

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA
DE MOLÉCULAS DE PrP^C
CONTENDO OS POLIMORFISMOS
NOS CÓDONS M129V E N171S**

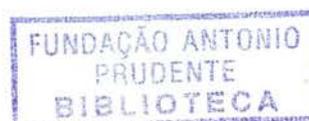
KATHLEEN KINDLMANN

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

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dra. Vilma Regina Martins

**São Paulo
2003**



FICHA CATALOGRÁFICA

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

Kindlmann, Kathleen

Avaliação da atividade biológica de moléculas de PrP^C contendo os polimorfismos nos códons M129V e N171S / Kathleen Kindlmann. – São Paulo, 2003.

79p.

Dissertação(mestrado)–Fundação Antônio Prudente.

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

Oncologia.

Orientador: Vilma Regina Martins.

Descritores: 1. PROTEÍNAS PrP^C. 2. POLIMORFISMO (GENÉTICA) /fisiologia. 3. CÓDON. 4. LIGAÇÃO PROTÉICA. 5. COMPARTIMENTO CELULAR.

DEDICATÓRIA

**Dedico este trabalho a meus pais
que me apoiaram para que eu pudesse concluí-lo**

Fundação Antonio Prudente

Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora Pós-Graduação

AGRADECIMENTOS

À **Dra. Vilma R. Martins** pela orientação não apenas científica mas também pessoal.

Ao Prof. **Dr. Ricardo R. Brentani** por possibilitar a existência de pesquisa científica no Brasil.

Ao **Dr. Luiz Fernando Lima Reis** pela excelência na direção desta pós-graduação.

Aos colegas de Laboratório de Biologia Celular e Molecular, **Angelita, Marilene, Michele, Rosa, Carolina, Flávia, Adriana, Kil, Cinthia, Zanata, Glaucia, Camila, Carolina Lembke e Tatiana** pelo apoio e incentivo.

À **Regina Nomizo** pelas conversas e ajuda na Cultura de células.

À **Daniela** pela amizade e **Anna Chris** pelos sequenciamentos.

Ao pessoal da biblioteca **Rosinéia, Suely, Adriana, Francyne e Alessander**.

À **Ana Maria e Márcia**, da secretaria de pós-graduação.

À todos os **colegas e professores do Instituto Ludwig e do Hospital do Câncer**.

Aos **meus pais**, ao **André** e à **minha irmã**, pela compreensão nos momentos difíceis.

À **FAPESP** pela bolsa de mestrado concedida (processo nº 02/05527-2, temático nº 99/07124-8) e à **CAPES** pela bolsa concedida.

RESUMO

Kindlmann, K. **Avaliação da atividade biológica de moléculas de PrP^C contendo os polimorfismos nos códons M129V e N171S.** São Paulo; 2003. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antonio Prudente].

A proteína prion celular, PrP^C, é isoforma de uma proteína infecciosa, PrP^{Sc}, responsável por doenças neurodegenerativas denominadas encefalopatias espongiformes, e sabe-se que essas moléculas diferem apenas na conformação protéica. PrP^C está envolvido com várias funções fisiológicas incluindo homeostase de íons cobre e proteção contra estresse oxidativo, adesão neuronal, extensão e manutenção de neuritos e transdução de sinal. Nosso grupo demonstrou que PrP^C é capaz de ligar-se à laminina, sendo que essa interação é importante no processo de neuritogênese. Camundongos nocaute para o gene de PrP^C (*Prnp*) apresentam maior susceptibilidade a drogas convulsivantes, o que levou nosso grupo a avaliar a correlação deste gene com epilepsias humanas. A análise do gene de PrP^C mostrou que 23% de um grupo de 100 pacientes com epilepsia relacionada a esclerose hipocampal têm o polimorfismo N171S (em heterozigose), sendo que esta variante alélica não foi encontrada nos 200 controles normais avaliados. No presente trabalho procuramos investigar possíveis alterações na função de PrP^C causadas pelo polimorfismo N171S. Este códon encontra-se, na molécula de PrP^C, muito próximo ao domínio de interação com a laminina. Por isso, produzimos proteínas PrP^C humanas recombinantes com as diferentes combinações do polimorfismos N171S e M129V, e realizamos ensaios de ligação com um peptídeo de laminina que é o ligante de PrP^C. Estudamos ainda a compartimentalização celular das diferentes proteínas em fusão com a proteína fluorescente verde (GFP), bem como o padrão de glicosilação das mesmas. Nossos resultados mostram que a afinidade *in vitro* das proteínas com N ou S no códon 171 por laminina são semelhantes. Além disso as proteínas em fusão com GFP encontram-se distribuídas na superfície celular e ainda em compartimentos intracelulares que correspondem ao complexo de Golgi e

vesículas de reciclagem, e possuem o mesmo padrão de glicosilação. Até o momento não encontramos evidências que expliquem a alta prevalência do polimorfismo N171S em pacientes epiléticos. Atualmente o grupo tem estudado sinalização celular desencadeada por PrP^C, e pretende também verificar possíveis alterações de vias de sinalização em função do polimorfismo em questão.

SUMMARY

Kindlmann, K. **Avaliação da atividade biológica de moléculas de PrP^C contendo os polimorfismos nos códons M129V e N171S** [Evaluation of biological activity of PrP^C molecules with polymorphisms at codons M129V and N171S]. São Paulo; 2003. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antonio Prudente].

The cellular prion protein, PrP^C, is an isoform of an infectious protein, PrP^{Sc}, that is responsible for neurodegenerative diseases named spongiform encephalopathies, and it is known that these molecules differ only on the protein conformation. PrP^C is involved in many physiological functions that include a role in copper metabolism and protection against oxidative stress, neuronal cell adhesion, neurite extension and maintenance and signal transduction. Our group demonstrated that PrP^C binds laminin, and this interaction mediates neuritogenesis. PrP^C gene (*Pnpn*) knockout mice have an increased sensitivity to pharmacologically induced seizures, what lead us to evaluate the association of this gene with human epilepsies. *Pnpn* analysis demonstrated that 23% in a group of 100 patients with mesial temporal lobe epilepsy related to hippocampal sclerosis are heterozygous for a polymorphism at codon 171 (N171S). Nonetheless, this variant allele was not found in 200 control subjects, indicating that it is a rare polymorphism in normal population. In the present work we sought for possible alterations in the PrP^C function caused by the polymorphism N171S. This codon is very close to the PrP^C-laminin interaction domain. Thus, we produced recombinant human PrP^C containing the different combinations of the polymorphisms at codons 171 and 129 (N171S and M129V) and performed binding assays with laminin chain γ 1 peptide, which is the PrP^C ligand. We also studied the cellular compartmentalization of the different PrP^C proteins fused to the Green Fluorescent Protein (GFP) and also evaluated their glycosylation pattern. Our results show that laminin affinity for proteins with aminoacids N or S in codon 171 is similar at least *in vitro*. Furthermore, both proteins fused to GFP are distributed in a similar way at the plasma membrane and in intracellular compartments which are

