tipo selvagem da linhagem pura C57/BL6J foram analisados nas doses de 10 e 12,5 mg de ácido caínico/kg animal. Quando tratados com a dose de 10mg/kg, 30% dos animais (3/10) apresentaram convulsão enquanto que 100% (10/10) deles têm convulsão quando recebem 12,5mg/kg de ácido caínico. Portanto, os animais *ZPrnp*<sup>+/+</sup> de *background* misto (C57/BL6J x 129Sv) apresentam sensibilidade semelhante ao ácido caínico que aqueles de *background* puro (C57/BL6J).

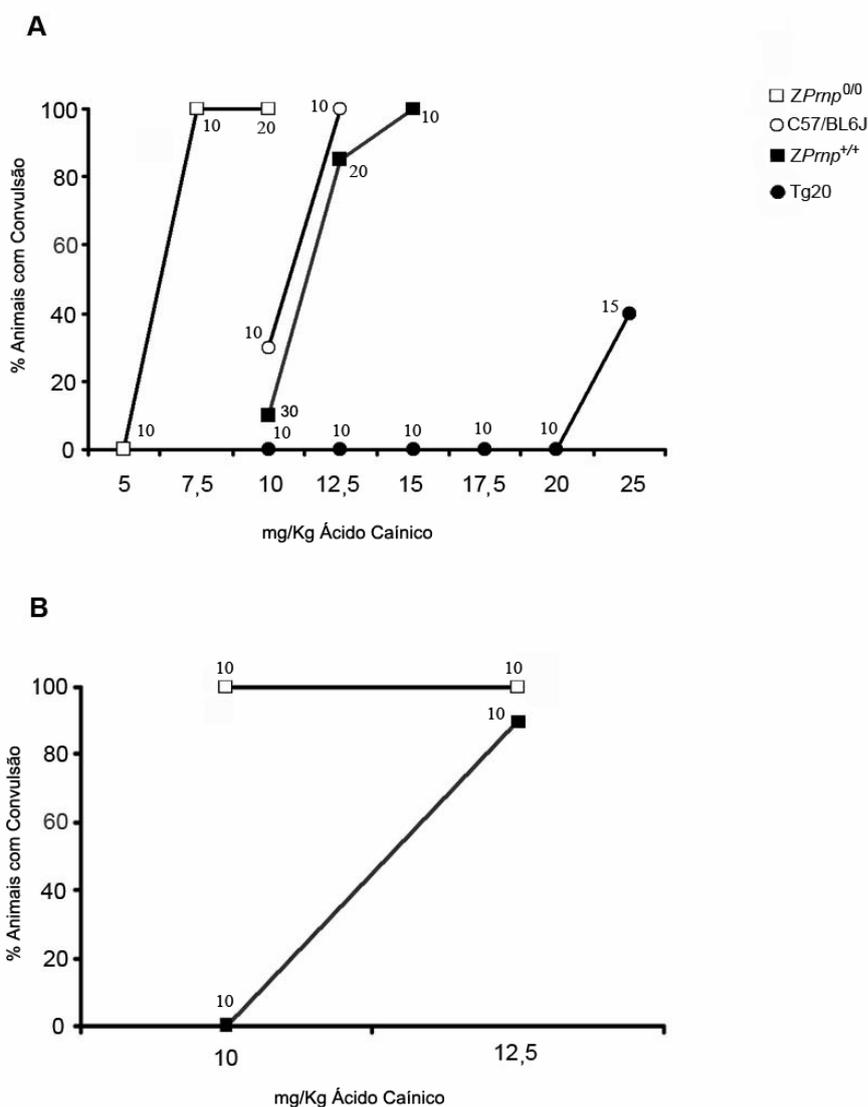
Nossos dados anteriores apontavam que 80% dos animais *knockout* para PrP<sup>c</sup> (*ZPrnp*<sup>0/0</sup>) tinham convulsão com uma dose de 10mg/kg (WALZ et al. 1999). Os resultados apresentados na Figura 5A confirmam esta tendência onde 100% dos animais *ZPrnp*<sup>0/0</sup> apresentam convulsão com esta dose (20/20). Entretanto, um dado novo mostra que estes animais são mais sensíveis do que esperávamos uma vez que a dose de 7,5 mg/Kg já é capaz de induzir convulsão em 100% dos animais (10/10). Apenas na dose de 5 mg/Kg não são observadas convulsões no animal *ZPrnp*<sup>0/0</sup> (0/10).

Foram analisados ainda camundongos Tg20 que expressam cerca de seis vezes mais PrP<sup>c</sup> que os do tipo selvagem (Figura 5A). Nas doses de 10 (n=10), 12,5 (n=10), 15 (n=10), 17,5 (n=10) e 20 mg/Kg (n=10) de ácido caínico nenhum animal apresentou convulsão. Esta só ocorreu quando a dose usada foi de 25mg/Kg, onde 40% dos animais apresentaram convulsão (6/15).

Portanto, a comparação entre os animais *ZPrnp*<sup>0/0</sup> com os do tipo selvagem *ZPrnp*<sup>+/+</sup> na dose 10mg/Kg mostrou que a ausência de expressão de PrP<sup>c</sup> torna os animais mais sensíveis às convulsões induzidas por ácido caínico (p<0,001 – Teste de Qui-Quadrado). Por sua vez, a superexpressão de PrP<sup>c</sup> nos camundongos Tg20 torna-os muito mais resistentes às convulsões induzidas por esta droga (10mg/Kg) do que os animais *ZPrnp*<sup>+/+</sup> ou C57/BL6J (p<0,001 – Teste de Qui-Quadrado).

Na tentativa de mostrar se havia diferença na sensibilidade à convulsão em fêmeas, usamos as doses de 10 e 12,5 mg/kg de ácido caínico em camundongas *ZPrnp*<sup>+/+</sup> e *ZPrnp*<sup>0/0</sup>. A Figura 5B mostra que na dose de 12,5mg/Kg todas as fêmeas *ZPrnp*<sup>0/0</sup> (10/10) tiveram convulsão e 90% (9/10) das *ZPrnp*<sup>+/+</sup> apresentaram este fenótipo. Por outro lado, na dose de 10mg/Kg 100% (10/10) das fêmeas *ZPrnp*<sup>0/0</sup>

tiveram convulsão enquanto nenhuma (0/10) das  $ZPrnp^{+/+}$  apresentaram este fenótipo ( $p < 0,001$ . – Teste de Qui-Quadrado). Portanto, tanto machos quanto fêmeas que não expressam PrP<sup>c</sup> apresentam uma maior sensibilidade a convulsão induzida por ácido caínico que animais tipo selvagem.



**Legenda:** (A) Camundongos machos das linhagens  $ZPrnp^{0/0}$ , C57Bl6J,  $ZPrnp^{+/+}$  e Tg20 foram tratados com concentrações crescentes de KA via intraperitoneal. Os valores representam a porcentagem os animais que entraram em convulsão (pelo menos estágio III na escala de Racine). Os números colocados ao lado de cada ponto representam o número de animais por grupo. (B) Camundongas fêmeas das linhagens  $ZPrnp^{0/0}$  e  $ZPrnp^{+/+}$  foram tratadas com as concentrações de KA como descrito em (A).

**Figura 5** – Curva dose resposta de KA em animais  $ZPrnp^{0/0}$ , C57Bl6J,  $ZPrnp^{+/+}$  e Tg20.

A seguir avaliamos uma segunda linhagem de animais *knockout* para o gene *Prnp* denominada Edbg (MANSON et al. 1994). Os animais usados no experimento são gerados a partir do acasalamento de dois heterozigotos para a depleção de *Prnp* gerando numa mesma prole os três genótipos – tipo selvagem ( $EPrnp^{+/+}$ ), *knockout* ( $EPrnp^{-/-}$ ) e heterozigoto ( $EPrnp^{+/-}$ ). Na Figura 6A avaliamos presença de convulsão pela administração de 10 mg/Kg ácido caínico em machos e fêmeas com cada um dos genótipos.

A avaliação de 15 machos  $EPrnp^{+/+}$  mostrou que apenas 7% (1/15) deles apresentaram convulsão, enquanto que 20% (4/20) dos animais  $EPrnp^{+/-}$  e 73% (11/15) dos animais  $EPrnp^{-/-}$  apresentaram este fenótipo. Resultados semelhantes foram obtidos para as fêmeas onde 17% das  $EPrnp^{+/+}$  (2/12) apresentavam convulsão contra 35% (7/20) das  $EPrnp^{+/-}$  e 82% (14/17) das  $EPrnp^{-/-}$ . A diferença entre animais  $EPrnp^{+/+}$  e  $EPrnp^{-/-}$  foi estatisticamente significativa ( $p=0,002$  para machos e fêmeas Teste de Qui-Quadrado). Entretanto, a comparação entre os animais  $EPrnp^{+/+}$  e  $EPrnp^{+/-}$  não foi estatisticamente significativa ( $p=0,287$  para machos e  $0,274$  para fêmeas - Teste de Qui-Quadrado). Além disso, a presença de convulsão é significativamente maior em animais  $EPrnp^{-/-}$  comparados aos animais  $EPrnp^{+/-}$  ( $p = 0,003$  para machos e  $0,002$  para fêmeas). Desta forma, os animais  $EPrnp^{-/-}$  apresentam chance 38,5 e 23,3 vezes (machos e fêmeas respectivamente) maior de apresentarem convulsão quando comparados com os  $EPrnp^{+/+}$ . Da mesma forma, os animais  $EPrnp^{-/-}$  apresentam 11,0 e 8,7 vezes mais risco de desenvolverem crises convulsivas quando comparados com os camongongos  $EPrnp^{+/-}$  (machos e fêmeas respectivamente). As Tabelas 3 a 6 mostram os cálculos estatísticos (RRE e p) de cada grupo.

**Tabela 3** - Análise estatística dos animais  $EPrnp^{+/+}$ ,  $EPrnp^{-/-}$  e  $EPrnp^{+/-}$  machos tratados com KA usando o animal  $EPrnp^{+/+}$  como parâmetro.

| Tipo de Animal | Convulsão (%) |            | RRE  | p     |
|----------------|---------------|------------|------|-------|
|                | Não           | Sim        |      |       |
| $EPrnp^{+/+}$  | 14 (93,3%)    | 1 (6,7%)   | 1,0  | -     |
| $EPrnp^{-/-}$  | 4 (26,7%)     | 11 (73,3%) | 38,5 | 0,002 |
| $EPrnp^{+/-}$  | 16 (80,0%)    | 4 (20,0%)  | 3,5  | 0,287 |

**Tabela 4** - Análise estatística dos animais  $EPrnp^{+/+}$ ,  $EPrnp^{-/-}$  e  $EPrnp^{+/-}$  machos tratados com KA usando o animal  $EPrnp^{+/-}$  como parâmetro.

| Tipo de Animal | Convulsão (%) |            | RRE   | P     |
|----------------|---------------|------------|-------|-------|
|                | Não           | Sim        |       |       |
| $EPrnp^{+/+}$  | 14 (93,3%)    | 1 (6,7%)   | 0,286 | 0,287 |
| $EPrnp^{-/-}$  | 4 (26,7%)     | 11 (73,3%) | 11,0  | 0,003 |
| $EPrnp^{+/-}$  | 16 (80,0%)    | 4 (20,0%)  | 1,0   | -     |

**Tabela 5** - Análise estatística dos animais  $EPrnp^{+/+}$ ,  $EPrnp^{-/-}$  e  $EPrnp^{+/-}$  fêmeas tratadas com KA usando o animal  $EPrnp^{+/+}$  como parâmetro.

| Tipo de Animal | Convulsão (%) |            | RRE  | p     |
|----------------|---------------|------------|------|-------|
|                | Não           | Sim        |      |       |
| $EPrnp^{+/+}$  | 10 (83,3%)    | 2 (16,7%)  | 1,00 | -     |
| $EPrnp^{-/-}$  | 3 (17,6%)     | 14 (82,4%) | 23,3 | 0,002 |
| $EPrnp^{+/-}$  | 13 (65,0%)    | 7 (35,0%)  | 2,7  | 0,274 |

**Tabela 6** - Análise estatística dos animais  $EPrnp^{+/+}$ ,  $EPrnp^{-/-}$  e  $EPrnp^{+/-}$  fêmeas tratadas com KA usando o animal  $EPrnp^{+/-}$  como parâmetro.

| Tipo de Animal | Convulsão (%) |            | RRE   | p     |
|----------------|---------------|------------|-------|-------|
|                | Não           | Sim        |       |       |
| $EPrnp^{+/+}$  | 10 (83,3%)    | 2 (16,7%)  | 0,371 | 0,274 |
| $EPrnp^{-/-}$  | 3 (17,6%)     | 14 (82,4%) | 8,7   | 0,006 |
| $EPrnp^{+/-}$  | 13 (65,0%)    | 7 (35,0%)  | 1,0   | -     |

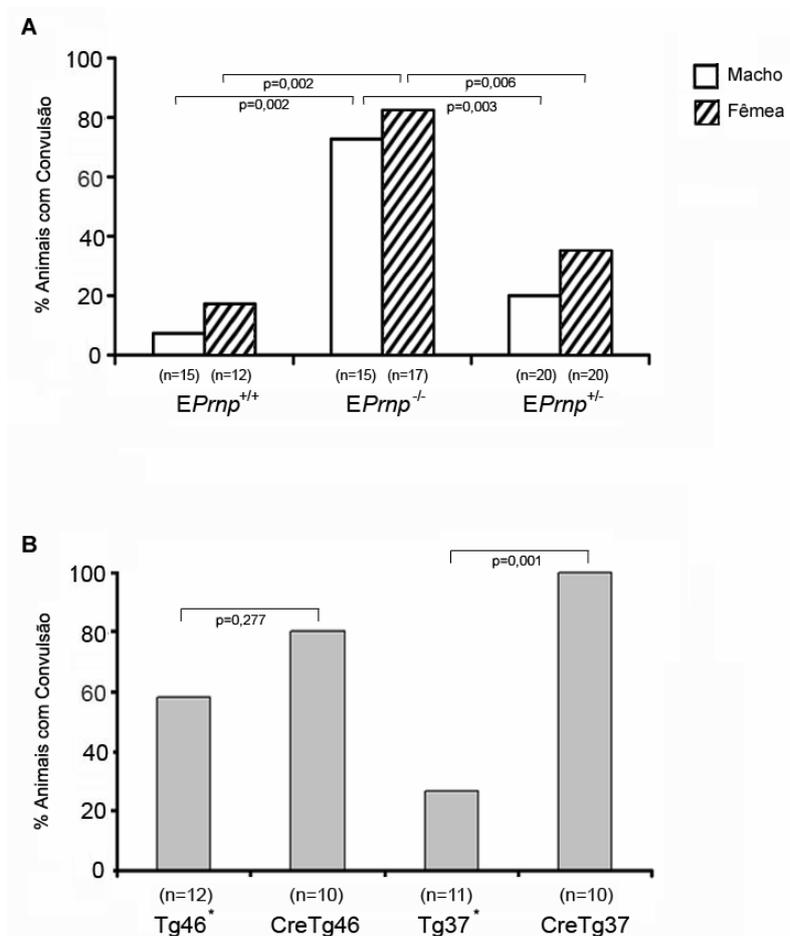
Esses dados estão de acordo com os obtidos para os animais  $ZPrnp^{0/0}$  (Figura 5) e mostram que a remoção do gene *Prnp* induz a uma maior sensibilidade à convulsão independente do sexo e das cepas dos animais. Além disso, a presença de apenas uma cópia do gene *Prnp* é suficiente para resgatar o fenótipo de maior sensibilidade a ácido caínico tanto nos machos como nas fêmeas.

Foram analisadas ainda as duas cepas de animais *knockouts* pós-natal Tg46\* (que tem expressão de PrP<sup>c</sup> semelhante ao tipo selvagem) e Tg37\* (que apresenta 3x mais PrP<sup>c</sup> no cérebro) (Figura 4 e MALLUCCI et al. 2002). Todos os animais foram avaliados após completarem 16 semanas uma vez que o gene *Prnp* é “desligado” entre a nona e décima segunda semanas pós-natal. Os animais foram genotipados e desta forma separados em 2 grupos: CreTg46 ou CreTg37 (animais que deixaram de expressar PrP<sup>c</sup> apenas nos neurônios, após 12 semanas) e comparados com animais da mesma prole que não receberam a Cre recombinase e que portanto, continuam expressando PrP<sup>c</sup>, respectivamente Tg46\* e Tg37\*. Na Figura 6B mostramos os resultados obtidos com machos que receberam a dose de 10mg de ácido caínico/Kg. A avaliação dos animais Tg46\* mostrou que 58% deles (7/12) apresentaram convulsão contra 80% (8/10) dos camundongos CreTg4 não havendo diferença significativa entre estes grupos ( $p=0,277$  Teste de Qui-Quadrado).

O tratamento da linhagem Tg37\* com ácido caínico levou 27% dos camundongos (3/11) à convulsão enquanto que 100% (10/10) dos animais da cepa de *knockout* pós-natal correspondente, CreTg37, apresentam este fenótipo. A análise dos dados mostrou que os animais que deixam de expressar PrP<sup>c</sup> apenas nos neurônios no período pós-natal CreTg37 apresentam uma sensibilidade maior ao

ácido caínico do que seus respectivos controles Tg37\* que mantêm a expressão desta proteína ( $p=0,001$ ).

Sabe-se que os animais Tg37 expressam três vezes mais PrP<sup>c</sup> que os Tg46 (Figura 4 e MALLUCCI et al. 2002), entretanto nenhuma diferença entre a sensibilidade a ácido caínico foi encontrada entre estes grupos (Figura 6B) ( $p=0,133$  teste de Qui-Quadrado).