compatible with Golgi complex and recycle vesicles. The proteins also show the same glycosylation pattern. Presently, our data do not show any evidence that elucidate the high prevalence of polymorphism N171S in epileptic patients and the next step will focus on the cellular signalling triggered by PrP^C and possible alterations in signalling due to the polymorphism at this codon.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 1 | cDNA de PrP ^C humano (NCBI GI 11079225) mostrando locais de hibridação dos <i>primers</i> utilizados. | 29 |
| Figura 2 | Gel de agarose mostrando produtos de PCRs. | 31 |
| Figura 3 | Gel de agarose mostrando produto de PCR. | 32 |
| Figura 4 | Mapa do plasmídeo pEGFP-C1 (Clontech). | 33 |
| Figura 5 | Sequenciamento de fragmento de fase aberta de leitura de PrP ^C clonada em pEGFP-C1. | 34 |
| Figura 6 | Aminoácidos 23 a 253 de PrP ^C em fusão com a proteína fluorescente verde. | 37 |
| Figura 7 | Sequenciamento de parte da fase aberta de leitura de <i>Prnp</i> . | 39 |
| Figura 8a | Sequenciamento de parte da fase aberta de leitura de <i>Prnp</i> correspondente a PrP ^{C129M/171N} . | 40 |
| Figura 8b | Sequenciamento de parte da fase aberta de leitura de <i>Prnp</i> correspondente a PrP ^{C129V/171S} . | 41 |
| Figura 8c | Sequenciamento de parte da fase aberta de leitura de <i>Prnp</i> correspondente a PrP ^{C129V/171N} . | 42 |
| Figura 9a | Tabela mostrando fragmentos obtidos do inserto de <i>Prnp</i> digerido com <i>BbvI</i> . | 46 |
| Figura 9b | Gel de poliacrilamida corado com prata mostrando fragmentos resultantes da digestão do inserto de <i>Prnp</i> amplificado a partir de clones e digerido com <i>Bbv I</i> . | 46 |
| Figura 10 | Gel de poliacrilamida corado com prata mostrando fragmentos resultantes da digestão do inserto de <i>Prnp</i> amplificado a partir de DNA genômico e digerido com <i>Bbv I</i> . | 47 |
| Figura 11a | Imagem de microscopia confocal mostrando distribuição de GFP-PrP ^{C129V/171N} em células HEK293. | 49 |
| Figura 11b | Imagem de microscopia confocal mostrando distribuição de GFP-PrP ^{C129V/171S} em células HEK293. | 50 |

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 12 | <i>Western blot</i> de extratos de cultura celular de HEK293 transfectadas com pEGFP-PrP ^{C 129V/171S} e pEGFP-PrP ^{C 129V/171N} , mostrando bandas correspondentes aos três estados de glicosilação de PrP ^C . | 52 |
| Figura 13 | Mapa do plasmídeo pRSET-A (Invitrogen TM). | 54 |
| Figura 14 | Expressão das proteínas recombinantes de PrP ^C em bactéria a) gel de poliacrilamida corado com coomassie. b) <i>Immunoblot</i> . | 57 |
| Figura 15a | Curvas total, inespecífica e específica da interação entre PrP ^{C129M/171N} recombinante e o peptídeo da cadeia $\gamma 1$ de laminina. | 59 |
| Figura 15b | Gráfico de Scatchard obtido a partir dos valores da curva específica. | 59 |
| Figura 16a | Curvas total, inespecífica e específica da interação entre PrP ^{C129V/171S} recombinante e o peptídeo da cadeia $\gamma 1$ de laminina. | 60 |
| Figura 16b | Gráfico de Scatchard obtido a partir dos valores da curva específica. | 60 |
| Figura 17a | Curvas total, inespecífica e específica da interação PrP ^C recombinante de camundongo e o peptídeo da cadeia $\gamma 1$ de laminina. | 61 |
| Figura 17b | Gráfico de Scatchard obtido a partir dos valores da curva específica. | 61 |
| Figura 18a | Curvas total, inespecífica e específica da interação PrP ^C de camundongo renaturado na presença de Cu ²⁺ e o peptídeo da cadeia $\gamma 1$ de laminina. | 62 |
| Figura 18b | Gráfico de Scatchard obtido a partir dos valores da curva específica. | 62 |

ABREVIACÕES

- aa: aminoácido(s)
- BSA: albumina sérica bovina
- BSE: bovine spongiform encephalopathy
- cAMP/PKA: AMP cíclico/ proteína kinase A
- CJD: doença de Creutzfeldt-Jakob
- C-terminal: carboxi-terminal
- D178N: Mutação do códon 178 de *Prnp* codificando ácido aspártico (D) ou asparagina (N)
- FFI: Insônia Familiar Fatal
- GFP: Green Fluorescent Protein
- GPI: Glicosilfosfatidilinositol
- GSS: doença de Gerstmann-Straüssler-Scheinker
- His₆-PrP^C: proteína prion celular recombinante em fusão com peptídeo que contém 6 resíduos de histidina
- Kd: constante de dissociação no equilíbrio
- kDa: kilo Dalton
- LN: laminina
- M129V: Polimorfismo do códon 129 de *Prnp* codificando metionina (M) ou valina (V)
- MCS: Sítio Múltiplo de Clonagem
- MTLE-HS: epilepsia do lobo mesial temporal relacionada a esclerose hipocampal
- N171S: Polimorfismo do códon 171 de *Prnp* codificando asparagina (N) ou serina (S)
- ORF: open reading frame ou fase aberta de leitura
- PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
- Prnp*: gene cromossomal codificador da proteína prion celular
- PrP^C: Proteína prion celular
- PrP^{C 129M/171N}: proteína prion celular com M no códon 129 e N no códon 171

PrP^{C 129M/171S}: proteína prion celular com M no códon 129 e S no códon 171

PrP^{C 129V/171N}: proteína prion celular com V no códon 129 e N no códon 171

PrP^{C 129V/171S}: proteína prion celular com V no códon 129 e S no códon 171

PrP^{Sc}: Proteína prion infecciosa ou *scrapie*

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio

STI-1: stress-inducible protein-1

tPA: ativador tecidual de plasminogênio

UV: ultra violeta

ÍNDICE

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 | Prion e Prion Celular | 1 |
| 1.2 | PrP ^C , Seus Ligantes e Funções Biológicas | 3 |
| 1.3 | Prion e Epilepsia | 6 |
| 1.4 | Polimorfismos de <i>Prnp</i> e Patologias Associadas | 8 |
| 1.5 | Tráfego Intracelular de PrP ^C | 10 |
| 1.6 | Glicosilação de PrP ^C | 11 |
| 2 | MATERIAIS E MÉTODOS | 14 |
| 2.1 | Clonagem da fase aberta de leitura de <i>Prnp</i> humano em plasmídeo para célula eucariótica | 14 |
| 2.1.1 | Amplificação da sequência nucleotídica | 14 |
| 2.1.2 | Purificação do produto de PCR pelo método fenol/clorofórmio | 15 |
| 2.1.3 | Digestão do produto de PCR | 16 |
| 2.1.4 | Clonagem em plasmídeo para célula eucariótica | 16 |
| 2.1.5 | Transformação de bactérias quimiocompetentes | 17 |
| 2.1.6 | Purificação de plasmídeo e Seqüenciamento dos clones obtidos | 17 |
| 2.2 | Clonagem da fase aberta de leitura de <i>Prnp</i> humano em plasmídeo pCR | 18 |
| 2.2.1 | Amplificação da sequência nucleotídica | 18 |
| 2.2.2 | Transformação de bactérias quimiocompetentes | 18 |
| 2.2.3 | Digestão por enzimas de restrição e eletroforese em géis de poliacrilamida | 19 |
| 2.3 | Transfecção de célula eucariota | 20 |
| 2.4 | Subclonagem da fase aberta de leitura de <i>Prnp</i> humano em plasmídeo para expressão em célula procariótica | 21 |
| 2.4.1 | Amplificação da sequência nucleotídica e clonagem | 21 |
| 2.4.2 | Transformação de bactérias quimiocompetentes e purificação de Plasmídeo | 22 |
| 2.5 | Expressão e purificação de His ₆ -PrPc em bactéria | 23 |
| 2.6 | <i>Western blot</i> e <i>Immunoblot</i> | 24 |
| 2.7 | Ensaio de ligação | 25 |
| 2.7.1 | Marcação de γ 1-BSA com ¹²⁵ I | 25 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.7.2 | Curva de ligação entre peptídeo γ 1-BSA marcado e His ₆ -PrP ^C | 25 |
| 2.8 | Determinação do padrão de glicosilação | 26 |
| 3 | RESULTADOS | 28 |
| 3.1 | Amplificação da sequência nucleotídica codificadora de PrP ^C humano através de reações em cadeia da polimerase | 28 |
| 3.2 | Clonagem da sequência amplificada de PrP ^C em vetor para expressão em célula eucariótica (pEGFP-C1) | 32 |
| 3.3 | Sequenciamento da fase aberta de leitura de <i>Prnp</i> e seleção do alelo de interesse | 36 |
| 3.4 | Nova abordagem: amplificação da fase aberta de leitura de PrP ^C com primers F1 e R2 e clonagem da sequência amplificada em pCR 2.1 | 43 |
| 3.5 | Digestão com endonucleases <i>Bbv I</i> , eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração com prata | 45 |
| 3.6 | Transfecção de célula eucariota com o vetor pEGFP-C1 | 48 |
| 3.7 | Avaliação do padrão de glicosilação de GFP-PrP ^{C 129V/171N} E GFP-PrP ^{C 129V/171S} | 51 |
| 3.8 | Subclonagem das sequências nucleotídicas de PrP ^{C 129M/171N} e PrP ^{C 129V/171S} humanos em vetor de expressão para célula procariótica | 53 |
| 3.9 | Expressão de His ₆ -PrP ^C em bactéria, <i>Western Blot</i> e <i>Immunoblot</i> | 55 |
| 3.10 | Curva de ligação entre peptídeo γ 1-BSA marcado e His ₆ -PrP ^C | 57 |
| 4 | DISCUSSÃO | 64 |
| 5 | CONCLUSÕES | 71 |
| 6 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 72 |

ANEXO

Anexo 1 Walz R, Castro RMRPS, Velasco TR, et al. Surgical outcome in mesial temporal sclerosis correlates with prion protein gene variant. **Neurology** 2003; 61:1204-9.

1 INTRODUÇÃO

1.1 PRION E PRION CELULAR

Prions são partículas infecciosas exclusivamente protéicas e seu envolvimento na etiologia de doenças neurodegenerativas já está bem estabelecido (PRUSINER 1998a e b), embora o mecanismo de transmissão seja ainda controverso. Entre as doenças causadas por prion encontram-se formas bovina (bovine spongiform encephalopathy-BSE), ovina (scrapie) e humanas (doença de Creutzfeldt-Jakob – CJD, doença de Gerstmann-Straüssler-Scheinker–GSS, Insônia Familiar Fatal -FFI e Kuru). Essas doenças são caracterizadas por degeneração espongiiforme do cérebro e deposição de material amilóide no Sistema Nervoso Central.

A natureza protéica do agente causador dessas encefalopatias foi estabelecida em função de suas propriedades físico-químicas (resistência a altas temperaturas, a denaturação por formaldeído, a radiação UV e raios X) que levavam a crer que PrP^{Sc}- proteína prion *scrapie*- era composto por proteína e não por ácido nucléico (PRUSINER 1982), daí o conceito de “proteinaceous infectious particles” ou prion.

A purificação da PrP^{Sc} permitiu o seqüenciamento dos aminoácidos desta molécula e a dedução e síntese das possíveis combinações de oligonucleotídeos capazes de codificar um fragmento da extremidade amino-terminal da mesma. O uso desses oligonucleotídeos como sondas de cDNA possibilitou a identificação do gene cromossomal *Prnp* (codificador da proteína prion celular ou PrP^C), que está

localizado no braço curto do cromossomo 20 do homem e 2 do camundongo (SPARKES et al. 1986) e é constitutivamente expresso em cérebros de animais infectados e não-infectados por PrP^{Sc} (OESCH et al. 1985; CHESEBRO et al. 1985). A fase aberta de leitura (ORF) de PrP^C está toda contida num único exon de modo que as duas isoformas de PrP não podem ser variantes provenientes de "splicing" alternativo (BASLER et al. 1986), então passou-se a considerar que as proteínas celular e infecciosa diferiam apenas na conformação, conforme já havia sido proposto por GRIFFITH (1967).

Atualmente sabe-se que embora tenham a mesma seqüência de aminoácidos(aa), as proteínas PrP^C e PrP^{Sc} diferem na estrutura secundária, mais especificamente no conteúdo de α hélices e folhas β (HUANG et al. 1996), e enquanto a proteína celular é solúvel e susceptível à digestão por proteases, a forma infecciosa é insolúvel e resistente à proteólise limitada (MEYER et al. 1986).

O acúmulo de PrP^{Sc} insolúvel é provavelmente um dos eventos que leva à morte neuronal. Em 1989 PRUSINER baseou-se na proposta teórica do matemático GRIFFITH (1967) e propôs que quando o prion infeccioso entrava em contato com células normais, formava dímeros com sua isoforma celular que dessa maneira adquiria a conformação da partícula infecciosa. De acordo com este modelo novas moléculas de PrP^{Sc} seriam exponencialmente geradas a partir de PrP^C e formariam agregados insolúveis levando à morte neuronal.

Os genes que codificam PrP^C do homem, hamster, camundongo, rato, gado e galinha (KRETZSCHMAR et al. 1986; BASLER et al. 1986; LOCHT et al. 1986; LIAO et al. 1987; GOLDMANN et al. 1991; HARRIS et al. 1991) já foram seqüenciados. Todos codificam proteínas de superfície celular de aproximadamente

250 aa, com um peptídeo sinalizador de 22 aa na extremidade amino-terminal e um peptídeo hidrofóbico de 23 aa na porção carboxi-terminal, o qual é removido durante a adição de uma âncora de GPI (Glicosilfosfatidilinositol). Além da adição da âncora de GPI, a proteína sofre outras modificações pós e co-traducionais: N-glicosilação, formação de ponte dissulfeto intramolecular entre os resíduos 179 e 214 e remoção do peptídeo sinal (PRUSINER 1998a). Sendo PrP^C extremamente conservada entre as espécies, acredita-se que ela tenha funções celulares importantes. Assim, estudos têm indicado que PrP^C atua no metabolismo do cobre, sendo que sua capacidade de ligar este íon pode modular a atividade de superóxido dismutase (enzima antioxidante) e portanto proteger a célula contra o estresse oxidativo (BROWN et al. 2002).

1.2 PrP^C, SEUS LIGANTES E FUNÇÕES BIOLÓGICAS

As lamininas (LN) representam uma importante família de proteínas não-colagênicas presentes nas membranas basais e está associada a um grande número de fenômenos fisiológicos (BECK et al. 1990), dentre os quais pode-se citar adesão e migração celulares, participação na formação de neuritos, no direcionamento do cone de crescimento e em sinapses (VENSTROM e REICHARDT 1993; LUCKENBILL-EDDS 1997); além de ser um fator aptotático nos processos de migração e metástase de células tumorais. Sua interação com a superfície celular ocorre através de moléculas receptoras, integrinas e não integrinas.