**Legenda:** (A) Camundongos machos ou fêmeas das linhagens EPrnp<sup>+/+</sup>, EPrnp<sup>-/-</sup> e EPrnp<sup>+/-</sup> ou (B) machos das linhagens Tg46\*, CreTg46, Tg37\* e CreTg37 foram tratados com 10mg/kg de KA via intraperitoneal. Os valores representam a porcentagem os animais que entraram em convulsão (pelo menos estágio III na escala de racine). Os números colocados abaixo das barras representam o número de animais por grupo. A análise estatística foi feita usando Teste de Qui-Quadrado e os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

**Figura 6** – Convulsão induzida por KA nas linhagens EPrnp e knockouts pós-natal.

### 4.3 DESCRIÇÃO DA SEMIOLOGIA DAS CRISES CONVULSIVAS

Todos os animais foram observados por 120 minutos após a injeção da droga e tiveram suas crises classificadas pela escala de Racine. Os resultados estão colocados na tabela 7.

Nas cepas *ZPrnp<sup>+/+</sup>*, *ZPrnp<sup>0/0</sup>* e C57/BL6J as convulsões foram caracterizadas por uma seqüência de manifestações comportamentais progressivas na escala de Racine de I a V. Nestes grupos todos os animais atingiram a escala V de Racine, tendo crises límbicas generalizadas.

Dos animais *ZPrnp<sup>+/+</sup>* que tiveram convulsão (n=38), 97% entraram em *Status Epilepticus*, sendo a primeira manifestação clínica num tempo médio de 47 min após a injeção da droga e apresentaram crises recorrentes durante o período de observação. Dos animais C57/BL6J que tiveram convulsão (n=13), o tempo médio para a primeira manifestação convulsiva foi de 52 min. após a injeção da droga, 100% deles entraram em *Status Epilepticus* e tiveram crises recorrentes durante o período de observação. Dos animais *ZPrnp<sup>0/0</sup>* que apresentaram convulsão (n=50), 96% entraram em *Status Epilepticus*, a primeira manifestação foi em média após 36 min da injeção da droga e tiveram crises recorrentes durante o período de observação.

Os animais Tg20 que convulsionaram não seguiram o padrão da escala de Racine. Todos iniciaram a primeira manifestação já no estágio V, em um tempo médio de 63 min. Os 6 animais que convulsionaram entraram em *Status Epilepticus*, sendo que um morreu após sucessivas crises generalizadas. Além disso, dois animais

analisados na dose 25mg/Kg que não haviam convulsionado, morreram menos de 24 h após o experimento.

Nas cepas *EPrnp<sup>+/+</sup>*, *EPrnp<sup>-/-</sup>* e *EPrnp<sup>+/-</sup>* as convulsões foram caracterizadas por uma seqüência de manifestações comportamentais progressivas na escala de Racine de I a V. Dos 3 animais *EPrnp<sup>+/+</sup>* que tiveram convulsão, 66% entraram em *Status Epileticus* e tiveram crises recorrentes durante o período de observação. Dois animais deste grupo atingiram a escala V de Racine e um deles permaneceu na escala III. O tempo médio para a primeira manifestação clínica foi de 53 min. Dos animais *EPrnp<sup>-/-</sup>* que apresentaram convulsão (n=25), 88% entraram em *Status Epileticus* e tiveram crises recorrentes durante o período de observação. Neste grupo 19 animais atingiram a escala V de Racine, enquanto que 6 animais permaneceram no estágio III. O tempo médio para a primeira manifestação clínica foi de 50 min. Dos 11 animais *EPrnp<sup>+/-</sup>* que tiveram convulsão, 72% entraram em *Status Epileticus* e tiveram crises recorrentes durante o período de observação. Neste grupo 9 animais atingiram a escala V de Racine, e 2 animais permaneceram no estágio III. O tempo médio para a primeira manifestação clínica foi de 55 min.

Dos animais CreTg46 que apresentaram convulsão (n=8) 100% entraram em *Status Epileticus*, sendo a primeira manifestação clínica num tempo médio de 36 min após a injeção da droga e apresentaram crises recorrentes durante o período de observação. Já o seu respectivo controle Tg46, dos animais que apresentaram convulsão (n=7) 100% entraram em *Status Epileticus*, sendo a primeira manifestação clínica num tempo médio de 40 min após a injeção da droga e apresentaram crises recorrentes durante o período de observação.

Dos animais CreTg37 que apresentaram convulsão (n=10), 100% entraram em *Status Epilepticus*, sendo a primeira manifestação clínica num tempo médio de 39 min após a injeção da droga e apresentaram crises recorrentes durante o período de observação. Já os seus respectivos controles Tg37, que apresentaram convulsão (n=3) 100% entraram em *Status Epilepticus*, sendo a primeira manifestação clínica num tempo médio de 40 min após a injeção da droga e apresentaram crises recorrentes durante o período de observação.

Nos grupos de animais Tg37\*, Tg46\*, CreTg37 e CreTg46 as convulsões foram caracterizadas por uma seqüência de manifestações comportamentais progressivas na escala de Racine de I a V, sendo que todos os animais que apresentaram convulsão atingiram a escala V de Racine, tendo crises límbicas generalizadas.

**Tabela 7** - Descrição da semiologia das crises convulsivas induzidas pelo tratamento com KA nos camundongos usados neste estudo.

| Animais                     | Dose de ácido caínico (mg/kg) | Número de animais com convulsão | % <i>Status Epilepticus</i> | Tempo médio da primeira crise (min.) | Observações                                 |
|-----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|---|
| <i>ZPrnp</i> <sup>+/+</sup> | 10, 12,5 e 15                 | 38                              | 97                          | 47                                   |   |
| C57Bl6J                     | 10 e 12,5                     | 13                              | 100                         | 52                                   |   |
| <i>ZPrnp</i> <sup>0/0</sup> | 5, 7,5 e 10                   | 50                              | 96                          | 36                                   |   |
| Tg20                        | 25                            | 6                               | 100                         | 63                                   | Direto ao estágio V<br>3 óbitos em 24 horas |
| <i>EPrnp</i> <sup>+/+</sup> | 10                            | 3                               | 66                          | 53                                   | 2 no estágio V<br>1 no estágio III          |
| <i>EPrnp</i> <sup>+/-</sup> | 10                            | 25                              | 88                          | 50                                   | 19 no estágio V<br>6 no estágio III         |
| <i>EPrnp</i> <sup>-/-</sup> | 10                            | 11                              | 72                          | 55                                   | 9 no estágio V<br>2 no estágio III          |
| CreTg37                     | 10                            | 10                              | 100                         | 39                                   |   |
| Tg37*                       | 10                            | 3                               | 100                         | 40                                   |   |
| CreTg46                     | 10                            | 8                               | 100                         | 36                                   |   |
| Tg46*                       | 10                            | 7                               | 100                         | 40                                   |   |

#### 4.4 MODELO DE CONVULSÃO INDUZIDA QUIMICAMENTE POR PENTILENOTETRAZOL EM CAMUNDONGOS

A sensibilidade a convulsão foi avaliada em todos os animais descritos anteriormente utilizando 40mg PTZ/Kg animal. A Figura 7A mostra os experimentos nos animais tipo selvagem - *ZPrnp*<sup>+/+</sup> e C57/BL6J, animais nocaute (*ZPrnp*<sup>0/0</sup>) e Tg20, todos machos. Nos animais *ZPrnp*<sup>+/+</sup>, foram analisados 13 animais, sendo que 92% deles apresentaram convulsão com 23% de mortalidade. Nos animais C57/BL6J foram analisados 10 animais dos quais 90% convulsionaram, e destes, 20% morreram. Foram avaliados 13 animais *ZPrnp*<sup>0/0</sup> onde 100% convulsionaram e 85% deles morreram. Não houve diferença significativa quanto ao aparecimento de convulsão entre estes grupos. Entretanto os animais *ZPrnp*<sup>0/0</sup> apresentam um risco 18,33 vezes maior de morte após crise convulsiva que os *ZPrnp*<sup>+/+</sup> (Tabelas 8 e 9; p=0,004, teste de Qui-Quadrado).

No grupo de Tg20, apenas 10% dos animais convulsionaram (n=10) e nenhum animal morreu. Portanto, estes animais apresentam uma maior resistência à convulsão que os animais tipo selvagem  $ZPrnp^{+/+}$  ou C57/B16J ( $p < 0,001$ , teste de Qui-Quadrado).

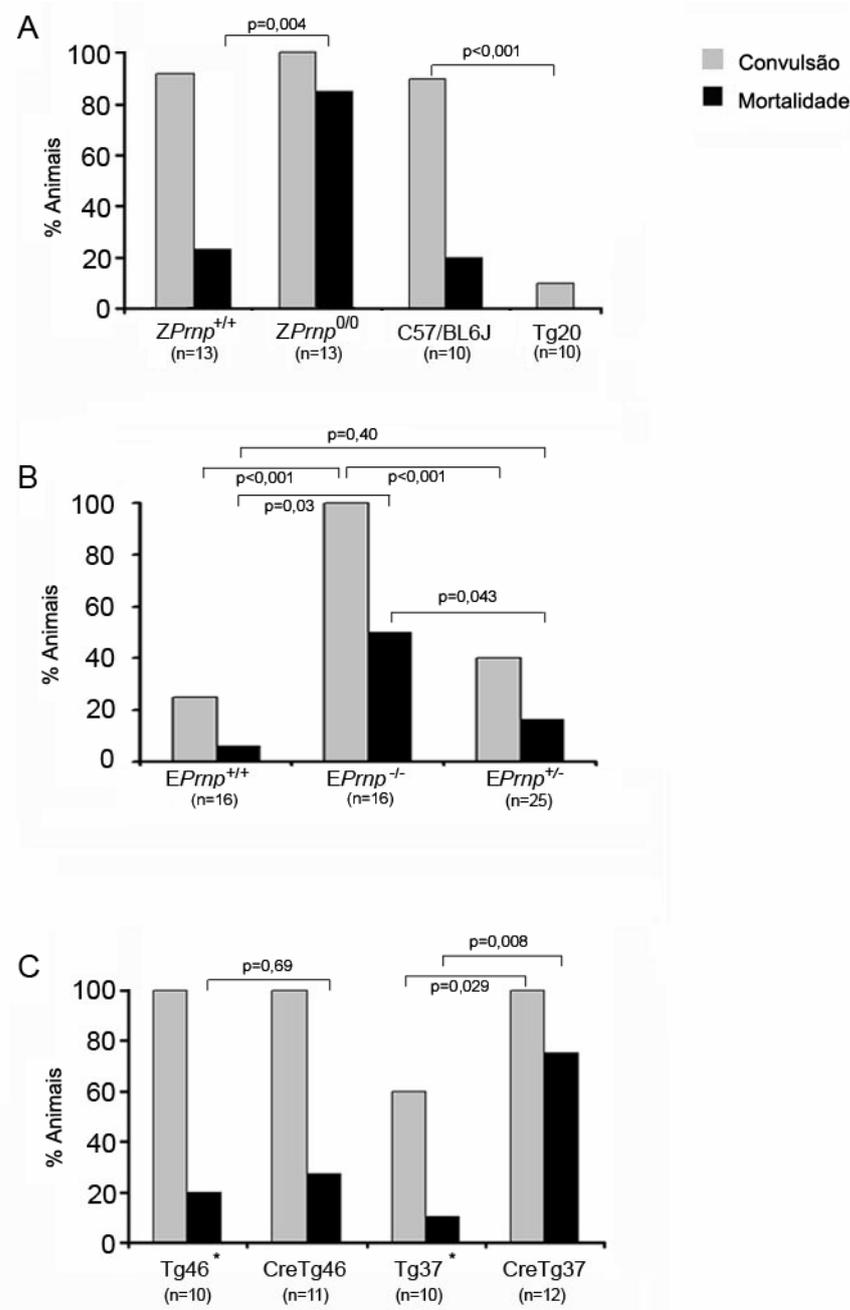
A Figura 7B mostra o experimento de convulsão induzida por PTZ com animais *Edbg* machos. Foram analisados 16 animais  $EPrnp^{+/+}$ , dos quais 25% convulsionaram e 6% morreram. Dos 16 animais  $EPrnp^{-/-}$  100% convulsionaram e destes 47% morreram. Dos 25 animais  $EPrnp^{+/-}$ , 40% tiveram convulsão e 16% destes morreram. Analisando o parâmetro convulsão, as diferenças entre os animais  $EPrnp^{+/+}$  e  $EPrnp^{-/-}$  e entre  $EPrnp^{+/-}$  e  $EPrnp^{-/-}$  foram estatisticamente significativas ( $p < 0,001$  para os dois grupos) e entre  $EPrnp^{+/+}$  e  $EPrnp^{+/-}$  a diferença não foi estatisticamente significativa ( $p = 0,742$ , teste de Qui-Quadrado).

Quando o parâmetro analisado foi morte, vemos que à semelhança do observado para convulsão, os animais  $EPrnp^{-/-}$  apresentaram um risco 12,6 vezes maior de ir a óbito após a convulsão do que os  $EPrnp^{+/+}$  (tabela, 10;  $p = 0,03$ ) e 4,2 vezes maior se comparados aos  $EPrnp^{+/-}$  (tabela 11,  $p = 0,037$ ). Não houve diferença entre a mortalidade dos animais  $EPrnp^{+/+}$  e  $EPrnp^{+/-}$  (tabelas 10 e 11;  $p = 0,40$ ).

Na Figura 7C foram avaliados animais *knockout* condicionais e respectivos controles, todos machos na dose de 40mg de PTZ/Kg de animal. Dos 11 animais CreTg46 analisados, todos convulsionaram e 20% foram a óbito e igualmente 100% dos animais Tg46\* (n=10), convulsionaram e 20% morreram. Portanto, não houve diferenças quanto à convulsão ou morte (tabela 12;  $p = 0,69$ ) entre estes dois grupos. Já na linhagem de *knockout* pós-natal Tg37\*, 60% dos animais convulsionaram e 10% deles morreram (n=10) enquanto que o animal CreTg37 que deixou de

expressar PrP<sup>c</sup> nos neurônios, 100% dos camundongos convulsionaram e 75% morreram (n=12). Desta forma, este último animal *knockout* condicional apresenta maior sensibilidade à convulsão (p = 0,001) e um risco 27 vezes maior de morte após convulsão que os seu respectivos controle (Tabela 13; p=0,008). Não existem diferenças entre os animais Tg46\* e Tg37\* quanto às convulsões (p=0,087) e mortalidade por PTZ (tabelas 12 e 13; p = 0,53).

Este grupo de resultados mostra que independente do *background* genético e da construção feita para a remoção do gene *Prnp*, animais que não expressam PrP<sup>c</sup> são mais susceptíveis à convulsão induzida farmacologicamente. Além disso, uma vez que animais que deixam de expressar PrP<sup>c</sup> apenas em neurônios no período pós-natal também apresentam maior sensibilidade a convulsões, podemos admitir que este fenótipo envolve um mau funcionamento neuronal.



**Legenda:** (A) Camundongos machos das linhagens ZPrnp<sup>+/+</sup>, ZPrnp<sup>0/0</sup> C57Bl6J e Tg20 (B) EPrnp<sup>+/+</sup>, EPrnp<sup>-/-</sup> e EPrnp<sup>+/-</sup> ou (C) Tg46\*, Cre-Tg46, Tg37\* e Cre-Tg37 foram tratados com 40mg/kg de PTZ via intraperitoneal. Os valores representam a porcentagem os animais que entraram em convulsão (pelo menos estágio III na escala de racine)  ou a mortalidade . Os números colocados abaixo das barras representam o número de animais por grupo. A análise estatística foi feita usando o Teste de qui-quadrado e os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

**Figura 7** – Convulsão induzida por PTZ em diferentes linhagens de camundongos *knockout* para *Prnp* ou transgênicos que superexpressam *Prnp*.

**Tabela 8** - Análise estatística dos animais  $ZPrnp^{+/+}$ ,  $ZPrnp^{0/0}$  e C57/BL6J machos tratados com PTZ que morreram usando o animal  $ZPrnp^{+/+}$  como parâmetro.

| Tipo de Animal | Convulsão (%) |            | RRE   | p     |
|----------------|---------------|------------|-------|-------|
|                | Não           | Sim        |       |       |
| $ZPrnp^{+/+}$  | 10 (76,9%)    | 3 (23,1%)  | 1,0   | -     |
| $ZPrnp^{0/0}$  | 2 (15,4%)     | 11 (84,6%) | 18,33 | 0,004 |
| C57/BL6J       | 8 (80,0%)     | 2 (20%)    | 0,833 | 0,859 |

**Tabela 9** - Análise estatística dos animais  $ZPrnp^{+/+}$ ,  $ZPrnp^{0/0}$  e C57/BL6J machos tratados com PTZ que morreram usando o animal C57/BL6J como parâmetro.

| Tipo de Animal | Convulsão (%) |            | RRE  | p     |
|----------------|---------------|------------|------|-------|
|                | Não           | Sim        |      |       |
| $ZPrnp^{+/+}$  | 10 (76,9%)    | 3 (23,1%)  | 1,2  | 0,859 |
| $ZPrnp^{0/0}$  | 2 (15,4%)     | 11 (84,6%) | 22,0 | 0,005 |
| C57/BL6J       | 8 (80,0%)     | 2 (20%)    | 1,0  | -     |

**Tabela 10** - Análise estatística dos animais  $EPrnp^{+/+}$ ,  $EPrnp^{-/-}$  e  $EPrnp^{+/-}$  machos tratados com PTZ que morreram usando o animal  $EPrnp^{+/+}$  como parâmetro.

| Tipo de Animal | ÓBITO (%)  |           | RRE   | p    |
|----------------|------------|-----------|-------|------|
|                | Não        | Sim       |       |      |
| $EPrnp^{+/+}$  | 14 (93,3%) | 1 (6,7%)  | 1,0   | -    |
| $EPrnp^{-/-}$  | 8 (53,3%)  | 7 (46,7%) | 12,25 | 0,03 |
| $EPrnp^{+/-}$  | 21 (84,0%) | 4 (16,0%) | 2,67  | 0,40 |

**Tabela 11** - Análise estatística dos animais  $EPrnp^{+/+}$ ,  $EPrnp^{-/-}$  e  $EPrnp^{+/-}$  machos tratados com PTZ que morreram usando o animal  $EPrnp^{+/-}$  como parâmetro.

| Tipo de Animal | ÓBITO (%)  |           | RRE   | p     |
|----------------|------------|-----------|-------|-------|
|                | Não        | Sim       |       |       |
| $EPrnp^{+/+}$  | 14 (93,3%) | 1 (6,7%)  | 0,375 | 0,40  |
| $EPrnp^{-/-}$  | 8 (53,3%)  | 7 (46,7%) | 4,59  | 0,043 |
| $EPrnp^{+/-}$  | 21 (84,0%) | 4 (16,0%) | 1,0   | -     |

**Tabela 12** - Análise estatística dos animais nocautes pós-natal e seus respectivos controles machos tratados com PTZ que morreram usando o animal Tg46\* como parâmetro.

| Tipo de Animal | ÓBITO (%) |           | RRE  | p     |
|----------------|-----------|-----------|------|-------|
|                | Não       | Sim       |      |       |
| Tg 46 *        | 8 (80,0%) | 2 (20,0%) | 1,00 | -     |
| CreTg46        | 8 (72,7%) | 3 (27,3%) | 1,5  | 0,69  |
| Tg 37*         | 9 (90%)   | 1 (10,0%) | 0,44 | 0,53  |
| CreTg37        | 3 (25,0%) | 9 (75,0%) | 12,0 | 0,016 |

**Tabela 13** - Análise estatística dos animais nocautes pós-natal e seus respectivos controles machos tratados com PTZ que morreram usando o animal CreTg37 como parâmetro.

| Tipo de Animal | ÓBITO (%) |           | RRE  | P     |
|----------------|-----------|-----------|------|-------|
|                | Não       | Sim       |      |       |
| Tg 46 *        | 8 (80,0%) | 2 (20,0%) | 2,2  | 0,53  |
| CreTg46        | 8 (72,7%) | 3 (27,3%) | 3,3  | 0,33  |
| Tg 37*         | 9 (90%)   | 1 (10,0%) | 1,00 | 1,00  |
| CreTg37        | 3 (25,0%) | 9 (75,0%) | 27,0 | 0,008 |

## 5 RESULTADOS II - HUMANOS

### 5.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE DHPLC (CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE FASE REVERSA DENATURANTE) PARA DETECÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE *PRNP*

O uso da técnica de DHPLC é muito vantajoso para a detecção de variantes alélicas nos genes de interesse e representa um ganho importante por ser uma técnica mais rápida e menos dispendiosa que o seqüenciamento (XIAO e OEFNER 2001). A técnica foi empregada para analisar 553 amostras de DNA humanos.