Já foi demonstrado que LN previne morte neuronal após injeção de um análogo de glutamato, ácido caínico, capaz de ativar tPA (ativador tecidual de

plasminogênio) que converte plasminogênio em plasmina que por sua vez degrada LN. O efeito não foi observado em animais nocaute para tPA, nem em animais tipo selvagem na presença de inibidor de tPA. A morte neuronal também era elicitada por anticorpos que reconhecem LN, indicando que o desligamento neuronal da LN, seja por degradação proteolítica ou por impedimento estérico mediado por anticorpos, era letal (CHEN e STRICKLAND 1997). Naquele momento os autores não conheciam a identidade do receptor, mas WALZ et al. (1999) observaram que camundongos nocaute para o gene de PrP^C apresentam maior sensibilidade ao mesmo análogo de glutamato, bem como a outros agentes convulsivantes, quando comparados aos animais selvagens.

Então nosso grupo, realizando curvas de ligação, caracterizou a interação PrP^C-LN de alta afinidade ($K_d 2 \times 10^{-8} M$) e especificidade que se dá entre o peptídeo RNIAEIIKDI (um domínio C-terminal) da cadeia $\gamma 1$ da LN (GRANER et al. 2000a e b) com o domínio 173 a 178 da proteína prion celular (¹COITINHO et al.). A cadeia γ -1 é a mais conservada em todos os tipos de LN (LUCKENBILL-EDDS 1997), sugerindo que a interação PrP^C-LN pode ser importante numa variedade de tecidos onde ambos PrP^C e diferentes isoformas de LN são expressos. Já sabemos de sua importância no processo de neuritogênese em linhagens celulares e em culturas primárias de neurônios hipocâmpais (GRANER et al. 2000a e b), e na adesão e migração celulares (MOUSSA 2001). Células da linhagem PC12 quando pré-tratadas com NGF (nerve growth factor) apresentam aumento da neuritogênese sobre LN. Esse tratamento leva ao aumento das concentrações de PrP^C (CABRAL et al. 2002) sugerindo que o incremento de PrP^C na superfície celular pode aumentar a ligação

¹ Coitinho AS. Dados não publicados.

total à LN. A participação da ligação PrP^C-LN na diferenciação neuronal foi comprovada pela inibição da neuritogênese quer seja na presença de anticorpos que reconhecem PrP^C ou em camundongos que tiveram o *exon* codificador de PrP^C removido (GRANER et al. 2000a).

O fato da proteína prion celular associar-se à laminina e mediar adesão e diferenciação neuronais leva a crer que a interação PrP^C-LN pode atuar não apenas em processos fisiológicos, mas também patológicos. Assim, nosso grupo demonstrou a importância da interação PrP^C-LN em processos de adesão, migração e invasão de células tumorais *in vitro* e *in vivo* (MOUSSA 2001).

Nosso grupo caracterizou outro ligante de PrP^C, a co-chaperonina STI-1 (stress-inducible protein-1) encontrada principalmente no citoplasma com uma pequena fração presente na membrana celular (MARTINS et al. 1997), e recentemente demonstrou que o domínio de PrP^C que liga STI-1 vai do aminoácido 113 ao 128, interação que gera transdução de sinais neuroprotetores em neurônios retinianos (ZANATA et al. 2002; CHIARINI et al. 2002), indicando que esse domínio é muito importante para a função de PrP^C, assim como o domínio de ligação à LN. Sabemos ainda que a associação de PrP^C com STI-1 não exclui sua interação com LN (dados não publicados), indicando que PrP^C pode ser parte de um complexo macromolecular formado entre proteínas extracelulares e de superfície celular que é composto por pelo menos LN, PrP^C e STI-1 (MARTINS et al. 2002) e que transduz sinais tanto de diferenciação quanto de citoproteção. O grupo demonstrou que a neuroproteção desencadeada pela interação PrP^C – STI-1 se deve a sinalização via cAMP/PKA (CHIARINI et al. 2002), e pretende agora verificar se há alteração nessa via em função de alterações nas moléculas de PrP^C.

1.3 PRION E EPILEPSIA

Experimentos com camundongos *Prnp*^{0/0} (nocautes para PrP^C), mostraram que esses animais têm desenvolvimento e comportamento aparentemente normais (BÜELER et al. 1992; ROESLER et al. 1999). Porém a ausência de *Prnp* leva a alterações eletrofisiológicas no hipocampo (*in vitro*) que resultam em aumento da excitabilidade neuronal e poderiam promover atividade epileptiforme (COLLINGE et al. 1994; COLLING et al. 1996; MALLUCCI et al. 2002). *In vivo* estes animais apresentam maior sensibilidade a convulsões induzidas quimicamente por três agentes diferentes (WALZ et al. 1999), entre eles o ácido caínico, previamente demonstrado agir via degradação de LN (CHEN e STRICKLAND 1997). Desta forma, imaginamos que a perda total (camundongos nocaute) ou parcial (em humanos) da função de PrP^C poderia predispor à epileptogênese (WALZ et al. 2002).

A epilepsia é um grupo de doenças multifatoriais caracterizadas pela crise epiléptica que define o tipo de síndrome epiléptica. A epilepsia apresenta alta prevalência (5 a 10 casos por mil habitantes) e afeta pessoas de todas as idades, raças e níveis socio-econômicos. 20% das epilepsias são intratáveis farmacologicamente, e a epilepsia do lobo mesial temporal relacionada a esclerose hipocampal (MTLE-HS) é a mais comum forma de epilepsia tratada cirurgicamente (ENGEL 1996), além de ser responsável pelo maior número de indivíduos submetidos a cirurgia no Centro de Cirurgia de Epilepsia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP). Assim, pacientes com MTLE-HS foram selecionados para investigar a possível interação PrP^C-epilepsia.

Para isso, nosso grupo comparou sequências de *Prnp* de pacientes tratados cirurgicamente para epilepsia de lobo mesial temporal relacionada a esclerose hipocampal com seqüências de *Prnp* de indivíduos sadios (WALZ et al. 2003) (Anexo 1). Além de um polimorfismo silencioso no códon 117 e deleções do domínio de repetições de oito aa (peptídeo *octarepeat*) encontramos um polimorfismo no códon 171 onde uma asparagina é trocada por uma serina (N→S) previamente descrita como um polimorfismo raro (FINK et al. 1994) e ainda numa forma familiar de esquizofrenia atípica (SAMAIA et al. 1997). O polimorfismo N171S está presente em 23% dos pacientes epilépticos e em nenhum dos controles, e encontra-se frequentemente associado ao polimorfismo M129V, comumente encontrado na população mundial (BERR et al. 1998).

PrP^C está envolvido com várias funções fisiológicas incluindo homeostase de íons cobre e proteção contra stress oxidativo (revisado por VASSALLO e HERMS 2003), adesão neuronal, extensão e manutenção de neuritos (GRANER 2000a e b) e transdução de sinal (MOUILLET-RICHARD et al. 2000; ZANATA et al. 2002; CHIARINI et al. 2002), e sabe-se que mutações hereditárias ou espontâneas no gene de PrP^C (*Prnp*) podem levar a desordens neurológicas (PRUSINER 1998b), portanto o prejuízo nas funções de PrP^C poderia estar causando o fenótipo observado (epilepsia), embora ainda não se saiba qual a relevância dos polimorfismos de *Prnp* para a função de PrP^C.

Pode-se pensar que o polimorfismo N171S de *Prnp*, que encontra-se próximo ao domínio de ligação à laminina (173-178) seja capaz de modificar a interação de PrP^C com seus ligantes em particular com a laminina.