Na padronização da técnica de DHPLC para a pesquisa de polimorfismos no gene de *PRNP* foram modificamos os iniciadores utilizados inicialmente no seqüenciamento. Para as reações de seqüenciamento a seqüência aberta de leitura (ORF) de *PRNP* era dividida em duas metades que se sobrepunham na região central. Desta forma, o códon 129 estava contemplado quando se seqüenciava cada uma das metades. A mudança visou diminuir a sobreposição destes dois fragmentos de tal forma que se excluísse o códon 129, altamente polimórfico da segunda metade amplificada da ORF de *PRNP*. Desta maneira a presença deste polimorfismo não interferiria na detecção, por exemplo, de polimorfismos no códon 171.

Os produtos de PCR obtidos da amplificação de *PRNP* com estes dois novos pares de iniciadores foram submetidos a uma análise cromatográfica (DHPLC). Os

detalhes a respeito desta técnica e os perfis de saída do DHPLC são mostrados no trabalho realizado pelo nosso grupo (CASTRO et al. 2004).

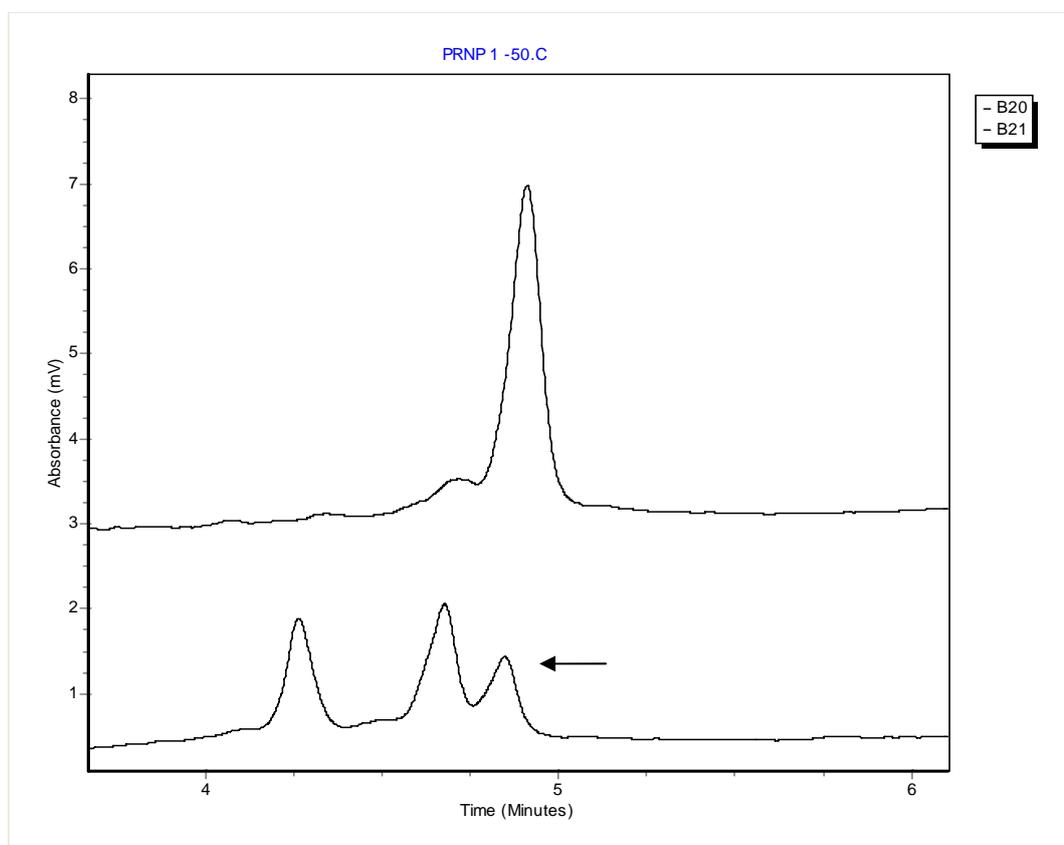
As amostras foram inicialmente avaliadas quanto à qualidade de amplificação numa reação realizada a 50°C, como pode ser visto na Figura 8. Nesta temperatura já é possível verificar a presença de alterações que envolvam deleções ou inserções, neste caso a depleção de um *octarepeat* (indicado por uma seta), presente em aproximadamente 10% da população.

Em seguida as amostras foram analisadas para se verificar a presença ou não de polimorfismos e mutações. Como pode ser visto na Figura 9, nesta análise feita a 65°C, foram encontrados cromatogramas específicos para o polimorfismo no códon 129 em heterozigose (M129V) e em homozigose que apresenta um pico único. Esta saída de pico único pode representar uma amostra M129M ou V129V. Todas as amostras que apresentam este perfil único de saída são misturadas a um DNA protótipo no caso M129M. Se o cromatograma obtido então continuar sendo de um pico único, comprovamos a presença de metionina em homozigose no códon 129 para esta amostra. Caso o perfil obtido seja semelhante ao da amostra M129V, comprovamos que a amostra que inicialmente tinha um pico único era de um homozigoto V129V.

É possível ainda verificarmos que o perfil obtido pelo cromatograma é bastante específico e pode determinar a presença de mais que um polimorfismo na mesma seqüência. No caso o perfil intermediário na Figura 9 representa um polimorfismo silencioso no códon 117 associado à heterozigose no códon 129.

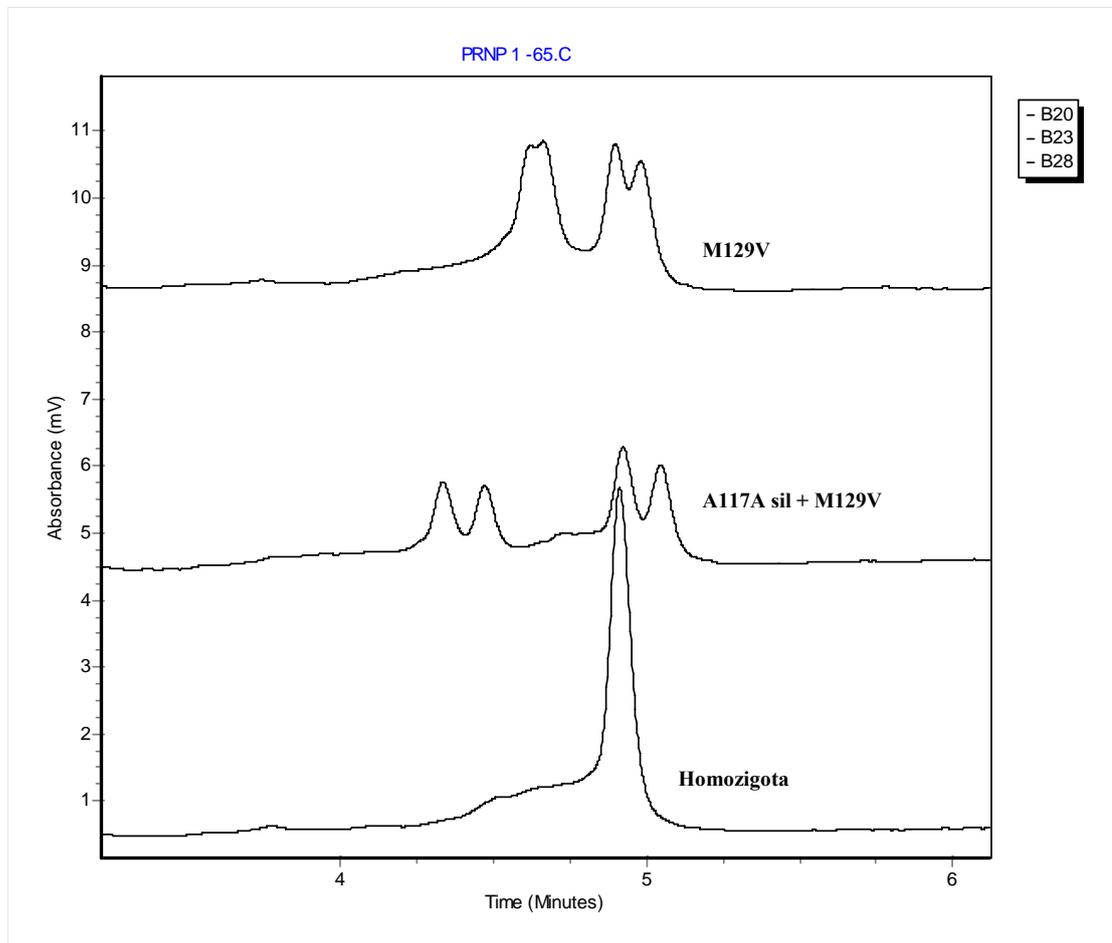
A especificidade do padrão dos picos está também apresentada na Figura 10 onde vemos a presença de um polimorfismo silencioso no códon 124 (G124G). Este

padrão foi determinado depois da publicação do artigo de CASTRO et al. (2004). A Figura 11 mostra o perfil obtido para o produto amplificado do fragmento correspondente à segunda metade da ORF do gene *PRNP*. Nesta análise feita a 61°C, podemos verificar a presença do polimorfismo do códon 171 (N171S) em heterozigose quando comparado a uma amostra selvagem.



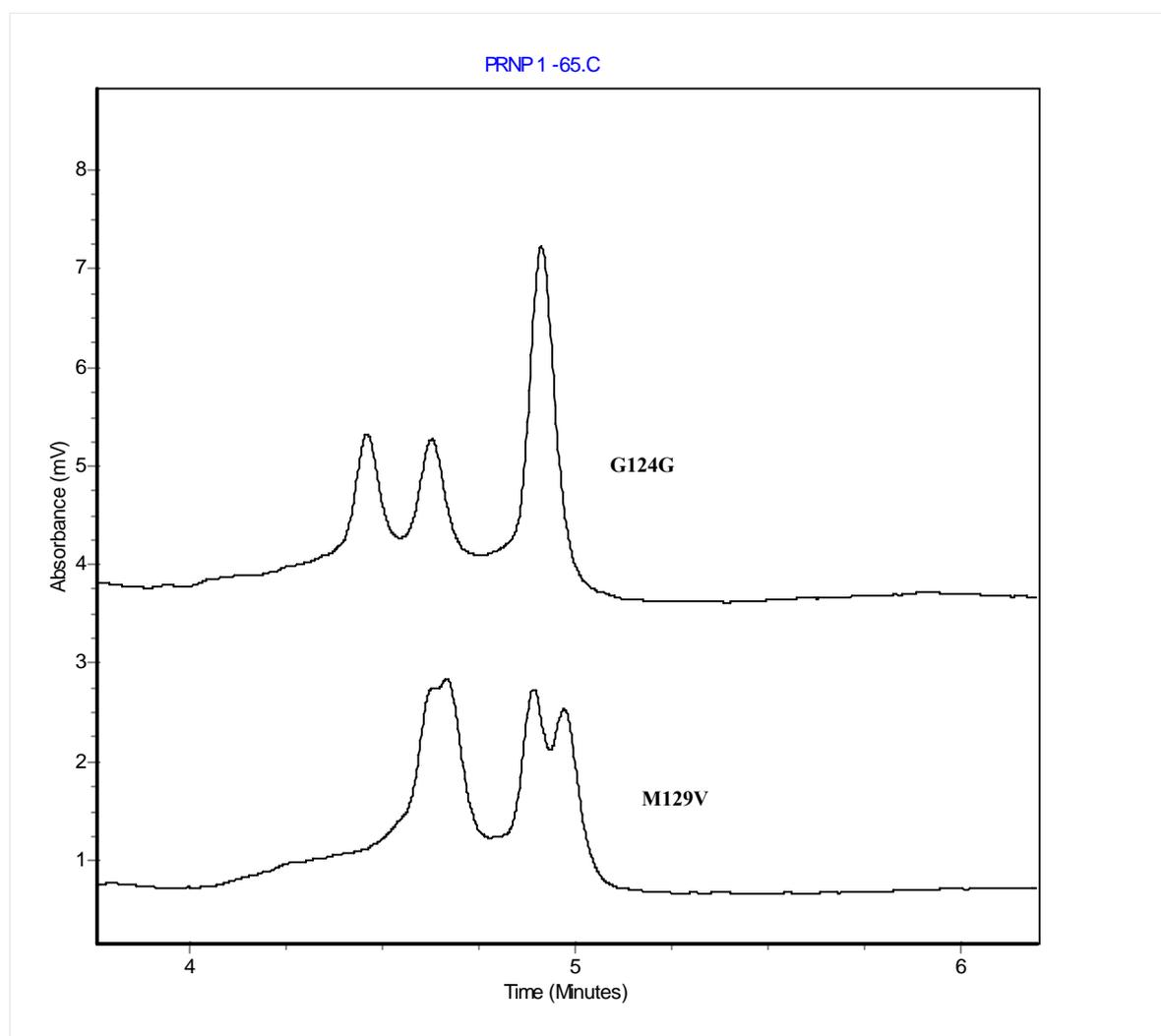
**Legenda:** Exemplo de cromatograma obtido por DHPLC em uma análise realizada a 50°C do produto amplificado da primeira metade de *PRNP*, demonstrando que a amplificação foi de boa qualidade. Nesta temperatura já é possível detectar alterações maiores na seqüência amplificada como a amostra que possui depleção de um *octarepeat* em heterozigose (indicado por uma seta).

**Figura 8** – Perfil de DHPLC para o protótipo e depleção de um *octarepeat* em *PRNP*.



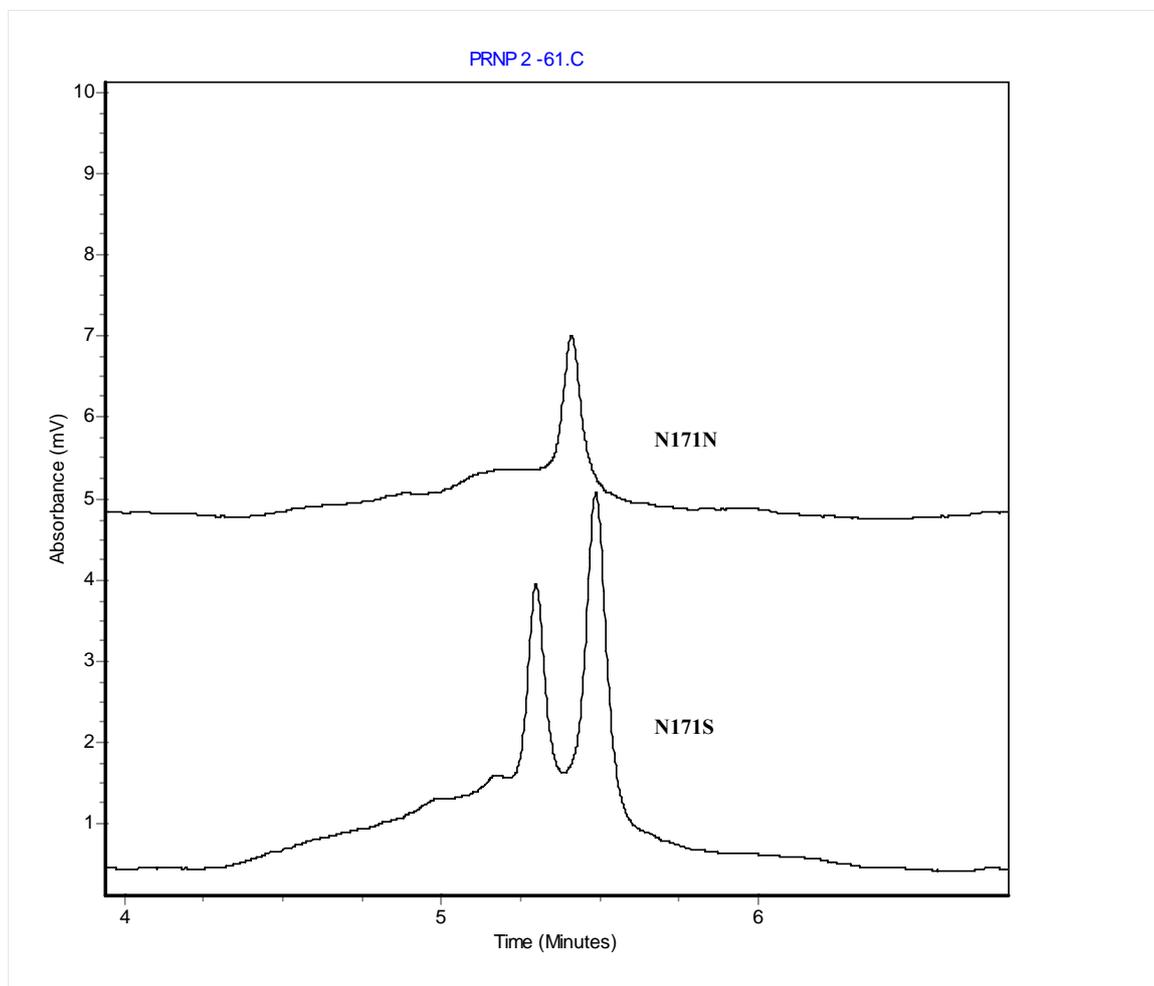
**Legenda:** Exemplo de cromatograma do DHPLC em uma análise realizada a 65°C do produto amplificado da primeira metade de *PRNP*. Neste cromatograma, pode-se verificar que uma amostra homozigota, uma que possui o polimorfismo no códon 129 em heterozigoze (M129V) e ainda uma amostra com o polimorfismo no códon 129 associado ao polimorfismo silencioso do códon 117 (A117A sil).

**Figura 9** – Perfil de DHPLC das variantes alélicas A117A sil e M129V de *PNRP*.



**Legenda:** Exemplo de cromatograma do DHPLC com as amostras analisadas a 65° C do produto amplificado da primeira metade de *PRNP* onde se verificou a presença de uma alteração no códon 124 - polimorfismo silencioso G124G.

**Figura 10** - Perfil de DHPLC das variantes alélicas G124G sil. e M129V de *PRNP*.

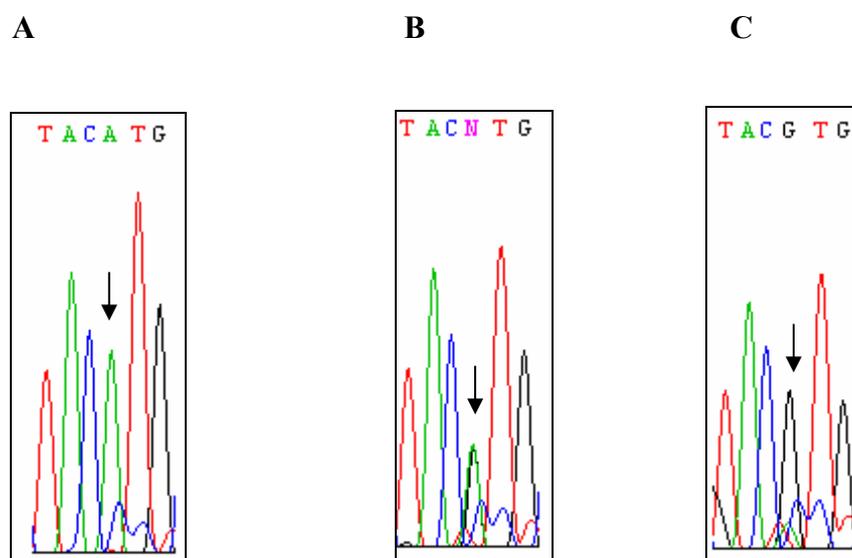


**Legenda:** Exemplo de cromatograma obtido por DHPLC em uma análise realizada a 61° C do produto amplificado da segunda metade de *PRNP*. Neste cromatograma, pode-se comparar o perfil encontrado de uma amostra selvagem, sem alteração com uma amostra onde foi encontrada a variante alélica N171S.

**Figura 11** - Perfil de DHPLC da variante alélica N171S de *PRNP*.

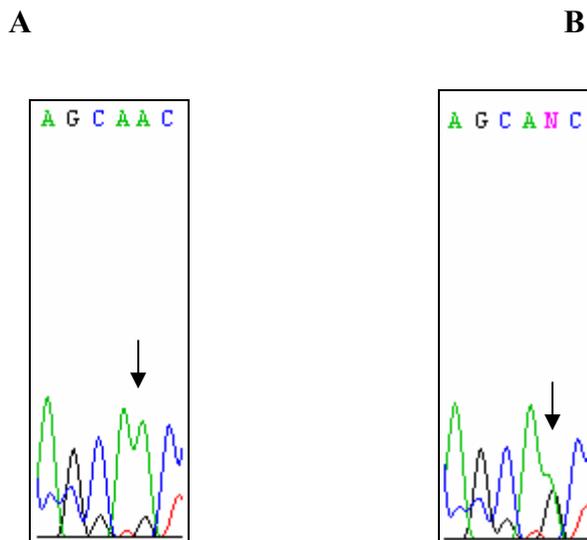
Durante a padronização da técnica de DHPLC todos os perfis obtidos para os diferentes polimorfismos e mutações eram confirmados também por sequenciamento e digestão por endonucleases. A enzima foi usada principalmente para a confirmação dos casos com alteração silenciosa no códon 117.

A Figura 12 mostra os eletroferogramas obtidos para amostras M129M, M129V e V129V e a Figura 13 mostra os padrões para os polimorfismos N171N e N171S.



**Legenda:** Eletroesferogramas específicos obtidos do sequenciamento da região do códon 129 de *PRNP*. Na figura A, apresenta uma amostra M129M, na figura B, uma amostra com a variante M129V e na figura C, uma amostra com a variante V129V.

**Figura 12** - Eletroesferogramas do sequenciamento de *PRNP* na região do códon 129.



**Legenda:** Eletroferogramas específicos obtidos do seqüenciamento da região do códon 171 de *PRNP*. Na figura A, apresenta uma amostra N171N e na figura B, uma amostra N171S.

**Figura 13** - Eletroesferogramas do seqüenciamento de *PRNP* na região do códon 171.

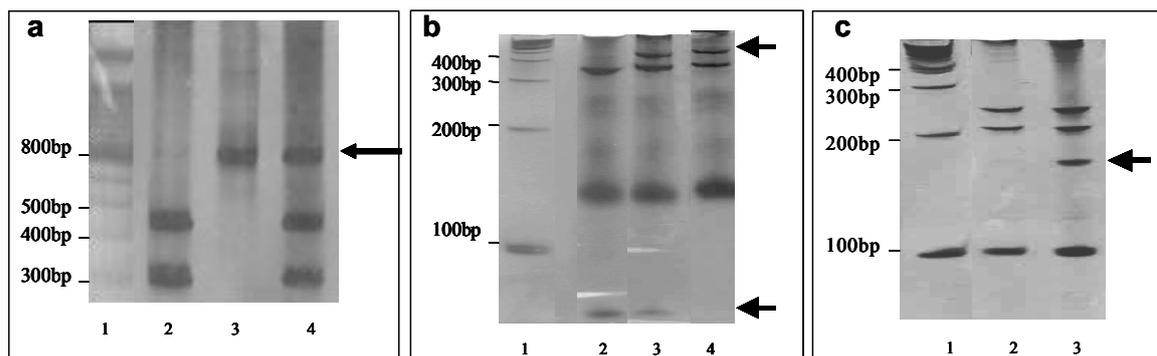
Numa terceira abordagem para reforçar os resultados obtidos nas duas técnicas usadas acima utilizamos endonucleases específicas (Figura 14). A digestão da ORF de *PRNP* com a endonuclease PvuII (Figura 14A) gera duas bandas na seqüência protótipo de 331 e 466 pares de bases (linha 2). A linha 3 mostra uma amostra não digerida e a linha 4 a presença de um polimorfismo silencioso em heterozigose no códon 117 (GCA por GCG), onde um dos alelos perde o sítio de clivagem para esta enzima, o que leva a ocorrência de uma terceira banda equivalente ao produto não clivado.

Já a digestão pela enzima NspI que reconhece o códon 129 está mostrada na Figura 14B. As amostras de indivíduos homozigotos M129M apresentam 3 bandas, uma de 366, outra de 356 e uma última de 75 pb (linha 2). A presença do alelo polimórfico no códon 129 (ATG-GTG) abole um dos sítios de restrição, gerando

uma banda de 430 pb e a perda da banda de 75 pb. A linha 3 mostra a digestão de um DNA que possui o polimorfismo do códon 129 em heterozigose e a linha 4 uma amostra V129V em homozigose.

A digestão pela endonuclease BbvI, vista na Figura 14C, identifica variantes alélicas no códon 171. A seqüência contendo AAC em homozigose no códon 171 (N171N) gera 3 fragmentos de 251, 206 e 95pb (linha 2), enquanto a presença do alelo polimórfico (N171S – AAC - AGC) cria um novo sítio resultando em novos fragmentos de 166 e 46 pb (linha 3).

Portanto, o emprego destas três técnicas assegura a avaliação adequada dos polimorfismos no gene *PRNP*.



**Legenda** Análise dos polimorfismos na seqüência de *PRNP* usando enzimas de restrição. A ORF do gene *PRNP* foi amplificada e digerida com enzimas de restrição. (A) PvuII, linha 1 = controle de 100pb, linha2 = amostra sem o polimorfismo no códon 117, linha 3 = controle da digestão sem o uso da enzima (*uncut*) e linha 4 = amostra de um portador do polimorfismo silencioso no códon 117. (B) NspI, linha 1 = controle de 100pb, linha 2 = amostra M129M, linha 3 = amostra M129V e linha 4 = amostra V129V. (C) BbvI, linha 1 = controle de 100pb, linha 2 = amostra N171N, linha 3 = amostra N171S.

**Figura 14** - Digestão da ORF de *PRNP* com enzimas de restrição para caracterização de variantes alélicas nos códons 117, 129 e 171.

## 5.2 AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE *PRNP* EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROMES EPILÉTICAS E EM INDIVÍDUOS NORMAIS

A prevalência dos polimorfismos no gene *PRNP* de pacientes portadores de epilepsia (n = 270) foi comparada com a observada nos controles (N = 202). Os resultados desta análise são apresentados na tabela 14. A frequência observada do genótipo Ala/Ala<sub>sil</sub> do códon 117 foi de 4,5% nos controles e 6,7% nos pacientes (p=0,31). Da mesma forma não houve diferença estatisticamente significativa na frequência observada na alteração do códon 171 (N171S) entre controles (0%) e pacientes (1,5%) (p=0,14). Houve uma tendência para maior prevalência da depleção do *octarepeat* entre os pacientes quando comparado aos controles, após o ajuste para sexo e genótipo no códon 117 e 129. Quando analisado o códon 129, observou-se que os pacientes apresentaram um risco relativo estimado (RRE) para a presença do alelo variante em homozigose (V129V) cerca de 3 vezes maior que o grupo controle (IC 95% 1,36 – 6,55). O ajuste para sexo e genótipo do 117 e depleção do *octarepeat* não modificou o resultado (p = 0,007).

Na tabela 15 são apresentadas as prevalências dos alelos variantes em pacientes com epilepsia focal. A frequência observada do genótipo Ala/Ala<sub>sil</sub> do códon 117 foi de 6,5% entre os pacientes, semelhante à observada no grupo controle (p=0,40). Também a prevalência da depleção do *octarepeat* entre pacientes com epilepsia focal (8,3%) foi semelhante à observada nos controles (p = 0,19).

Após o ajuste houve uma tendência para uma maior frequência do genótipo V129V entre pacientes com epilepsias focais quando comparados aos controles

(RRE de 2,67, IC95% 1,13-6,34,  $p = 0,02$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa na frequência observada do genótipo no códon 171 entre controles (0%) e pacientes (1,8%), ( $p = 0,10$ ).

A frequência de variantes alélicas de *PRNP* observada entre pacientes portadores de epilepsias generalizadas primárias ou idiopáticas está apresentada na tabela 16. Após o ajuste, não houve diferença nas frequências das variantes alélicas do *PRNP* dos códons 117, 129 e 171 entre pacientes e controles ( $p > 0,15$ ). Entretanto, houve uma tendência para maior prevalência da depleção do *octarepeat* no grupo de pacientes (RRE 2,82, IC 95% 0,89 – 8,91,  $p = 0,08$ ) em comparação aos controles.

Portanto, a amostra analisada de pacientes com epilepsia apresenta uma maior frequência da variante alélica V129V quando comparado com o grupo controle. Esta observação é mantida quando se avalia o subgrupo de pacientes com epilepsias focais, mas não se confirma no grupo de pacientes com epilepsias generalizadas ou idiopáticas.

**Tabela 14** - Risco Relativo Estimado (RRE) e intervalo de confiança de 95% para epilepsia (n= 270) de acordo com a presença das variantes alélicas do gene *PRNP*.

| Códon    | Genótipo               | Expostos (%)             |                  | RRE Bruto          |                 | RRE Ajustado <sup>a</sup>       |                 |
|----------|------------------------|--------------------------|------------------|--------------------|-----------------|---------------------------------|-----------------|
|          |                        | Controles<br>N = 202 (%) | Casos<br>N = 270 | RRE (IC 95%)       | Nível de<br>"p" | RRE (IC 95%)                    | Nível de<br>"p" |
| 117      | Ala/Ala                | 193 (95,5)               | 252 (93,3)       | 1,0                |                 | 1,0                             |                 |
|          | Ala/Ala <sub>sil</sub> | 9 (4,5)                  | 18 (6,7)         | 1,53 (0,67 – 3,48) | 0,31            | 1,48 (0,63 – 3,45) <sup>a</sup> | 0,36            |
| 129      | Met/Met                | 112 (55,4)               | 129 (47,8)       | 1,0                |                 | 1,0                             |                 |
|          | Met/Val                | 81 (40,1)                | 110 (40,7)       | 1,18 (0,84 – 1,73) | 0,40            | 1,16 (0,78 – 1,72) <sup>b</sup> | 0,45            |
|          | Val/Val                | 9 (4,5)                  | 31 (11,5)        | 2,99 (1,36 – 6,55) | 0,006           | 2,98 (1,35 – 6,58) <sup>b</sup> | 0,007           |
| 171      | Asn/Asn                | 202 (100)                | 266 (98,5)       | 1,0                |                 |                                 |                 |
|          | Asn/Ser                | 0                        | 4 (1,5)          | N.A.               | 0,14            | N.A.                            | N.A.            |
| Depleção | Ausente                | 192 (95)                 | 243 (90)         | 1,0                |                 | 1,0                             |                 |
| OctaR    | Presentee              | 10 (5)                   | 27 (10)          | 2,13 (1,0 – 4,51)  | 0,15            | 2,23 (1,04 – 4,74) <sup>c</sup> | 0,04            |

a = RRE ajustado para sexo, genótipo do códon 129 e presença da depleção do *octarepeat*.

b = RRE ajustado para sexo, genótipo do códon 117 e presença da depleção do *octarepeat*.

c = RRE ajustado para sexo, genótipos dos códon 117 e 129.

**Tabela 15** - Risco Relativo Estimado (RRE) e intervalo de confiança de 95% para epilepsia focal (n = 168) de acordo com as variantes alélicas do gene *PRNP*.

| Códon    | Genótipo               | Expostos (%)             |                  | Bruto              |                 | RRE Ajustado                    |                 |
|----------|------------------------|--------------------------|------------------|--------------------|-----------------|---------------------------------|-----------------|
|          |                        | Controles<br>N = 202 (%) | Casos<br>N = 168 | RRE (IC 95%)       | Nível de<br>"p" | RRE (IC 95%)                    | Nível de<br>"p" |
| 117      | Ala/Ala                | 193 (95,5)               | 157 (93,5)       | 1,0                |                 | 1,0                             |                 |
|          | Ala/Ala <sub>sil</sub> | 9 (4,5)                  | 11 (6,5)         | 1,5 (0,61 – 3,72)  | 0,40            | 1,44 (0,57 – 3,64) <sup>a</sup> | 0,44            |
| 129      | Met/Met                | 112 (55,4)               | 79 (47,0)        | 1,0                |                 | 1,0                             |                 |
|          | Met/Val                | 81 (40,1)                | 72 (42,9)        | 1,26 (0,82 – 1,94) | 0,29            | 1,25 (0,81 – 1,94) <sup>b</sup> | 0,31            |
|          | Val/Val                | 9 (4,5)                  | 17 (10,1)        | 2,68 (1,14 – 6,31) | 0,02            | 2,67 (1,13 – 6,34) <sup>b</sup> | 0,02            |
| 171      | Asn/Asn                | 202 (100)                | 165 (98,2)       | 1,0                |                 |                                 |                 |
|          | Asn/Ser                | 0 (0)                    | 3 (1,8)          | N.A.               | 0,10            | N.A.                            | N.A.            |
| Depleção | Ausente                | 192 (95)                 | 154 (91,7)       | 1,0                |                 | 1,0                             |                 |
| OctaR    | Presente               | 10 (5)                   | 14 (8,3)         | 1,74 (0,75 – 4,04) | 0,19            | 1,78 (0,76 – 4,16) <sup>c</sup> | 0,18            |

a = RRE ajustado para sexo e genótipo do códon 129 e presença da depleção do *octarepeat*.

b = RRE ajustado para sexo e genótipo do códon 117 e presença da depleção do *octarepeat*.

c = RRE ajustado para sexo e genótipos dos códon 117 e 129.