1.4 POLIMORFISMOS DE *Prnp* E PATOLOGIAS ASSOCIADAS

As doenças de prion ocorrem numa incidência de um por um milhão de indivíduos por ano no mundo para doença esporádica, e os casos hereditários apresentam ainda menor incidência (MASTRIANNI e ROOS 2000). As doenças priônicas são classificadas em esporádica (que possivelmente se originam em função de uma mutação somática ou a uma mudança conformacional protéica espontânea), hereditária (causadas por mutações germinativas) ou infecciosa. As doenças esporádicas normalmente iniciam-se após os 60 anos, já as hereditárias iniciam-se precocemente e cursam por um maior período que as primeiras. Nenhuma exposição ambiental foi associada a doenças de prion, com exceção dos recentes casos da nova variante de CJD (doença de Creutzfeldt-Jakob) que estão associados ao consumo de carne bovina contaminada por PrP^{Sc}, isto é, com encefalopatia espongiforme bovina.

Aproximadamente 15% das doenças priônicas são herdadas (herança autossômica dominante), e a mutação P102L em *Prnp* foi a primeira relacionada a doenças priônicas, em 1989 (HSIAO et al. 1989). Desde então mais de 20 mutações pontuais, inserções e deleções foram identificadas, algumas claramente relacionadas a doenças de prion (como P102L, D178N e E200K), além de polimorfismos como N171S, E219K e deleção na região de *octarepeat* (MASTRIANNI e ROOS 2000).

Um polimorfismo comum do códon 129 de *Prnp* (codificando Metionina ou Valina) parece ser um fator genético de susceptibilidade a doenças de prion, e a homoziguidade tanto de M como de V é fator de risco para desenvolvimento de CJD esporádico. Além disso, o fenótipo da doença de prion causada pela mutação D178N pode ser tanto FFI (Insônia Familiar Fatal) como CJD, dependendo se a

mutação está em cis com metionina ou valina no códon 129 (MASTRIANNI e ROOS 2000).

O EVA study – *The Etude du Vieillissement Artériel* – consiste de um estudo longitudinal sobre o envelhecimento vascular e cognitivo realizado entre junho de 1991 e julho de 1993. A partir desse estudo populacional BERR et al. (1998) selecionaram 1163 indivíduos nascidos entre 1922 e 1932 que foram submetidos a avaliação do performance cognitivo medido pelo MMSE (*Mini-Mental State Examination*) e agrupados segundo genótipo do códon 129 de *Prnp*. A conclusão de que o risco de prejuízo cognitivo (definido por uma pontuação de MMSE menor que 24) é significativamente aumentado em indivíduos genótipo V/V para códon 129 chamou atenção para a relação de polimorfismos de *Prnp* e doenças neurodegenerativas que não aquelas causadas por prion.

A Doença de Alzheimer assim como as Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (doenças priônicas) são caracterizadas pelo acúmulo de proteínas de estrutura anormal no cérebro levando à neurodegeneração. Na Doença de Alzheimer peptídeos β -amilóide formam agregados extracelulares enquanto nas Encefalopatias Espongiformes a isoforma infecciosa de PrP acumula-se nos neurônios e em agregados amilóides extracelulares. DERMAUT et al. (2003) recentemente descreveram uma prevalência aumentada do genótipo V/V do códon 129 de *Prnp* em pacientes com início precoce de doença de Alzheimer. Em linha com essas descobertas, CROES et al. (2003) relataram um declínio cognitivo precoce em pacientes homozigotos V/V bem como um número maior de pacientes com demência dentre estes. Em casos de CJD esporádico esse mesmo genótipo é significativamente mais freqüente em pacientes que desenvolvem a doença com menos de 50 anos

(ALPEROVITCH et al. 1999). Esses resultados sugerem uma maior susceptibilidade à neurodegeneração em portadores do genótipo *Prnp*129 V/V.

Essa linha de estudo tem se expandido e já existem estudos relacionando o polimorfismo M129V até mesmo com declínio cognitivo de pacientes com síndrome de Down (DEL BO et al. 2003). Por sua vez, BERR et al. (2003) estudaram cérebros provenientes de autópsias de rotina (casos de demência foram excluídos) e descreveram que entre a população normal os portadores de pelo menos um alelo 129V têm maior risco de apresentar lesões associadas a depósitos β -amilóides (marcador patológico de envelhecimento cerebral). Parece que a tendência atual é relacionar os polimorfismos de *Prnp* a outras neuropatologias e não apenas às doenças priônicas.

1.5 TRÁFEGO INTRACELULAR DE PrP^C

O tráfego intracelular de PrP^C ainda é pouco conhecido apesar das tentativas de correlacioná-lo com seus mecanismos de infecção (KANEKO et al. 1997).

Na tentativa de esclarecer estes pontos, nosso grupo construiu uma proteína quimérica de PrP^C fusionada à GFP. Foi estudada compartimentalização por microscopia de confocal e observada uma localização em membrana celular e numa região perinuclear (LEE et al. 2001), constituída de complexo de Golgi e vesículas de reciclagem (MAGALHÃES et al. 2002). Foi verificado ainda que mutantes de deleção da região amino-terminal da molécula de PrP^C apresentam alteração da compartimentalização (LEE et al. 2001).

De forma semelhante, IVANOVA et al. (2001) utilizaram proteínas de fusão com GFP e microscopia confocal para demonstrar que mutações patogênicas alteram a localização subcelular de PrP^C, isto é, os mutantes são parcialmente retidos no Retículo Endoplasmático devido ao prejuízo no transporte para a superfície celular.

Desta forma, o uso da ferramenta GFP-PrP^C e de microscopia confocal pode ser muito importante para o esclarecimento de alguns aspectos das funções biológicas da molécula de PrP^C. É importante esclarecer de que forma alterações na molécula de PrP^C poderiam ocasionar uma modificação no seu tráfego intracelular e portanto alterar sua atividade biológica. Ainda nessa linha, este tipo de dado poderá definir a patogenia da doença ou, futuramente, contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos.

1.6 GLICOSILAÇÃO DE PrP^C

A glicosilação é uma característica importante da maioria das proteínas de superfície celular, incluindo PrP^C, que tem dois sítios de *N*-glicosilação variavelmente ocupados. Os fatores que regulam a ligação de *N*-glicanos aos sítios potenciais incluem a estrutura das cadeias laterais de aminoácidos próximas à seqüência de glicosilação (Asn Xaa Ser/ Thr), e o processamento adicional dos açúcares é controlado, entre outras coisas, pela estrutura tri-dimensional local dos sítios de glicosilação (RUDD et al. 2002).

Ambos os sítios de *N*-glicosilação de PrP^C (Asn181 e Asn197, em humanos) são variavelmente ocupados por uma série de diferentes oligossacarídeos, levando a um complexo padrão de glicosilação que compreende as formas não, mono

e di-glicosiladas (PAN et al. 2002; MONNET et al. 2003). Acredita-se que os glicanos estabilizam a parte estruturada da proteína (resíduos 127-227), o que é consistente com simulações moleculares que comprovam o efeito da glicosilação na conformação de PrP^C em função de mutações de aminoácidos (WONG et al. 2000).

Atualmente pouco se sabe a respeito à função dos oligossacarídeos ligados às glicoproteínas neuronais, contudo parece bastante provável que a alteração da glicosilação de PrP^C tenha conseqüências funcionais. Nessa linha, RUSSELAKIS-CARNEIRO et al. (2002) propuseram que um acúmulo de PrP concomitante a alterações graduais de seu padrão de glicosilação colaboram com a patogênese de um modelo murino de *scrapie*.