**Tabela 16** - Risco Relativo Estimado (RRE) e intervalo de confiança de 95% para epilepsia generalizada idiopática (n = 40) de acordo com a presença das variantes alélicas do gene *PRNP*.

| Códon    | Genótipo               | Expostos (%)             |                 | Bruto              |                 | RRE Ajustado                    |                 |
|----------|------------------------|--------------------------|-----------------|--------------------|-----------------|---------------------------------|-----------------|
|          |                        | Controles<br>N = 202 (%) | Casos<br>N = 40 | RRE (IC 95%)       | Nível<br>de “p” | RRE (IC 95%)                    | Nível de<br>“p” |
| 117      | Ala/Ala                | 193 (95,5)               | 9 (4,5)         | 1,0                |                 | 1                               |                 |
|          | Ala/Ala <sub>sil</sub> | 9 (4,5)                  | 4 (10)          | 2,38 (0,67 – 8,16) | 0,17            | 2,50 (0,71 – 8,73) <sup>a</sup> | 0,15            |
|          | Met/Met                | 112 (55,4)               | 19 (47,5)       | 1,0                |                 | 1,0                             |                 |
| 129      | Met/Val                | 81 (40,1)                | 19 (47,5)       | 1,38 (0,89 – 2,78) | 0,36            | 1,23 (0,60 – 2,53) <sup>b</sup> | 0,57            |
|          | Val/Val                | 9 (4,5)                  | 2 (5)           | 1,31 (0,26 – 6,54) | 0,74            | 1,15 (0,22 – 5,90) <sup>b</sup> | 0,87            |
| 171      | Asn/Asn                | 202 (100)                | 40 (100)        | N.A.               |                 | N.A.                            |                 |
|          | Asn/Ser                | 0 (0)                    | 0 (0)           | N.A.               |                 | N.A.                            |                 |
| Depleção | Ausente                | 192 (95)                 | 35 (87,5)       | 1,0                |                 | 1,0                             |                 |
| Octa R   | Presente               | 10 (5)                   | 5 (12,5)        | 2,74 (0,88 – 8,51) | 0,08            | 2,82 (0,89 – 8,91) <sup>c</sup> | 0,08            |

a = RRE ajustado para sexo, genótipo do códon 129 e presença da depleção do *octarepeat*.

b = RRE ajustado para sexo, genótipo do códon 117 e presença da depleção do *octarepeat*.

c = RRE ajustado para sexo e genótipos dos códons 117 e 129.

## 6 DISCUSSÃO I

Nos últimos anos tem se discutido muito a relevância biológica de PrP<sup>c</sup>, e o uso de animais geneticamente modificados no gene *Prnp* tem trazido muitas evidências relevantes no conhecimento desta proteína. Há alguns anos se descrevem alterações comportamentais nestes animais, entretanto dados observados por alguns grupos não foram reproduzidos por outros. Além disso, existe uma grande discussão sobre o controle adequado do *background* genético dos animais e a forma com que a depleção do gene foi executada. Vale lembrar que o terceiro animal *knockout* para o gene *Prnp* gerado desenvolvia ataxia e degeneração de células de Purkinje no cerebelo com 8 semanas pós-natal (SAKAGUCHI et al. 1996). De fato, foi posteriormente demonstrado que a ataxia não era ocasionada pela retirada de *Prnp*, mas pela superexpressão de Doppel (Dpl), um gene que está localizado 16Kb *downstream* de *Prnp* (MOORE et al. 1999). O promotor deste gene é muito fraco em cérebro, mas quando a depleção de *Prnp* estende-se ao terceiro exon, que é o caso destes animais e não daqueles gerados por BÜELER et al. (1992) e MANSON et al. (1994), o sítio acceptor de *splicing* é removido, levando a geração de um mRNA quimérico contendo os dois exons não codificantes de *Prnp* e o exon do gene de Dpl. Nestas condições Dpl passa a estar sobre controle do promotor de *Prnp* e, portanto, altamente expresso no cérebro causando morte neuronal particularmente no cerebelo por mecanismos ainda pouco conhecidos (MOORE et al. 1999; LI et al. 2000).

Portanto, no presente trabalho estudamos um dos fenótipos mais expressivos observados nos animais *knockout* de *Prnp* que é seu baixo limiar a convulsões

induzidas farmacologicamente (WALZ et al. 1999). Nossa estratégia principal e inédita na literatura foi verificar se este fenótipo era mantido em diferentes linhagens de animais *knockout* para *Prnp* e se ele tinha uma relação direta com as concentrações de PrP<sup>c</sup>. Esta abordagem dá, portanto, mais credibilidade aos resultados de maneira que eles não sejam interpretados como um evento ocasional presente esporadicamente numa determinada linhagem de camundongos.

Nossos dados mostram que a sensibilidade aos agentes convulsivantes manteve-se em todos os animais *knockouts* utilizados no estudo, mostrando que não se tratava de um evento linhagem específico associado ao tipo de depleção ou *background* genético. Além disso, o comportamento surpreendente do animal Tg20 frente às drogas usadas neste trabalho e o fato do animal heterozigoto resgatar o fenótipo do camundongo *knockout*, mostram que PrP<sup>c</sup> tem um papel protetor contra a indução de crise convulsiva causada farmacologicamente.

Um importante modelo usado neste trabalho foram os *knockouts* condicionais pós-natal CreTg37 e CreTg46, onde a primeira linhagem apresentou o mesmo padrão de sensibilidade à convulsão que os animais *knockouts* constitutivos *ZPrnp*<sup>0/0</sup> ou *EPrnp*<sup>-/-</sup>. Portanto, mostrando que o fenótipo alterado não depende de alterações ocorridas durante a embriogênese, mas de um mau funcionamento neuronal. Entretanto, apesar dos animais *knockouts* CreTg46 apresentarem uma tendência à maior sensibilidade à convulsão que seus respectivos controles Tg46\*, as diferenças não foram significativas. Desta forma, é importante tentarmos entender o porquê das diferenças entre estas duas linhagens de *knockouts* condicionais com relação à sensibilidade aos agentes convulsivantes.

As linhagens Tg46\* e Tg37\* diferem entre si por uma maior expressão (cerca de 3 vezes, Figura 4) de PrP<sup>c</sup> na última. Esperávamos que a linhagem Tg37 fosse mais resistente às convulsões que a Tg46 à semelhança do que vimos entre os Tg20 e seu controle. Entretanto, elas respondem aos agentes convulsivantes da mesma forma. Talvez seja necessária uma diferença bastante alta na concentração de PrP<sup>c</sup> entre os grupos para que o efeito protetor seja detectado. No caso dos Tg20 ela é mais que 6 vezes maior que a do animal controle e no caso dos Tg37 ela é de 3 vezes a de Tg46. Esta hipótese é reforçada pelo fato de não encontrarmos diferenças entre animais tipo selvagem e aqueles onde há só uma cópia do gene *Prnp* (*EPrnp*<sup>+/-</sup>) e que, portanto expressam metade da concentração de PrP<sup>c</sup> (Figura 4)

Além disso, os animais *knockout* CreTg46 não apresentam diferença na sensibilidade à convulsão quando comparados ao seu controle tipo selvagem Tg46\* contrariamente ao encontrado entre os *knockout* CreTg37 versus Tg37\*. Uma das possibilidades para se explicar este resultado seria que tanto a quantidade de PrP<sup>c</sup> expresso quanto a sua presença em neurônios e nas células da glia podem participar de forma aditiva neste efeito protetor. Por exemplo, é sabido que astrócitos de animais *knockout* para PrP<sup>c</sup> apresentam uma menor captação de glutamato (BROWN et al. 1999). Portanto nos animais *knockouts* constitutivos, as diferenças quanto à sensibilidade à convulsão podem ser uma somatória do mau funcionamento tanto dos neurônios como das células da glia. No caso do animal CreTg46 a depleção de PrP<sup>c</sup> apenas nos neurônios não causou impacto suficiente que permitisse apresentação de fenótipo no teste aplicado. Por outro lado, o animal CreTg37 também teve depleção de PrP<sup>c</sup> só em neurônios mas isso somado a alta expressão de PrP<sup>c</sup> no seu controle Tg37\* permitiu o aparecimento do fenótipo.

É interessante ainda observar que os animais controle das linhagens ZrchI (ZPrnp<sup>+/+</sup>), os C56Bl/6J e os *knockouts* condicionais Tg46\* e Tg37\* desenvolvem convulsão igualmente quanto tratados com a mesma dose de PTZ, isto é quase todos os animais apresentam convulsão. Por outro lado, os camundongos da linhagem Edbg (EPrnp<sup>+/+</sup>) são bem mais resistentes às crises. Neste caso, o *background* genético destes animais (dominantemente C57Bl/10) pode ser o responsável pela diferença. Desta forma, apenas a linhagem de animais Edbg permitiu que se observassem diferenças quanto a maior sensibilidade a convulsão induzida por PTZ quanto camundongos *knockouts* para *Prnp* quando comparados ao controle.

O tratamento com PTZ leva a uma alta mortalidade em decorrência de uma convulsão tônica evoluindo para parada cardiorespiratória (WALZ et al. 1999). Portanto, uma vez que a morte está associada com a sensibilidade à convulsão ela também pode ser usada como parâmetro neste estudo.

Os mecanismos moleculares envolvidos com a maior sensibilidade à convulsão, ou maior hiperexcitabilidade, apresentadas pelos *knockouts* de *Prnp* podem estar relacionadas às várias alterações eletrofisiológicas já descritas nestes animais. Camundongos ZrchI assim como os Edbg apresentam comprometimento da potencialização de longo prazo (*long term potentiation*) causada provavelmente pela presença de inibição anormal de GABA-A no hipocampo (COLLINGE et al. 1994; MANSON et al. 1994; WHITTINGTON et al. 1995), que foi resgatada pela re-expressão de PrP<sup>c</sup> por um transgene (WHITTINGTON et al. 1995). Entretanto, estes achados não foram reproduzidos por outro grupo (LLEDO et al. 1996). Por outro lado, demonstramos recentemente que camundongos ZrchI apresentam uma alta excitabilidade no giro dentado do hipocampo demonstrada por um baixo limiar

necessário para gerar potencialização de longo prazo. Este evento foi associado à superexpressão de receptores de NMDA dos tipos NR2A e NR2B (MALLON et al. 2005). Além disso, outra alteração apresentada pelos animais *knockouts* constitutivos de *Prnp* foi perda da condutância de  $I_{HAP}$  (*Afterhyperpolarization*) causada provavelmente por alterações nas correntes de  $K^+$  ativadas por  $Ca^{2+}$  (COLLING et al. 1996), interessante esta alteração foi reproduzida mais recentemente nos *knockouts* pos-natal CreTg46 (MALLUCCI et al. 2002).

Algumas alterações bioquímicas observadas nos animais *knockout* de *Prnp* também convergem para explicar seu alto padrão de excitabilidade neuronal. A atividade de ectopeptidases está diminuída em sinaptossomas de animais *knockout* de *Prnp* o que atenua a hidrólise de ADP levando a um decréscimo nas concentrações de adenosina, que funciona como um anticonvulsivante endógeno, na fenda sináptica (PEREIRA et al. 2001). Embora a captação de glutamato pareça normal em sinaptossomas de animais *ZrchI* (THAIS et al. 2006), sua captação pelos astrócitos é comprometida (BROWN e MOHN 1999), o que em última análise pode levar a um aumento deste neurotransmissor excitatório na fenda sináptica e conseqüentemente uma maior excitabilidade.

É sabido que o fluxo de  $Ca^{2+}$  no espaço intracelular representa um dos primeiros estágios dos eventos epiléticos (SPECKMANN et al. 1993) e que os potenciais de *afterhyperpolarization* (IAHP) são dependentes do influxo de cálcio via canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo L (VDGC-L). Interessantemente, a homeostase de  $Ca^{2+}$  também está alterada em células hipocâmpais de animais *knockout Prnp* (HERMS et al. 2000; BRINI et al. 2005). Recentemente, os baixos potenciais de IAHP previamente observados em animais *knockouts* de *Prnp* foram

explicados por estes apresentarem uma redução do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Esta foi ocasionada por um comprometimento no influxo de cálcio causado provavelmente pela diminuição na atividade da subunidade  $\beta 2$  de VGCC -L, que é responsável pelo transporte da subunidade  $\alpha 1$  de VGCC-L para a membrana plasmática (FUHRMANN et al. 2006).

Interessantemente, nosso grupo mostrou que o tratamento de neurônios hipocampais com o peptídeo de laminina que representa o sítio de interação a PrP<sup>c</sup> (peptídeo  $\gamma$ -1), leva a um aumento nas concentrações citosólicas de  $\text{Ca}^{2+}$  em células tipo selvagem o que não ocorre em neurônios de animas *knockout* de *Prnp* (Beraldo et al. em preparação). O aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  observado é dependente tanto do recrutamento de cálcio de estoques celulares (particularmente do retículo endoplasmático) como de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Portanto, é possível que a interação de PrP<sup>c</sup> a laminina também module a atividade dos VGCC tipo-L.

Além disso, sabemos que PrP<sup>c</sup> está envolvido em mecanismos de proteção neuronal contra estresse oxidativo (revisado por BROWN 2005) e sua interação com STI1 protege neurônios retinianos (ZANATA et al. 2002; CHIARINI et al. 2002) e hipocampais (LOPES et al. 2005) da morte celular programada. É sabido ainda que ácido kaínico pode levar a morte neuronal por ativar plasmina que tem como substrato principal no cérebro a laminina. Por outro lado, as interações de PrP<sup>c</sup> com STI1 ou com Laminina também estão envolvidas com mecanismos de plasticidade neuronal (GRANER et al. 2000a e LOPES et al. 2005). Portanto, os mecanismos de morte neuronal e neuroplasticidade relacionados à epileptogenese permanecem como um ponto importante a ser investigado.

Finalmente, os dados obtidos neste trabalho confirmam que modificações moleculares, bioquímicas e eletrofisiológicas previamente observadas pela depleção de PrP<sup>c</sup> podem refletir num fenótipo alterado, pela primeira vez consistentemente demonstrado em diferentes modelos de animais *knockouts* de *Prnp*. Obviamente que em condições naturais não existem indivíduos onde PrP<sup>c</sup> não é expresso, entretanto o gene que codifica esta proteína é bastante polimórfico, particularmente em humanos, e é possível que variantes alélicas podem codificar proteínas com maior ou menor atividade. Portanto, é importante expandir este estudo no sentido de observar se há alguma correlação entre a presença de determinadas variantes alélicas no gene *PRNP* e as epilepsias.

## 7 DISCUSSÃO II

Os dados obtidos a partir de animais *knockouts* de *Prnp* nos conduziram a avaliar a possível associação entre a presença de variantes alélicas de *PRNP* e epilepsias humanas.

Uma etapa crucial para o desenvolvimento deste trabalho foi a padronização de uma técnica rápida e eficiente para detecção de polimorfismos e/ou mutações no gene de *PRNP*. Inicialmente, usamos três técnicas distintas, o seqüenciamento direto, o DHPLC e endonucleases de restrição uma vez que resultados controversos foram encontrados inicialmente quando se comparava o seqüenciamento direto e os produtos de clonagem destes DNAs. Uma possível explicação para estes resultados discrepantes deve-se ao fato de que a seqüência de *PRNP* é rica em nucleotídeos citosina e guanina (KRETZSCHMAR et al. 1986) o que dificulta seu seqüenciamento direto, uma vez que a incorporação do fluorocromo a cada um destes resíduos cria um impedimento estérico para a incorporação do próximo marcador (PARKER et al. 1995).

A ORF do gene *PRNP* que possui aproximadamente 800bp foi dividida em duas porções, onde os iniciadores usados para sua amplificação foram desenhados de maneira em que houvesse sobreposição entre as duas seqüências amplificadas. Desta forma, teríamos para cada amostra dois eletroferogramas com aproximadamente 400bp cada um, obtendo assim um seqüenciamento mais limpo. Inicialmente, esta abordagem foi usada tanto para o seqüenciamento direto quanto para a análise cromatográfica das amostras. Com esta abordagem, a segunda metade de *PRNP*

amplificada permitia a detecção de quase todos os polimorfismos e mutações. No entanto, devido a grande quantidade de polimorfismos presentes na ORF, era muito difícil distinguir por DHPLC um perfil alterado composto de vários polimorfismos, por exemplo, no códon 129 quando associado com alterações no códon 171. Portanto, para melhor caracterizar as variantes alélicas por cromatografia e tornar esta técnica de escolha para uma varredura do gene de *PRNP* em todos os nossos trabalhos, decidimos investir em sua melhor padronização.

Foram desenhados novos iniciadores de tal forma que a região de sobreposição entre as seqüências amplificadas era menor e mantinha em fragmentos separados os polimorfismos dos códons 129 e 171. Esta abordagem gerou picos cromatográficos mais limpos e com perfis típicos que permitiam distinguir os diferentes polimorfismos e inclusive, a presença de mais que uma alteração. A digestão por enzimas de restrição específicas para os sítios onde se encontram os principais polimorfismos, confirmou todos os seqüenciamentos e os padrões de cromatografia. A análise cromatográfica de *PRNP* mostrou-se uma ferramenta rápida e eficaz para detecção de polimorfismos e mutações no gene de PrP<sup>c</sup> (CASTRO et al. 2004).

A robustez da técnica de DHPLC foi comprovada recentemente quando um perfil bem diferente de todos que havíamos padronizado foi encontrado. O seqüenciamento deste DNA confirmou a presença de um polimorfismo silencioso no códon 124 (G124G). O fato da alteração ter sido facilmente detectada por DHPLC mostrou mais uma vez que a técnica pode ser usada em qualquer estudo para uma varredura de polimorfismos sem incorrer no risco de perder possíveis alterações que

não estejam padronizadas por DHPLC. Entretanto, em casos como este, é necessário realizar o seqüenciamento da ORF para verificar de qual alteração se trata.

No presente trabalho continuamos um estudo iniciado anteriormente onde avaliamos polimorfismos em pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial associada à Esclerose Hipocampal (WALZ et al. 2003) e com malformações do desenvolvimento cortical (WALZ et al. 2004). Nestes estudos demonstramos que existia uma associação entre o polimorfismo N171S e a epiletogênese. Estudos posteriores em outras populações não foram capazes de reproduzir estes dados (CAVALLERI et al. 2005).

Na tentativa de avaliar se outras formas de epilepsia poderiam também estar associadas a polimorfismos em *PRNP* iniciamos este estudo onde analisamos 202 indivíduos normais e 270 casos de epilepsia dos quais 168 são epilepsias focais, 40 são de epilepsias generalizadas e 70 casos que não temos os dados clínicos coletados, mas incluem-se em um dos grupos citados.

Fizemos, portanto uma análise preliminar dos dados para que este trabalho pudesse ser concluído parcialmente. Entretanto, continuaremos investindo na coleta dos dados clínicos para finalização deste estudo.