O padrão de bandas em SDS-PAGE é um meio de visualizar as quantidades relativas de PrP^C di, mono e não-glicosilado. Desta forma MONNET et al. (2003), comparando algumas linhagens neuronais com relação ao padrão de glicosilação das mesmas, descobriram que células B104 (linhagem de neuroblastoma de rato), quando proliferando em baixa confluência, expressavam principalmente as formas monoglicosiladas de PrP^C, enquanto que em alta densidade, com a formação de contatos célula-célula, as células B104 expressavam preferencialmente as formas diglicosiladas dessa proteína. Os autores ainda propuseram que, em células B104 em diferentes densidades celulares, o estado de glicosilação de PrP^C poderia influenciar a função fisiológica desta proteína por modular a interação da mesma com seus ligantes, entre eles a laminina. Sendo um dos nossos objetivos a avaliação da interação de laminina com PrP^C (nas diferentes combinações dos códons polimórficos 129 e 171), achamos importante verificar o padrão de glicosilação dessas moléculas de PrP^C.

É interessante notar que PETERSEN et al. (1996), avaliando o efeito da mutação D178N com M ou V no códon 129 na síntese e metabolismo de PrP^C, concluíram que há uma diminuição das glicofomas de PrP^C na superfície de células transfectadas com PrP^C 178N em comparação ao controle (178D), principalmente da forma não-glicosilada. Além disso, a diminuição desta glicofoma é significativamente maior nas células expressando 129M/178N em relação àquelas expressando 129V/178N. Frente à observação de que a forma não-glicosilada do alelo mutante com 129V é mais estável e portanto consegue atingir a superfície celular mais facilmente, os autores sugerem que a presença de M ou V no códon 129 associada à mutação D178N resulta em diferenças nas razões das glicofomas e na conformação protéica o que poderia explicar os diferentes fenótipos causados pela mesma mutação: 129M/178N causa FFI enquanto 129V/178N causa CJD.

Todos os aspectos relacionados aqui apontam para várias funções celulares da molécula de PrP^C e para variações nesta proteína que poderiam estar envolvidas com perda de função levando a alterações fisiológicas que podem relacionar-se a algum tipo de patologia.

Desta forma, este trabalho teve como objetivos clonar os alelos variantes de PrP^C com N ou S no códon 171, sendo o último altamente frequente em pacientes com epilepsia do lobo mesial temporal e relacionado com uma pior resposta cirúrgica.

Além disso clonamos estes variantes em combinação com aqueles da posição 129. As formas recombinantes destas proteínas humanas foram usadas para avaliar sua capacidade de ligação a laminina, seu padrão de glicosilação e sua compartimentalização intracelular.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 CLONAGEM DA FASE ABERTA DE LEITURA DE *Prnp* HUMANO EM PLASMÍDEO PARA CÉLULA EUCARIÓTICA

2.1.1 Amplificação da sequência nucleotídica

Utilizando amostras de DNA de pacientes epiléticos previamente obtidas por uma aluna do grupo a partir de leucócitos de sangue periférico, realizamos Reações em Cadeia da Polimerase (PCR), com o objetivo de amplificar parte da fase aberta de leitura do gene codificador da proteína prion celular humana (*Prnp*).

Inicialmente desenhamos *primers*, como são conhecidos os iniciadores necessários para a PCR, que hibridam dos nucleotídeos 110 a 121 (primer FHPrPc, NCBI GI:11079226) e 794 a 805 (primer RHPrPc) e que contêm sítios de enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*. Esses *primers*, bem como todos os outros por nós utilizados, foram analisados pelo software primer premier (Biosoft International) para assegurar que não havia formação de *loop*, homodímeros ou heterodímeros.

Primers desenhados:

- *forward* (FHPrPc): 5'CAT GAA TTC T AAG AAG CGC CCG3'.
EXTRA *EcoRI* aa 23

- *reverse* (RHPrPc): 5'ACT GGA TCC TCA CCC TAC TAT3'.
EXTRA *BamHI* aa 253

Desenhamos ainda um segundo par de *primers* (denominados *forward/reverse* humano II) contendo 9 nucleotídeos a mais para aumentar a especificidade da reação, tendo em vista que o primeiro par de *primers* amplificava sequências inespecíficas. Esses *primers* hibridam dos nucleotídeos 110 a 130 (FIIHPrPc) e 785 a 805 (RIIPrPc) e também contêm sítios de enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*, para que a sequência amplificada correspondente aos códons 23 a 254 de *Prnp* tivesse extremidades coesivas com as do vetor.

- *forward* (FIIHPrPc):5'CAT GAA TTC T AAG AAG CGC CCG AAG CCT GGA3'.
EXTRA EcoRI aa 23

- *reverse* (RIIPrPc):5'ACT GGA TCC TCA ACC TAC TAT CAG AAA GAT3'.
EXTRA BamHI aa 253

As condições da reação de PCR foram: hibridação de 60° C, Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (seguindo portanto as concentrações de *primers*, MgSO₄, dNTP e tampão e também ciclagem sugeridas pelo fabricante, Invitrogen) e 200ng de DNA.

2.1.2 Purificação do produto de PCR pelo método fenol/clorofórmio

O produto de PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%, do qual cortamos a banda de interesse em função de seu tamanho. A banda cortada foi centrifugada sobre lâ de vidro, e a sequência nucleotídica foi purificada pelo método de fenol/clorofórmio, já bem estabelecido. Resumidamente, adicionamos ao produto da PCR (de volume "V") 1/2V de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 e 1/2V de fenol tamponado. Recuperamos a fase aquosa, agora livre de proteínas, e adicionamos clorofórmio novamente, deixando a fase aquosa bem límpida. Então adicionamos

acetato de sódio 1,5 M (1/10V) ao DNA e o precipitamos com etanol absoluto gelado (3V). Depois de seco, o DNA foi ressuspensão em água.

2.1.3 Digestão do produto de PCR

O DNA ressuspensão em água foi digerido com as enzimas de restrição *Eco*R1 e *Bam* H1 (1 U/ μ g de DNA, e tampão apropriado) a 37° C por 16 h. Os fragmentos digeridos foram novamente purificados pelo método de fenol/clorofórmio (item 1.2) para serem clonados no plasmídeo pEGFP-C1 (Clontech; Figura 3 Resultados e Discussão).

2.1.4 Clonagem em plasmídeo para célula eucariótica

As sequências nucleotídicas codificadoras dos códons 23-254 de PrP^C humano flanqueadas pelos sítios de restrição enzimática foram clonadas no Sítio Múltiplo de Clonagem (MCS) do vetor pEGFP-C1, entre os sítios das endonucleases *Eco*RI e *Bam*HI. Para isso utilizamos protocolo que já vem sendo utilizado pelo grupo: 100 ng de vetor (previamente digerido com *Eco*RI e *Bam*HI para criar extremidades coesivas com as do inserto) e 100ng de inserto (razão inserto:vetor aproximadamente 5:1) foram incubados por 16h a 4°C na presença de enzima ligase T₄ (8U/100 ng de vetor, Biolabs) e seu respectivo tampão. Ainda fizemos outra reação de ligação sem inserto (controle negativo), com o objetivo de verificar se estava ocorrendo religação do plasmídeo.

O produto de ligação PrP^C-pEGFP-C1 foi usado para transformar bactérias *E. coli* da cepa DH5 α .