Quando todos os pacientes foram agrupados verificamos uma maior frequência da variante alélica V129V nestes que nos controles normais, que foi mantida quando se analisou os pacientes com epilepsias focais e perdida nos pacientes com epilepsias generalizadas. Nenhuma associação foi encontrada para a variante N171S e tão pouco para as outras variantes alélicas.

Interessantemente, uma tendência de associação da variante V129V já tinha sido mostrada inicialmente com os 100 pacientes com epilepsia do lobo temporal

mesial associada à Esclerose Hipocampal (WALZ et al. 2003) e com malformações do desenvolvimento cortical (WALZ et al. 2004).

O códon 129 de *PRNP* está estrategicamente localizado na primeira  $\alpha$ -hélice de PrP<sup>c</sup> o que o torna importante na manutenção da estrutura desta proteína (RIEK et al. 1998). Nós especulamos que a composição do aminoácido nesta posição pode estar diretamente relacionada com a função da proteína ou que esta interfira com outros domínios de PrP<sup>c</sup> com atividade biológica.

Esta proposta vai de acordo com os dados mostrados na literatura onde variantes alélicas do códon 129 já foram associadas com melhor desempenho cognitivo em pacientes idosos, em indivíduos com síndrome de Down, com doença de Alzheimer (BERR et al. 1998; RUJESCU et al. 2003; DEL BO et al. 2003 e 2006; GACIA et al. 2006). Uma melhor memória de longa duração foi ainda associada com o alelo 129 metionina em adultos jovens normais (PAPASSOTIROPOULOS et al. 2005). Além disso, alterações na frequência alélica do códon 129 também já foram correlacionadas com quadros neurológicos e psiquiátricos como Doença de Wilson (GRUBENBECHER et al. 2006) afasia primária progressiva (LI et al. 2005) e com as medidas neuropsicológicas e psicopatológicas de desordens psiquiátricas (MARTORELL et al. 2006).

O polimorfismo N171S foi associado com uma doença psiquiátrica (SAMAIA et al. 1997), e com alguns tipos de epilepsia (WALZ et al. 2003 e 2004). No presente trabalho esta correlação não foi encontrada para as formas de epilepsia avaliadas. Esse polimorfismo poderia estar, portanto associado a um tipo específico de epilepsia. Entretanto, nossos dados não foram reproduzidos por outro grupo (CAVALLERI et al. 2005) quando as mesmas formas de epilepsia que estudamos em

WALZ et al. 2003 e 2004 foram avaliadas. Portanto, estes dados devem ser reavaliados criteriosamente.

A associação de algumas formas de epilepsia com polimorfismos no gene *PRNP* pode ser importante na identificação de grupos de risco e eventualmente na identificação de novos alvos terapêuticos para estas doenças.

## 8 CONCLUSÕES

- ✓ Animais *knockouts* para *Prnp* são mais sensíveis às crises convulsivas induzidas por dois protocolos distintos (KA e PTZ) do que seus respectivos controles, independentemente do *background* genético, da construção usada na depleção do gene e da fase da vida do animal que o gene deixou de ser expresso;
- ✓ A sensibilidade a convulsão é dependente das concentrações de PrP<sup>c</sup> no cérebro, uma vez que os animais que expressam 6x mais proteína são mais resistentes à crises convulsivas induzidas quimicamente;
- ✓ A presença de apenas um alelo de *Prnp* resgata o fenótipo de maior sensibilidade a crises convulsivas apresentado pelo animal *knockout*;
- ✓ *Knockouts* pós-natal são mais sensíveis às crises convulsivas do que os respectivos controles, indicando que a presença de PrP<sup>c</sup> durante o desenvolvimento não altera o quadro de sensibilidade;
- ✓ A ausência de PrP<sup>c</sup> nos neurônios foi suficiente para aumentar a sensibilidade à crises convulsivas, independentemente da presença da proteína em outras regiões, como na glia;
- ✓ A técnica de DHPLC para a detecção de variantes alélicas no *PRNP* é segura, confiável, reprodutível e economicamente mais viável que o seqüenciamento;
- ✓ A variante alélica V129V de *PRNP* parece estar associada com o aparecimento das síndromes epiléticas.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguzzi A. Between cows and monkeys. **Nature** 1996; 381:734.

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.

Berkovic SF, Jackson GD. The hippocampal sclerosis whodunit: enter the genes. **Ann Neurol** 2000; 47:557-8.

Berr C, Richard F, Dufouil C, et al. Polymorphism of the prion protein is associated with cognitive impairment in the elderly: the EVA study. **Neurology** 1998; 51:734-7.

Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB. Molecular characteristics of the major scrapie prion protein. **Biochemistry** 1984; 23:5898-906.

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

Brown DR, Qin K, Herms JW, et al. The cellular prion protein binds copper in vivo. **Nature** 1997a; 390:684-7.

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

Brown DR, Mohn CM. Astrocytic glutamate uptake and prion protein expression. **Glia** 1999; 25:282-92.

Brown DR, Wong BS, Hafiz F, et al. Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. **Biochem J** 1999; 344 Pt 1:1-5. Erratum in: **Biochem J** 2000; 345 Pt3:767.

Brown DR. Neurodegeneration and oxidative stress: prion disease results from loss of antioxidant defence. **Folia Neuropathol** 2005; 43:229-43.

Büeler 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.

Butler D. Did UK 'dump' contaminated feed after ban? **Nature** 1996; 381:544-5.

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

Castro RM, Landemberger MC, Walz R, et al. High capacity and low cost detection of prion protein gene variant alleles by denaturing HPLC. **J Neurosci Methods** 2004; 139:263-9.

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

Cavalleri GL, Lynch JM, Depondt C, et al. Failure to replicate previously reported genetic associations with sporadic temporal lobe epilepsy: where to from here? **Brain** 2005; 128:1832-40.

Cervenakova L, Brown P, Goldfarb LG, et al. Infectious amyloid precursor gene sequences in primates used for experimental transmission of human spongiform

encephalopathy. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1994; 91:12159-62. Erratum in: **Proc Natl Acad Sci U S A** 1995; 92:3631.

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

Chen S, Mange A, Dong L, et al. 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.

Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, et al. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. **EMBO J** 2002; 21:3317-26.

Coitinho AS, Freitas ARO, Lopes MH, et al. Cellular prion interaction with Laminin mediates memory consolidation by PKA and MAPK. **J Neuroscience** *in press*.

Colling SB, Collinge J, Jefferys JG. Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> currents. **Neurosci Lett** 1996; 209:49-52.

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

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

Del Bo R, Scarlato M, Ghezzi S, et al. Is M129V of PRNP gene associated with Alzheimer's disease? a case-control study and a meta-analysis. **Neurobiol Aging** 2006; 27:770.e1-770.e5.

Doh-ura K, Tateishi J, Sasaki H, et al. 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; 163:974-9.

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

Ellis V, Daniels M, Misra R, Brown DR. Plasminogen activation is stimulated by prion protein and regulated in a copper-dependent manner. **Biochemistry** 2002; 41:6891-6.

Engel J Jr. Introduction to temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Res** 1996; 26:141-50.

Engel J, Pedley AT. **Epilepsy: a comprehensive textbook**. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998. Introduction: What is epilepsy ?; p.1-7.

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; 66:110-7.

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

Fischer M, Rulicke T, Raeber A, Sailer A, et al. Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. **EMBO J** 1996; 15:1255-64.

Fuhrmann M, Bittner T, Mitteregger G, et al. Loss of the cellular prion protein affects the Ca(2+) homeostasis in hippocampal CA1 neurons. **J Neurochem** 2006; 98:1876-85.

Gacia M, Safranow K, Styczynska M, et al. Prion protein gene M129 allele is a risk factor for Alzheimer's disease. **J Neural Transm** 2006 Aug 8; [Epub ahead of print].

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.

Gasset M, Baldwin MA, Lloyd DH, et al. Predicted alpha-helical regions of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1992; 89:10940-4.

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; 93:744-8.

Goldfarb LG, Mitrova E, Brown P, Toh BK, Gajdusek DC. Mutation in codon 200 of scrapie amyloid protein gene in two clusters of Creutzfeldt-Jakob disease in Slovakia. **Lancet** 1990; 336:514-5.

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

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

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.

Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, et al. Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. **FEBS Lett** 2000a; 482:257-60.

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

Grubenbecher S, Stuve O, Hefter H, Korth C. Prion protein gene codon 129 modulates clinical course of neurological Wilson disease. **Neuroreport** 2006; 17:549-52.

Harris DA, Falls DL, Johnson FA, Fischbach GD. A prion-like protein from chicken brain copurifies with an acetylcholine receptor-inducing activity. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1991; 88:7664-8.

Harris DA. Cell biological studies of the prion protein. **Curr Issues Mol Biol** 1999; 1:65-75.

Hauser WA, Rich SS, Lee JR, et al. Risk of recurrent seizures after two unprovoked seizures. **N Engl J Med** 1998; 338:429-34.

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

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

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

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.

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

Kale R. Bringing epilepsy out of the shadows. **BMJ** 1997; 315:2-3.

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

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.

Kretzschmar HA, Stowring LE, Westaway D, et al. Molecular cloning of a human prion protein cDNA. **DNA** 1986; 5:315-24.

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

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

Leucht C, Simoneau S, Rey C, Vana K, Rieger R, Lasmezas CI, Weiss S. The 37 kDa/67 kDa laminin receptor is required for PrP(Sc) propagation in scrapie-infected neuronal cells. **EMBO Rep** 2003; 4:290-5. Erratum in: **EMBO Rep** 2003; 4:439.

Li A, Sakaguchi S, Shigematsu K, et al. Physiological expression of the gene for PrP-like protein, PrPLP/Dpl, by brain endothelial cells and its ectopic expression in

neurons of PrP-deficient mice ataxic due to Purkinje cell degeneration. **Am J Pathol** 2000; 157:1447-52.

Li X, Rowland LP, Mitsumoto H, et al. Prion protein codon 129 genotype prevalence is altered in primary progressive aphasia. **Ann Neurol** 2005; 58:858-64.

Liao YC, Tokes Z, Lim E, et al. Cloning of rat "prion-related protein" cDNA. **Lab Invest** 1987; 57:370-4.

Liesi P, Narvanen A, Soos J, et al. Identification of a neurite outgrowth-promoting domain of laminin using synthetic peptides. **FEBS Lett** 1989; 244:141-8. Erratum in: **FEBS Lett** 1989; 251:283.

Lledo PM, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB, Nicoll RA. Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1996; 93:2403-7.

Locht C, Chesebro B, Race R, Keith JM. Molecular cloning and complete sequence of prion protein cDNA from mouse brain infected with the scrapie agent. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1986; 83:6372-6.

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

Ma J, Lindquist S. Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:14955-60.

Mallon AP, Auberson YP, Stone TW. Selective subunit antagonists suggest an inhibitory relationship between NR2B and NR2A-subunit containing N-methyl-D: -aspartate receptors in hippocampal slices. **Exp Brain Res** 2005; 162:374-83.

Mallucci GR, Ratté 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. Erratum in: **EMBO J** 2002; 21:1240.

Mallucci G, Dickinson A, Linehan J, Klohn PC, Brandner S, Collinge J. Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. **Science** 2003; 302:871-4.

Mallucci G, Collinge J. Update on Creutzfeldt-Jakob disease. **Curr Opin Neurol** 2004; 17:641-7.

Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, et al. 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. **Mol Neurobiol** 1994; 8:121-7.

Martins VR, Linden R, Prado MA, Walz R, Sakamoto AC, Izquierdo I, Brentani RR. Cellular prion protein: on the road for functions. **FEBS Lett** 2002; 512:25-8.

Martorell L, Valero J, Mulet B, et al. M129V variation in the prion protein gene and psychotic disorders: Relationship to neuropsychological and psychopathological measures. **J Psychiatr Res** 2006 Aug 30; [Epub ahead of print]

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.

Mathern GW, Babb TL, Vickrey BG, et al. The clinical-pathogenic mechanisms of hippocampal neuron loss and surgical outcomes in temporal lobe epilepsy. **Brain** 1995; 118:105-18.

McKinley MP, Bolton DC, Prusiner SB. A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. **Cell** 1983; 35:57-62.

McKinley MP, Braunfeld MB, Bellinger CG, Prusiner SB. Molecular characteristics of prion rods purified from scrapie-infected hamster brains. **J Infect Dis** 1986; 154:110-20.

Mead S, Stumpf MP, Whitfield J, et al. Balancing selection at the prion protein gene consistent with prehistoric kurulike epidemics. **Science** 2003; 300:640-3.

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; 326:444-9.

Meggio F, Negro A, Sarno S, et al. Bovine prion protein as a modulator of protein kinase CK2. **Biochem J** 2000; 352 Pt 1:191-6.

Mercadante A. **Caracterização e implicações fisiológicas das interações da proteína prion celular com o seu receptor de 60-66 kDa e com a Laminina.** São Paulo; 2000. [Tese de doutorado-Instituto de Química-Universidade de São Paulo]

Montrasio F, Cozzio A, Flechsig E, Rossi D, et al. 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; 98:4034-7.

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.

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.

Papassotiropoulos A, Wollmer MA, Aguzzi A, et al. The prion gene is associated with human long-term memory. **Hum Mol Genet** 2005; 14:2241-6.

Parchi P, Castellani R, Capellari S, et al. Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. **Ann Neurol** 1996; 39:767-78.

Parker LT, Deng Q, Zakeri H, Carlson C, Nickerson DA, Kwok PY. Peak height variations in automated sequencing of PCR products using Taq dye-terminator chemistry. **Biotechniques** 1995; 19:116-21.

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.

Pereira GS, Walz R, Bonan CD, et al. Changes in cortical and hippocampal ectonucleotidase activities in mice lacking cellular prion protein. **Neurosci Lett** 2001; 301:72-4.

Perry RT, Go RC, Harrell LE, Acton RT. SSCP analysis and sequencing of the human prion protein gene (PRNP) detects two different 24 bp deletions in an atypical Alzheimer's disease family. **Am J Med Genet** 1995; 60:12-8.

Petchanikow C, Saborio GP, Anderes L, et al. Biochemical and structural studies of the prion protein polymorphism. **FEBS Lett** 2001; 509:451-6.

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

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

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

Prusiner SB. Molecular structure, biology, and genetics of prions. **Adv Virus Res** 1988; 35:83-136.

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

Prusiner SB. Natural and experimental prion diseases of humans and animals. **Curr Opin Neurobiol** 1992; 2:638-47.

Prusiner SB. Genetic and infectious prion diseases. **Arch Neurol** 1993; 50:1129-53.

Prusiner SB. Prion diseases and the BSE crisis. **Science** 1997; 278:245-51.

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

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; 278:9064-7.

Riek R, Wider G, Billeter M, et al. Prion protein NMR structure and familial human spongiform encephalopathies. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998; 95:11667-72.

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; 7:349-53.

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

Rujescu D, Hartmann AM, Gonnermann C, et al. M129V variation in the prion protein may influence cognitive performance. **Mol Psychiatry** 2003; 8:937-41.

Sakaguchi S, Katamine S, Shigematsu K, et al. Accumulation of proteinase K-resistant prion protein (PrP) is restricted by the expression level of normal PrP in mice inoculated with a mouse-adapted strain of the Creutzfeldt-Jakob disease agent. **J Virol** 1995; 69:7586-92.

Sakaguchi S, Katamine S, Nishida N, et al. Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. **Nature** 1996; 380:528-31.

Salvatore M, Genuardi M, Petraroli R, Masullo C, D'Alessandro M, Pocchiari M. Polymorphisms of the prion protein gene in Italian patients with Creutzfeldt-Jakob disease. **Hum Genet** 1994; 94:375-9. Erratum in: *Hum Genet* 1995; 95:605.

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

Samaia HB, Brentani RR. Can loss-of-function prion-related diseases exist? **Mol Psychiatry** 1998; 3:196-7.

Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1988; 85:5166-70.

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.

Sejima H, Ito M, Kishi K, Tsuda H, Shiraishi H. Regional excitatory and inhibitory amino acid concentrations in pentylenetetrazol kindling and kindled rat brain. **Brain Dev** 1997; 19:171-5.

Soto C, Castilla J. The controversial protein-only hypothesis of prion propagation. **Nat Med** 2004; 10 Suppl:S63-7.

Speckmann EJ, Straub H, Kohling R. Contribution of calcium ions to the generation of epileptic activity and antiepileptic calcium antagonism. **Neuropsychobiology** 1993; 27:122-6.

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

Steinlein OK. Genes and mutations in idiopathic epilepsy. **Am J Med Genet** 2001; 106:139-45.

Thais ME, Carqueja CL, Santos TG, et al. Synaptosomal glutamate release and uptake in mice lacking the cellular prion protein. **Brain Res** 2006; 1075:13-9.

Timpl R, Dziadek M. Structure, development, and molecular pathology of basement membranes. **Int Rev Exp Pathol** 1986; 29:1-112.

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

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

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

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

Walz R, Castro RM, Velasco TR, et al. 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, et al. Cortical malformations are associated with a rare polymorphism of cellular prion protein. *Neurology* 2004; 63:557-60.

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.

Westaway D, Goodman PA, Miranda CA, et al. Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell* 1987; 51:651-62.

Whittington MA, Sidle KC, Gowland I, et al. Rescue of neurophysiological phenotype seen in PrP null mice by transgene encoding human prion protein. *Nat Genet* 1995; 9:197-201. Erratum in: *Nat Genet* 1995; 9:451.

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

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.