2.1.5 Transformação de bactérias quimiocompetentes

Bactérias competentes da cepa DH5 α de *E coli* obtidas pelo método de cloreto de cálcio (SAMBROOK et al. 1989a) foram pré-incubadas com parte do produto de ligação do item 1.4, por meia hora, em gelo. Então demos o choque térmico: após 2min. a 42°C a bactéria é rapidamente levada a 0°C, quando ocorre a captura do plasmídeo. A bactéria então recebe meio LB (Luria-Bertani broth: 1% de triptona; 0,5% de extrato de levedura; 1% de NaCl; pH 7,5) e é incubada a 37 °C por uma hora para recuperar a parede celular. Em seguida é sedimentada através de centrifugação, ressuspensa em 200 μ l de meio LB e semeada em placas de LB-ágar (1,5% de ágar), contendo kanamicina (50 μ g/ml), que seleciona as bactérias resistentes (isto é, que receberam o plasmídeo)

2.1.6 Purificação de plasmídeo e seqüenciamento dos clones obtidos

Selecionamos alguns clones bacterianos (em geral 10 clones foram selecionados por transformação) para serem expandidos em meio LB a 37°C/16h sob agitação. Os plasmídios foram então purificados através do kit “Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System” (Promega), e seqüenciados.

Para as reações de seqüência foram utilizados *primers* FIHPrPc e RIHPrPc (que foram desenhados para clonagem em vetor pRSET, conforme veremos mais adiante) e kit Dynamic™ ET terminator cycle sequencing (Amersham Pharmacia), segundo instruções do fabricante, e o processamento das mesmas foi realizado no sequenciador automático ABI Prism 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer).

Baseando-nos no seqüenciamento escolhemos clones que continham os polimorfismos de interesse e estes foram novamente expandidos em meio LB para

purificação plasmidial em larga escala, através do “Plasmid maxi kit” (Qiagen). Os plasmídeos assim purificados foram utilizados para transfecção de células eucariotas.

2.2. CLONAGEM DA FASE ABERTA DE LEITURA DE *Prnp* HUMANO EM PLASMÍDEO PCR 2.1

2.2.1 Amplificação da sequência nucleotídica

Numa segunda abordagem realizamos PCRs utilizando um par de *primers* que já vinha sendo utilizado por outra aluna do grupo. Esses *primers* hibridam do nucleotídeo 62 ao 79 (F1, *forward*) e 842 ao 859 (R2, *reverse*) do cDNA de PrP^C (Pub Med, GI: 11079225). Os reagentes do kit Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase High Fidelity foram utilizados nas concentrações sugeridas pelo fabricante bem como a ciclagem, sendo 63°C a temperatura de hibridação dos *primers*.

Os fragmentos obtidos foram purificados pelo método fenol/clorofórmio conforme descrito no item 1.2 e clonados no plasmídeo pCR 2.1 do TA Cloning[®] kit (Invitrogen) seguindo protocolo do fabricante. O produto de ligação PrP^C-pCR foi utilizado para transformar bactéria *E coli* competente da cepa de DH5 α

2.2.2 Transformação de bactérias quimiocompetentes

Bactérias competentes foram transformadas conforme item 2.1.5 e então semeadas em placas de LB-ágar (1,5% de ágar), contendo ampicilina para selecionar células que receberam plasmídeo; e IPTG e X-Gal, que possibilitam *screening blue/white*: bactérias que receberam o plasmídeo com inserto formam colônias

brancas e aquelas que receberam plasmídeo sem inserto processam a galactose e ficam azuis.

Após 24 horas alguns clones brancos e isolados foram selecionados da placa (em geral selecionamos 10 clones por transformação) para que suas sequências de *Prnp* fossem amplificadas por PCR e triadas em função da presença/ausência dos polimorfismos de interesse.

2.2.3 Digestão por enzima de restrição e eletroforese em géis de poliacrilamida

Para a digestão por enzimas de restrição foram feitas amplificações (PCR) de parte da fase aberta de leitura do gene de PrP^C, tanto de DNA genômico como do inserto de *Prnp* clonado em pCR 2.1, em um volume de 20µl por reação, com diferentes *primers*. O produto de PCR obtido foi purificado através de precipitação com 400µl de 2-propanol seguida de lavagem com 400µl de 70% etanol e ressuspensão do DNA e água (concentração aproximada de 20ng/µl). A endonuclease *BbvI* (New England Biolabs) foi usada para análise do códon 171 (FINK et al. 1994). A enzima *BbvI* foi incubada com substrato (1 U de enzima/ µg de DNA) e tampão indicado pelo fabricante a 37°C por 16 horas e inativada (20 minutos a 65°C) para término da reação.

O produto das digestões foi separado por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% (solução de acrilamida: bisacrilamida 29:1, persulfato de amônio e TEMED) a 100V por aproximadamente 60 min. O gel foi então incubado em solução fixadora (ácido acético glacial 0,5%, etanol absoluto 10%) sob agitação. Após 10min adicionou-se nitrato de prata a essa solução e incubou-se por mais 5 min. Então o gel foi lavado rapidamente com água e revelado com solução reveladora (hidróxido de

sódio 30% e formaldeído 0,5%) sob agitação por 10-15 min. Após nova incubação com solução fixadora o gel foi seco entre folhas de papel celofane.

2.3 TRANSFECCÃO DE CÉLULA EUCARIOTA

As células da linhagem HEK 293 (human embryonal kidney) -ATCC Number: CRL 1573- foram transfectadas utilizando protocolo de transfecção por fosfato de cálcio (SAMBROOK et al. 1989b).

Células HEK 293 foram mantidas em meio MEM com 10% de soro fetal bovino (SFB). 10^5 células foram passadas para placas de cultura de 100mm de diâmetro e transfectadas após 24 horas.

O precipitado que propicia a transfecção foi obtido colocando-se num tubo cônico de 15ml 750 μ L de H₂O, 12 μ g do DNA de interesse, 250 μ L de CaCl₂ 1M e 1mL de solução BBS (50mM de BES (N,N-bis[2-hidroxietil]-ác.2-aminoetanosulfônico), 280mM NaCl e 1,5mM Na₂HPO₄.2H₂O, pH6,95) delicadamente. Após formação do precipitado adicionou-se MEM 10% SFB ao tubo, e transferiu-se essa solução para a placa já sem meio de cultura.

As células foram incubadas com o precipitado por 5 horas a 37°C e 3% de CO₂. O meio contendo o precipitado foi então aspirado, as células foram lavadas com PBS (137mM NaCl, 2.6mM KCL, 10mM Na₂HPO₄ e 1.8mM KH₂PO₄) e receberam mais meio ficando a 37°C e 5% de CO₂ por 48 horas, após as quais observou-se a distribuição de ²PrP^{C 129V/171N}-GFP e PrP^{C 129V/171S}-GFP por microscopia de confocal

² Alelo selvagem: PrP^{C 129M/171N}

e também de fluorescência, utilizando-se microscópio Olympus IX70 sob filtro UV (SWB).

2.4 SUBCLONAGEM DA FASE ABERTA DE LEITURA DE *Prnp* HUMANO EM PLASMÍDEO PARA EXPRESSÃO EM CÉLULA PROCARIÓTICA

2.4.1 Amplificação da sequência nucleotídica e clonagem

Amplificamos a sequência nucleotídica que corresponde aos aminoácidos 23 a 230 de PrP^C por PCR, com kit Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (conforme visto no item 1.1), e como DNA molde utilizamos plasmídeos pEGFP-C1 (0,5µL de produto de Wizard[®] *Plus* Minipreps) nos quais estão clonados sequências nucleotídicas correspondentes a PrP^{C129M/171N} e PrP^{C129V/171S}, obtidos conforme descrito no item 1. A PCR foi realizada com temperatura de hibridação de 50°C.