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

## High capacity and low cost detection of prion protein gene variant alleles by denaturing HPLC

Rosa Maria R.P.S. Castro<sup>a,b</sup>, Michele C. Landemberger<sup>a,b</sup>, Roger Walz<sup>c,d,e</sup>,  
Carlos G. Carlotti, Jr.<sup>c,f</sup>, Nancy Huang<sup>g</sup>, Danielle R. Cunha<sup>b</sup>, Ricardo Moura<sup>b</sup>,  
Otávia L. Caballero<sup>a,b</sup>, Américo C. Sakamoto<sup>c</sup>, Ricardo Nitrini<sup>g</sup>,  
Ricardo R. Brentani<sup>a,b</sup>, Vilma R. Martins<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo Branch, São Paulo SP, Brazil

<sup>b</sup> Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer, São Paulo, SP, Brazil

<sup>c</sup> CIREP, Center for Epilepsy Surgery, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>d</sup> Center for Epilepsy Surgery, Hospital Governador Celso Ramos, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>e</sup> Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, UNIVALI, Itajaí, SC, Brazil

<sup>f</sup> Departamento de Anatomia e Cirurgia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>g</sup> Disciplina de Neurologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina USP, São Paulo, SP, Brazil

Received 16 March 2004; accepted 6 May 2004

### Abstract

Mutations in the human prion protein gene (*PRNP*) are responsible for hereditary diseases called transmissible spongiform encephalopathies (TSE) and a polymorphic site at codon 129 determines sensitivity to infectious forms of these maladies. More recently, codon 129 has been related to cognition performance in the elderly, in Alzheimer disease (AD) and in Down syndrome. Furthermore, a rare polymorphism at codon 171 was described in 23% of patients with mesial temporal lobe epilepsy related to hippocampal sclerosis (MTLE-HS), the most common form of surgically remediable epileptic syndrome. Thus, a method that permits fast and efficient screening of *PRNP* mutations and polymorphisms in patients, in high risk populations, and in family members is desirable. In the present study, we established the conditions for analysis of the *PRNP* open reading frame using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC), whereby unpurified PCR products were subjected to denaturing and reannealing steps leading to heteroduplex formation. We described specific profiles for the *PRNP* polymorphisms at codons 129 (M/V), 117 (A/A silent), 219 (E/K), 171 (N/S), and the octarepeat deletion using amplified DNA from 562 samples. The chromatograms for TSE-associated mutations at codons 102 (P/L), 183 (T/A), and 210 (V/I) were also determined. Specificity of the DHPLC profile for each *PRNP* variant allele was confirmed in 100% of the samples by direct and cloned DNA sequencing in addition to endonuclease digestion when applicable. Therefore, the present study shows that DHPLC is a rapid, highly accurate and efficient technique for the detection of *PRNP* genetic variants.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Prion protein gene; Prion; Prion diseases; Mutations; Polymorphisms; Denaturing high-performance liquid chromatography

### 1. Introduction

Transmissible spongiform encephalopathies (TSE) are a group of fatal human neurodegenerative disorders which can occur in sporadic, familial and acquired forms. The hallmark of TSE is the accumulation in the central nervous

system of PrP<sup>Sc</sup>, which is an abnormally folded isoform of the encoded cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) (Prusiner, 1998). PrP<sup>C</sup> is encoded by a single exon of a single gene, *PRNP*, for which some genetic variants have been described and are specifically associated with familial forms of TSEs such as Creutzfeldt–Jakob disease (CJD), Gerstmann–Straussler–Scheinker disease (GSS) and fatal familial insomnia (FFI). The pathogenic mutations include single point variations that are located mostly in the central and C-terminal region of PrP<sup>C</sup> such as those from codons 102 (Doh-ura et al., 1989; Hsiao et al., 1989), 183 (Nitrini

\* Corresponding author. Present address: Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo Branch, Rua Antonio Prudente 109-4A, Liberdade 01509-010, SP, Brazil. Tel.: +55-11-3388-3220; fax: +55-11-3207-7001.

E-mail address: vmartins@ludwig.org.br (V.R. Martins).

et al., 1997) and 210 (Pocchiari et al., 1993; Ripoll et al., 1993) in addition to deletions and insertions located in the N-terminal domain (Campbell et al., 1996; Capellari et al., 1997; Goldfarb et al., 1993; Laplanche et al., 1995; Owen et al., 1989). In many cases, the diagnosis of these diseases is very difficult and *PRNP* sequencing must be performed in order to validate the presence of a hereditary prion disease.

A highly frequent *PRNP* polymorphism at codon 129 is well known to play a role in modulating disease outcome since its association with a mutation at position 178 seems to be a key determinant between CJD and FFI (reviewed by Gambetti et al., 2003). Homozygosity for methionine at codon 129 also plays an important role in susceptibility to the new variant of Creutzfeldt–Jakob disease (vCJD) (Zimmermann et al., 1999), which was described to be transmitted to humans, particularly to young adults, through the ingestion of meat from cattle infected with bovine spongiform encephalopathy (Collinge et al., 1996). Thus, *PRNP* sequencing became important mainly in patients younger than 50 years to discriminate between vCJD and some early familial forms of TSE (reviewed by Collinge, 2001). In addition, population screening might be important to define higher risk groups.

The octarepeat domain of the human PrP<sup>c</sup> molecule is also polymorphic and four or five repeats of the peptide PHGGGWGQ can be found in normal populations (Palmer and Collinge, 1993). It is believed that these variant alleles are not related to susceptibility to prion diseases; however, insertional mutations from two to nine octarepeats are associated with CJD (Campbell et al., 1996). A third *PRNP* polymorphic site at codon 219 is found at very high frequency in the Japanese population and has been reported to delay the onset of GSS (Tanaka et al., 1997).

*PRNP* variant alleles have been recently related to other human diseases, a finding consistent with partial or total PrP<sup>c</sup> loss of function (Martins et al., 2002). The Val/Val polymorphism at codon 129 is indicative of a worse cognition in the elderly (Berr et al., 1998), in patients with Alzheimer disease (Berr et al., 2003) and in Down syndrome (Del Bo et al., 2003). In addition, a very rare polymorphism at codon 171 where an asparagine is changed to a serine, previously found in a familial form of schizoaffective disorder (Samaia et al., 1997), is present in 23% of patients with mesial temporal lobe epilepsy related to hippocampal sclerosis (MTLE-HS) and the serine variant allele indicates a poorer surgical outcome for seizure cure (Walz et al., 2003). Therefore, these data indicate that variant alleles in *PRNP* are associated with human diseases whose prevalence is much higher than that of prion diseases.

Optimization of conventional techniques and the development of new tools for genotyping *PRNP* have been reported to be essential to avoid mistakes that may delay both the correct molecular diagnosis of the diseases and the classification of a normal population in cohort studies. Previously described methods are time consuming and excessively ex-

pensive to be used for routine analysis. Additionally, several polymorphic and mutation sites found in the *PRNP* open reading frame (ORF) are located within a large domain of CpG islands (Lee et al., 1998) which complicates direct sequencing of genomic DNA (Parker et al., 1995).

In the present study we describe the use of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) to screen variant alleles in *PRNP*. This technique is based on the automated detection of heteroduplexes in short DNA segments by ion-pair reverse phase high-performance liquid chromatography under partially denaturing conditions (Oefner et al., 1992). Therefore, single base substitutions, deletions or insertions can be easily detected. The major advantage of this method is the low cost and the speed of analysis whereby after a single PCR the unpurified product can be analyzed within approximately 16 min. Once the profiles are established DNA sequencing of PCR fragments is unnecessary.

Using two pairs of primers we amplified two overlapping *PRNP* segments comprising the entire ORF and submitted them to DHPLC analysis. We determined specific profiles for the polymorphic sites at the octarepeat domain and at codons 117, 129, 171 and 219 in addition to point mutations at codons 102, 183 and 210. Each profile was confirmed by direct and cloned product sequencing and by restriction endonuclease when applicable.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Samples and DNA extraction

A total of 567 individuals were included in the study. Blood samples were collected from 177 adult healthy controls, three members of a family presenting GSS with a mutation at codon 102 of the cellular prion protein (P102L), and two patients with CJD, one with a mutation at codon 183 (T183A) and the other with a mutation at codon 210 (V210I). We also analyzed DNA from 385 samples obtained at the Center for Epilepsy Surgery, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto USP (CIREP), from patients with MTLE-HS, different forms of abnormalities of cortical development, gliosis, glial brain tumors, focal epilepsy with normal MRI, idiopathic generalized epilepsies, Rasmussen's syndrome, undiagnosed epileptic syndromes, and from family members of these patients.

DNA was directly extracted from 3 mL of whole blood using the Puregene Genomic DNA Isolation Kit (Gentra Systems, USA).

### 2.2. PCR conditions

Primers were designed to amplify two different overlapping fragments of the *PRNP* ORF (GenBank accession number AY008282). Their sequence and positions in *PRNP* are shown in Fig. 1.

**Fragment 1** – nucleotides 65 to 488 (codons 8 to 148)

Forward: 5' ATG CTG GTT CTC TTT GTG 3'

Reverse: 5' AAC GGT CCT CAT AGTCAC TGC 3'

**Fragment 2** – nucleotides 455 to 858 (codons 138 to stop plus 53 bp)

Forward: 5' ATC ATA CAT TTC GGC AGT 3'

Reverse: 5' CTC CCT CAA GCT GGA AAA AGA 3'

Fig. 1. Primers used in this study (based on GenBank sequence AY008282). *PRNP* ORF was divided into two fragments in order to obtain the best performance in DHPLC analysis.

Amplification reactions were carried out using touch down PCR (Don et al., 1991) in a total volume of 50  $\mu$ L containing 100 ng of genomic DNA, 100 mM Tris–HCl, pH 8.3, 500 mM KCl<sub>2</sub>, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0.5  $\mu$ M of each primer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and 5 U of AmpliTaq Gold enzyme (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Amplifications were performed using a DNA Thermal Cycler PTC-100 (MJ Research Inc., MA, USA) as follows, for fragment 1: 10 min at 95 °C, then 10 cycles consisting of 1 min at 94 °C, 1 min at 64 °C and 1 min at 72 °C; 10 cycles consisting of 1 min at 95 °C, 1 min at 62 °C and 1 min at 72 °C, and 15 cycles consisting of 1 min at 95 °C, 1 min at 60 °C and 1 min at 72 °C. For fragment 2: 10 min at 95 °C, and then 10 cycles consisting of 1 min at 94 °C, 1 min at 62 °C and 1 min at 72 °C; 10 cycles consisting of 1 min at 95 °C, 1 min at 60 °C and 1 min at 72 °C, and 15 cycles consisting of min at 95 °C, 1 min at 58 °C and 1 min at 72 °C (Don et al., 1991).

### 2.3. DHPLC

DNA amplified in two different reactions (fragments 1 and 2) as described above was submitted to a denaturing step by heating at 95 °C for 5 min followed by a gradual re-annealing by cooling to 60 °C (2 °C/min) to enhance heteroduplex formation. Fifteen microliters of each re-annealed PCR product were applied to an automated HPLC apparatus equipped with a DNASep column (Wave-nucleic acid fragment analysis system—Transgenomic Inc., Omaha, NE, USA). Parameters of gradient and flow rate were adjusted with the Wavemaker system control software (Transgenomic Inc, Omaha, NE, USA). DNA was eluted in a linear acetonitrile gradient of buffers A and B. Buffer A consisted of 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA) (Transgenomic Inc., Omaha, NE, USA) and buffer B of 0.1 M TEAA and 25% acetonitrile (JT Baker, NJ, USA). The start and end points of the gradient obtained by mixing eluents A and B were adjusted using the algorithm provided by the Wavemaker software (Transgenomic Inc., Omaha, NE, USA). Elution of DNA was detected by 260 nm UV absorbance and the chromatograms were analyzed based on patterns of peak number and relative weight. First, the amplicons were analyzed under non-denaturing conditions at 50 °C to estab-

lish the volume of sample injection for the mutation analysis that ranged from 8 to 10  $\mu$ L. The temperature for optimal resolution of heteroduplex and homoduplex DNA was determined by a DHPLC melting algorithm using the Wavemaker software (Transgenomic Inc., Omaha, NE, USA) and also by analyzing the melting behavior of each PCR fragment while the temperature was varied by 1 °C increments.

Each sample in which only one peak was identified was further analyzed by preparing equimolar mixtures with PCR products from known wild-type samples to generate potential heteroduplex species. After the addition of the wild-type sample, denaturation, re-annealing, and re-injection into the DNASep column the appearance of heterozygous elution profiles confirmed the presence of a homozygous mutant genotype. The corresponding homozygous for the wild type profile appeared as only one peak. The flowchart for this strategy is shown in Fig. 2.

### 2.4. DNA sequencing

PCR products were sequenced with the Dynamic<sup>tm</sup> ET terminator sequenced kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) according to manufacturer instructions. Sequencing reactions were separated on ABI Prism-377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### 2.5. Endonuclease digestion

PCR for the entire open reading frame of *PRNP* was carried out in a total volume of 50  $\mu$ L using the forward primer of fragment 1 and the reverse primer of fragment 2 (Fig. 1) under the same conditions and at an annealing temperature of 63 °C. The PCR products were purified by precipitation with 400  $\mu$ L of 2-propanol (PA, Merck, Germany) for precipitation of the DNA and elimination of the PCR mix followed by a second precipitation with 400  $\mu$ L of 70% ethanol (Merck, Germany). The DNA was dissolved at 20 ng/ $\mu$ L in sterile water. Restriction endonucleases *PvuII*, *NspI*, and *BbvI* were used to analyze codons 117, 129, and 171 respectively (Fink et al., 1994; Windl et al., 1999). Enzymes were supplied by New England Biolabs and Amersham Biosciences and were used according to manufacturer recommendations. Digestion was carried out by incubation at 37 °C for 16 h followed by enzyme inactivation at 65 °C. Digestion products were analyzed by electrophoresis on 8% polyacrylamide gels and DNA was stained with silver.

### 2.6. Cloning of the PCR products

The complete *PRNP* coding region from DNA samples containing each type of polymorphism or mutation was amplified using the same conditions as described above and products were cloned in the PCR 2.1 vector using the TA-cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). DNA purified from transforming colonies was sequenced to confirm the presence of variant alleles.

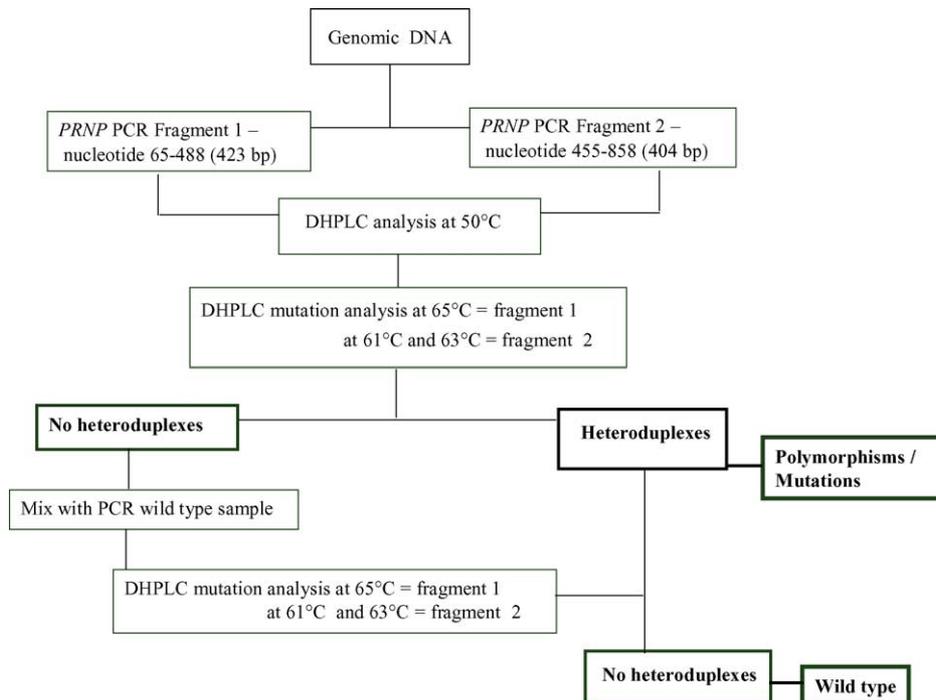


Fig. 2. Flowchart of DHPLC strategy for *PRNP* analysis. *PRNP* ORF was amplified in two separate overlapping fragments and the PCR products submitted to DHPLC. Analysis of each amplicon was done using non-denaturing conditions at 50°C and at partial denaturing temperatures (65°C for fragment 1 and 61 and 63°C for fragment 2). DHPLC profile presenting a single sharp peak indicates homoduplex formation (homozygous sample) while heteroduplex formation (heterozygous sample) is characterized by double or triple peaks and a heterozygous mutant/polymorphic genotype. In the first case (homoduplex) the sample must be mixed with a PCR product from a control (wild type) sample and re-analyzed by DHPLC. The appearance of a single sharp peak (homoduplex) confirms that the sample analyzed is wild type while a heteroduplex formation (double or triple peaks) characterizes a homozygous mutant/polymorphic genotype. In bold, the final findings that guide to the conclusions of the DHPLC analysis.

### 3. Results

The *PRNP* ORFs of a total 567 genomic DNA samples were submitted to DHPLC analysis and to direct sequencing. We had no previous information about the presence of any *PRNP* polymorphism in 562 DNAs. We also tested DNA samples from GSS and CJD patients with mutations previously described at codons 102, 183 and 210, respectively. Despite the large number of epileptic syndromes evaluated here, their association with *PRNP* polymorphisms was not the scope of the present study.

The samples yielding similar DHPLC profiles were grouped together and compared to their sequencing results. Polymorphic sites at codons 117, 129 and 171 were also confirmed by specific endonuclease digestion.

In order to establish the DHPLC patterns for polymorphic and mutation sites at *PRNP* we divided the ORF into two overlapping amplicons using the primers described in Fig. 1. The strategy applied for each reaction is schematically presented in Fig. 2 where a preliminary analysis of each amplicon was always done using non-denaturing conditions at 50°C in order to quantify and verify the quality of the PCR product. Under these conditions, the presence of an octarepeat deletion within fragment 1 was promptly observed due to a specific DHPLC profile of the shorter PCR product when compared to the wild type sample (Fig. 3).

This pattern was confirmed in all 40 samples characterized as heterozygote for the octarepeat deletion by direct sequencing (Table 1). When fragment 1 amplicon was submitted to 65°C the wild type samples showed a single peak of partially denatured homoduplex DNA, whereas the presence of polymorphic or mutation sites led to distinct profiles with two or more peaks (Fig. 4). These peaks are caused by partially denatured heteroduplex molecules that are retained in the column for shorter times and are specific for each heterozygous site. Specificity of the profiles was confirmed for

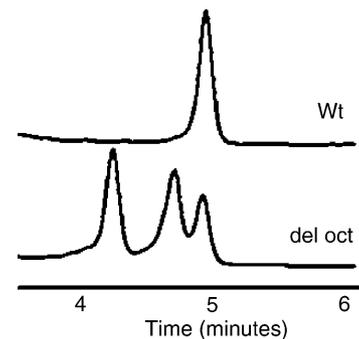


Fig. 3. *PRNP* fragment 1 DHPLC sizing analysis. Amplification products from *PRNP* fragment 1 (codons 8–148) analyzed by DHPLC using non-denaturing conditions at 50°C (sizing) show different profiles for a sample with an octarepeat deletion compared with a wild type sample.

Table 1  
Number of *PRNP* variant alleles identified using DHPLC in 567 DNA samples

| Fragment 1          |       |       |                         |                 |               |                                 |       | Fragment 2 |       |       |       |
|---------------------|-------|-------|-------------------------|-----------------|---------------|---------------------------------|-------|------------|-------|-------|-------|
| Octarepeat deletion | P102L | M129V | A117A <sub>silent</sub> | Del Oct + M129V | P102L + M129V | M129V + A117A <sub>silent</sub> | V129V | N171S      | T183A | V210I | E219K |
| 22                  | 2     | 221   | 13                      | 18              | 1             | 18                              | 57    | 44         | 1     | 1     | 2     |

13 A117A<sub>silent</sub> samples, 221 samples with M129V, 22 samples with octarepeat deletion and two samples with P102L mutation (Table 1). In addition, different profiles are found when two polymorphic sites are present in this fragment. The occurrence of an octarepeat deletion or an A117A<sub>silent</sub> polymorphism in heterozygosis with M129V produced profiles which differed from those observed for each single

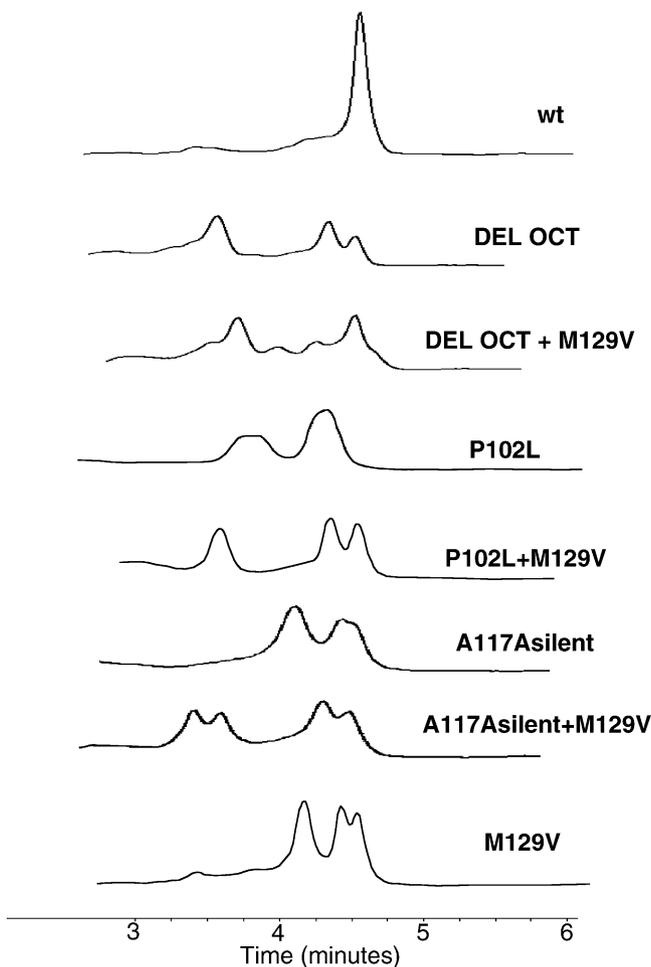


Fig. 4. DHPLC elution profiles of homo and heteroduplexes from *PRNP* fragment 1 (codons 8–148) polymorphic and mutation sites at 65 °C. The chromatograms show a homoduplex control (wild type) sample and samples containing heteroduplexes characterized by specific profiles for mutation at codon 102 (P102L) and polymorphisms at codons 117 (A117A<sub>silent</sub>), 129 (M129V) and the octarepeat deletion (Del Oct). The combination of two polymorphic sites also produced a specific profile which was different from that presented by each polymorphism alone (Del Oct + M129V, P102L + M129V and A117A<sub>silent</sub> + M129V).

polymorphism (Fig. 4) and were confirmed in 18 samples of both combinations (Table 1).

It is important to note that the presence of a profile with a sharp peak does not necessary characterize a wild type sample but rather the presence of a homoduplex, which means that a polymorphism/mutation may be present in homozygosis. Therefore, when the first screening analysis shows homoduplex formation, mixing the sample with a PCR product from a wild type sequence is mandatory (Fig. 2). Using this approach, a second round of DHPLC from mixed samples (sample of interest plus wild type control) confirmed 253 wild type samples (for fragment 1) and 57 V129V samples which then produced in this mixed reaction a heteroduplex profile of the M129V samples. Furthermore, there were no heterozygotes for octarepeat deletion or A117A<sub>silent</sub> polymorphisms in our samples. However, the presence of these variants should produce specific heteroduplex profiles, analogous to those presented in Fig. 4, after mixing with wild type samples and running in a second round of DHPLC.

The second *PRNP* amplicon (codons 138 to stop codon plus 53 bp) was submitted to DHPLC analysis at 63 °C (Fig. 2) and a single peak of partially denatured homoduplex DNA was also observed for the wild type sample. DNA presenting heterozygous polymorphic or mutation sites at codons 171, 183 or 210, respectively, showed different retention times on the DHPLC column (Fig. 5). The pattern specificity was confirmed in 44 samples with the N171S polymorphism characterized by direct sequencing and restriction digestion with *BbvI*. However, only two samples, one containing the mutation at codon 183 (T183A) and the other at codon 210 (V210I), were available for analysis.

The conditions initially used for fragment 2 were unable to discriminate between polymorphic sites at codons 171 (N/S) and 219 (E/K) (Fig. 5) but a reduction of the denaturation temperature to 61 °C permitted us to obtain specific profiles for each of these sites (Fig. 6). Nevertheless, the pattern specificity for the other mutations (codons 183 and 210) was lost at this temperature (61 °C).

In summary, our results showed 100% coincidence of the direct sequencing and restriction enzyme analysis (when applied) with DHPLC when *PRNP* ORF was amplified in two fragments and analyzed at 65 °C for *PRNP* fragment 1 and at 61 °C and 63 °C for fragment 2. Therefore, DHPLC produced highly reproducible profiles allowing the identification of *PRNP* polymorphisms and mutations based on differences in chromatogram shape.

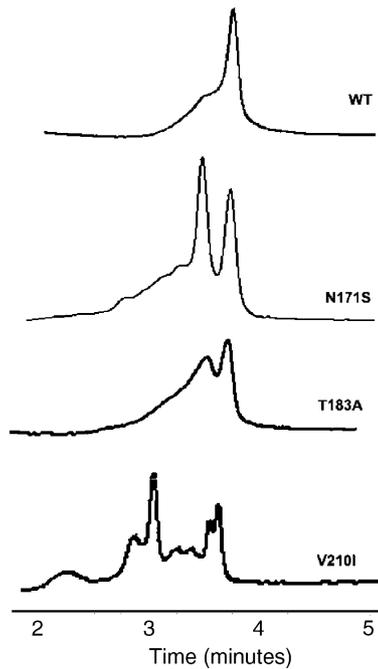


Fig. 5. DHPLC elution profiles of homo and heteroduplexes from *PRNP* fragment 2 (codons 138 to stop plus 53 bp) polymorphic and mutation sites at 63 °C. The chromatograms show a homoduplex control (wild type) sample and samples containing heteroduplexes characterized by specific profiles for the polymorphism at codon 171 (N171S) and mutations at codons 183 and 210.

#### 4. Discussion

There is a continuing need for improved, efficient, rapid and low cost technology for the detection of *PRNP* polymorphisms and mutations. DHPLC has been used successfully for the detection of mutations and polymorphisms in several genes including those related to cancer predisposition (reviewed by Xiao and Oefner, 2001).

DHPLC analysis performed according to the conditions described here resulted in a straightforward detection of the variant alleles in codons 102, 117, 129, 171, 183, 210 and 219 and identified one octarepeat deletion independently of direct DNA sequencing analysis. An identical pattern of retention times within the column was observed for all samples

with the same genetic alteration and no false results were detected, a fact indicating high sensitivity and specificity. Nevertheless, more variant alleles than those evaluated here have been described for *PRNP* (reviewed by Mastrianni and Roos, 2000) and a careful evaluation of DHPLC conditions for each nucleotide change or combination of changes different from those described here will be required.

While direct sequencing may be the most efficient way to identify variant alleles, sometimes problems may occur, in particular when a CG-rich region is analyzed (Parker et al., 1995), which is the case for the 5' region of the *PRNP* ORF. In this situation, it is necessary to clone the PCR products and sequence a large number of colonies, an expensive and time consuming approach. On the other hand, endonuclease digestion can be an interesting alternative but it is restricted to the analyses of variant alleles that create or suppress a cleavage site for the enzyme.

In contrast, DHPLC is an excellent detection strategy of lower cost, excellent resolution and easy analysis. The major requirement is the quality and quantity of PCR products ( $A_{260} > 2$  mV) and the size of the amplification product that should be less than 700 bp (reviewed by Xiao and Oefner, 2001). It is also recommended to check the column conditions and the oven temperatures frequently, as well as to run controls with known nucleotide changes in every run to ensure the reproducibility of the assay. Hence, two PCR procedures (fragment 1 and 2) are necessary for *PRNP* ORF evaluation and the profile of each PCR product is completed in 8 min. Therefore, the entire ORF analysis will be ready in 16 min for heterozygous samples. In the case of homozygous samples, the PCR product must be mixed with a control sample, must be submitted to a denaturation step and run again in the DHPLC, a procedure that takes 16 additional minutes. Therefore, with the cost of two PCR reactions (not included the equipment cost) and in about 30 min an entire *PRNP* ORF can be analyzed. The automated DHPLC equipment can be loaded with 192 samples.

In conclusion, the DHPLC technique under optimized conditions is a rapid, highly accurate and useful tool to determine polymorphisms and mutations in *PRNP*. This approach will permit the screening of relatives from families with hereditary prion diseases, high risk populations

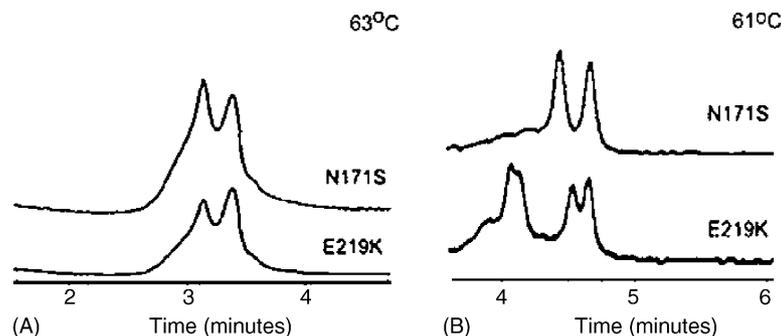


Fig. 6. DHPLC elution profiles from *PRNP* fragment 2 at 63 °C and 61 °C. The DHPLC elution profile of heteroduplexes polymorphic sites at codons 171 (N171S) and 219 (E219K) showed a better resolution at 61 °C (panel B) than at 63 °C (panel A).

for vCJD (Collinge, 2001) and for worse cognition in the elderly (Berr et al., 1998), in Alzheimer (Berr et al., 2003) and Down syndrome (Del Bo et al., 2003) and for susceptibility to epileptic syndromes. It will also permit the prediction of a poorer surgical outcome in patients with Hippocampal Sclerosis (Walz et al., 2003).

Finally, one major sanitary problem is related to prion diseases in cattle and sheep and how variant alleles at their *PRNP* sequence are linked to infection susceptibility (Goldmann et al., 1994; Hunter, 1997). The use of DHPLC and an adaptation of the conditions described here will also permit the prompt evaluation of a large number of animals.

## Acknowledgements

This work was supported by grant from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo # 99/07124-8). R.M.R.P.S. Castro and M.C. Landemberger are research fellows supported by CAPES and FAPESP, respectively.

## References

- Berr C, Richard F, Dufouil C, Amant C, Alperovitch A, Amouyel P. Polymorphism of the prion protein is associated with cognitive impairment in the elderly: the EVA study. *Neurology* 1998;51(3):734–7.
- Berr C, Helbecque N, Szadovitch V, Mohr M, Amant C, Amouyel P, et al. Polymorphism of the codon 129 of the prion protein (PrP) gene and neuropathology of cerebral ageing. *Acta Neuropathol Berl* 2003;106:71–4.
- Campbell TA, Palmer MS, Will RG, Gibb WR, Luthert PJ, Collinge J. A prion disease with a novel 96-base pair insertional mutation in the prion protein gene. *Neurology* 1996;46:761–6.
- Capellari S, Vital C, Parchi P, Petersen RB, Ferrer X, Jarnier D, et al. Familial prion disease with a novel 144bp insertion in the prion protein gene in a Basque family. *Neurology* 1997;49:133–41.
- 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(6602):685–90.
- Collinge J. Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci* 2001;24:519–50.
- Del Bo R, Comi GP, Giorda R, Crimi M, Locatelli F, Martinelli-Boneschi F, et al. The 129 codon polymorphism of the prion protein gene influences earlier cognitive performance in Down syndrome subjects. *J Neurol* 2003;250:688–92.
- Doh-ura K, Tateishi J, Sasaki H, Kitamoto T, Sakaki Y. Proleu 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;163:974–9.
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucl Acids Res* 1991;19:4008.
- Fink JK, Peacock ML, Warren Jr JT, Roses AD, Prusiner SB. Detecting prion protein gene mutations by denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum Mutat* 1994;4:42–50.
- Gambetti P, Parchi P, Chen SG. Hereditary Creutzfeldt–Jakob disease and fatal familial insomnia. *Clin Lab Med* 2003;23:43–64.
- Goldfarb LG, Brown P, Little BW, Cervenakova L, Kenney K, Gibbs Jr CJ, et al. A new (two-repeat) octapeptide coding insert mutation in Creutzfeldt–Jakob disease. *Neurology* 1993;43:2392–4.
- Goldmann W, Hunter N, Smith G, Foster J, Hope J. PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. *J Gen Virol* 1994;75(Pt 5):989–95.
- Hsiao K, Baker HF, Crow TJ, Poulter M, Owen F, Terwilliger JD, et al. Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann–Straussler syndrome. *Nature* 1989;338:342–5.
- Hunter N. PrP genetics in sheep and the applications for scrapie and BSE. *Trends Microbiol* 1997;5(8):331–4.
- Laplanche JL, Delasnerie-Laupretre N, Brandel JP, Dussaucy M, Chate-lain J, Launay JM. Two novel insertions in the prion protein gene in patients with late-onset dementia. *Hum Mol Genet* 1995;4:1109–11.
- Lee IY, Westaway D, Smit AF, Wang K, Seto J, Chen L, et al. Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. *Genome Res* 1998;8:1022–37.
- Martins VR, Linden R, Prado MA, Walz R, Sakamoto AC, Izquierdo I, et al. Cellular prion protein: on the road for functions. *FEBS Lett* 2002;512:25–8.
- Mastrianni JA, Roos RP. The prion diseases. *Semin Neurol* 2000;20:337–52.
- Nitrini R, Rosemberg S, Passos-Bueno MR, da Silva LS, Iughetti P, Papadopoulos M, et al. Familial spongiform encephalopathy associated with a novel prion protein gene mutation. *Ann Neurol* 1997;42:138–46.
- Oefner PJ, Bonn GK, Huber CG, Nathakarnkitkool S. Comparative study of capillary zone electrophoresis and high-performance liquid chromatography in the analysis of oligonucleotides and DNA. *J Chromatogr* 1992;625:331–40.
- Owen F, Poulter M, Lofthouse R, Collinge J, Crow TJ, Risby D, et al. Insertion in prion protein gene in familial Creutzfeldt–Jakob disease. *Lancet* 1989;1:51–2.
- Palmer MS, Collinge J. Mutations and polymorphisms in the prion protein gene. *Hum Mutat* 1993;2:168–73.
- Parker LT, Deng Q, Zakeri H, Carlson C, Nickerson DA, Kwok PY. Peak height variations in automated sequencing of PCR products using Taq dye-terminator chemistry. *Biotechniques* 1995;19:116–21.
- Pocchiari M, Salvatore M, Cutruzzola F, Genuardi M, Allocatelli CT, Masullo C, et al. A new point mutation of the prion protein gene in Creutzfeldt–Jakob disease. *Ann Neurol* 1993;34:802–7.
- Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13363–83.
- Ripoll L, Laplanche JL, Salzmann M, Jouvett A, Planques B, Dussaucy M, et al. A new point mutation in the prion protein gene at codon 210 in Creutzfeldt–Jakob disease. *Neurology* 1993;43:1934–8.
- Samaia HB, Mari JJ, Vallada HP, Moura RP, Simpson AJ, Brentani RR. A prion-linked psychiatric disorder. *Nature* 1997;390(6657):241.
- Tanaka Y, Minematsu K, Moriyasu H, Yamaguchi T, Yutani C, Kitamoto T, et al. A Japanese family with a variant of Gerstmann–Straussler–Scheinker disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997;62(5):454–7.
- Walz R, Castro RMRPS, Velasco TR, Alexandre Jr V, Lopes MH, Leite JP, et al. Surgical outcome in mesial temporal sclerosis correlates with prion protein gene variant. *Neurology* 2003;61:1204–9.
- Windl O, Giese A, Schulz-Schaeffer W, Zerr I, Skworc K, Arendt S, et al. Molecular genetics of human prion diseases in Germany. *Hum Genet* 1999;105:244–52.
- Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: a review. *Hum Mutat* 2001;17:439–74.
- Zimmermann K, Turecek PL, Schwarz HP. Genotyping of the prion protein gene at codon 129. *Acta Neuropathol Berl* 1999;97:355–8.