- *forward* (FIHPrPc): 5'CAT GGA TCC AAG AAG CGC CCG3'
EXTRA BamHI aa 23

- *reverse* (RIHPrPc): 5'ACT GAA TTC CGA TCC TCT CTG3'
EXTRA EcoRI aa 230

Os *primers* utilizados hibridam dos nucleotídeos 110 a 121 (FIHPrPc) e 722 a 733 (RIHPrPc) do cDNA (NCBI GI 11079225) de *Prnp*. A sequência correspondente aos códonos 231 a 254 é removida para adição da ancora de GPI e não precisa ser clonada no vetor de expressão para célula procariótica.

Esses *primers* contêm ainda sítios de enzimas de restrição *Bam*HI (primer *forward*) e *Eco*RI (primer *reverse*), assim, como produto de PCR, obtemos a

sequência nucleotídica correspondente aos códons 23 a 230 de PrP^C flanqueados pelos sítios de enzimas de restrição *Bam*HI (extremidade 5') e *Eco*RI (extremidade 3'), ficando as extremidades do inserto coesivas com as do vetor pRSET-A (Invitrogen).

Conforme itens 2.1.2 a 2.1.4, o fragmento de DNA contendo os nucleotídeos que codificam para os aminoácidos 23-230 da proteína PrP^C humana foi clonado entre os sítios de restrição *Bam* HI e *Eco* RI do plasmídeo pRSET-A (Invitrogen) que foi gentilmente cedido por Dr. Zahn (ZAHN et al. 1997), e previamente digerido com enzimas *Bam* HI e *Eco* RI para criar extremidades coesivas com as do inserto. A ligação ocorre a 4°C por 16h na presença da enzima ligase T₄ e respectivo tampão.

2.4.2 Transformação de bactérias quimiocompetentes e purificação de plasmídeo

Transformamos cepa de *E coli* DH5 α (conforme item 2.1.5) com os produtos de ligação PrP^C-pRSET, selecionamos clones resistentes (dois ou três) em placas de meio LB contendo ampicilina (100 μ g/mL), e estes foram expandidos em meio LB para obtenção de plasmídeo utilizando kit “Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification System” (Promega). Após sequenciamento (item 2.1.6) dos clones selecionados, escolhemos um deles para transformar cepa BL-21 de *E coli*, que apresenta boa expressão de PrP^C. Então seguimos protocolo de purificação de proteína prion celular.

2.5 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE His₆-PrP^C EM BACTÉRIA

(Conforme Zahn et al. 1997)

Cultura de *E coli* cepa BL-21 (DE3-Stratagene) transformada recentemente com plasmídeo para expressão da proteína PrP^C (His₆-PrP^C) foi crescida em 1litro de meio LB (Luria-Bertani) contendo 100µg/ml de ampicilina, a 37°C. Quando atingida a Abs₆₀₀=0.7, a expressão da proteína recombinante foi induzida com 1,5mM de IPTG (β-D tiogalactopiranosídeo de isopropila), por 13 horas a 30°C. As bactérias foram então sedimentadas por centrifugação, a 4000xg por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi ressuspenso em tampão G (6M cloreto de guanidina, 10mM de Tris, 100mM Na₂HPO₄, 10mM de glutatona reduzida, pH 8,0) e lisado sobre alta pressão (16.000 psi), com auxílio da prensa French Press (ThermoSpectronic).

O lisado foi centrifugado e o sobrenadante incubado por 16h a 4°C com 10ml de resina de agarose ácido níquel-nitrilotriacético (NTA-Qiagen), previamente equilibrada com tampão G. Após algumas lavagens da resina com 250ml de tampão G montou-se uma coluna com a mesma, à qual aplicou-se um gradiente (com auxílio de uma bomba peristáltica) de 80ml de tampão B (10mM Tris, 100mM Na₂HPO₄, pH 8,0) ao tampão G. Proteínas ligadas à resina inespecificamente foram removidas através de lavagem com 200ml de tampão B contendo 50mM de imidazol. A eluição da proteína recombinante His₆-PrP^C foi realizada com a passagem de 50ml de tampão E (10mM Tris, 100mM Na₂HPO₄, 500mM de imidazol, pH 5.8). Várias frações (de 1ml) foram coletadas e aquelas contendo His₆-PrP^C (frações foram dosadas através do método de Bradford, utilizando leitor de microplaca Benchmark BioRad) foram combinadas e então dialisadas contra água por 16h a 4°C. Após diálise a proteína foi

dosada, sendo que o rendimento médio foi de 5mg por litro de cultura de bactéria, aliquotada e acondicionada a -20°C.

2.6 WESTERN BLOT E IMMUNOBLOT

Dez µg das proteínas recombinantes (His₆-PrP^C 129M/171N e His₆-PrP^C 129V/171S) foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 10% com SDS (dodecilsulfato de sódio), transferidas e imobilizadas em membranas de nitrocelulose (0,45 µm, Schleicher & Schuell, Alemanha) durante 1 hora sob corrente constante no sistema Nova blot (Pharmacia) em tampão de transferência (39mM de glicina, 48mM de Tris, 0,037% de SDS e 20% de metanol). Para verificar a eficiência da transferência corou-se a membrana com corante Ponceau (Sigma).

A membrana foi então bloqueada (durante 2 horas) com TBST (120mM de NaCl, 20mM de Tris e 0,05% de Tween 20) contendo 5% de leite desnatado liofilizado (Molico, Nestlé) e incubada com anticorpo anti His-PrP^C de camundongo policlonal (1:1000) produzido em camundongo nocaute para *Prnp* (GRANER et al. 2000a). Como controle negativo foi utilizado soro pré-imune de camundongo na mesma diluição.

Depois de lavada abundantemente com TBST, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase, diluído 1:5000 em TBST, por 1 hora. Após lavagem com TBST a membrana foi tratada com solução reveladora do kit ECL Western blotting analysis system (Amersham) e filmes radiográficos (Kodak) foram expostos às membranas.

2.7 ENSAIOS DE LIGAÇÃO

2.7.1 Marcação de γ 1-BSA com ^{125}I

Peptídeo γ 1-BSA (peptídeo RNIAEIIKDI da cadeia γ 1 de laminina conjugado a BSA, sintetizado pela Neosystem) foi marcado com 500 μCi de Na^{125}I (Amersham Pharmacia) utilizando-se "Iodo beads" (Pierce), durante 15 minutos, a temperatura ambiente e sob agitação. A reação foi interrompida removendo-se os "beads" da solução. O peptídeo marcado foi separado do Na^{125}I usando uma coluna de gel filtração (Sephadex G-25-Amersham Pharmacia). As frações contendo ^{125}I - γ 1-BSA foram então combinadas, uma alíquota de 2 μl foi contada (contador gama 1275 Minigamma LKB Wallac) e os cálculos de concentração e atividade específica foram feitos.

2.7.2 Curva de ligação entre peptídeo γ 1-BSA marcado e His₆-PrP^c

His₆-PrP^c $^{129}\text{M}/^{171}\text{N}$ e His₆-PrP^c $^{129}\text{V}/^{171}\text{S}$ foram adsorvidas em micropoços de poliestireno (quatro microgramas por poço) por 16 horas à temperatura ambiente. Os poços foram lavados com TBS e bloqueados com solução 1% de albumina sérica bovina (BSA) por 2 horas à temperatura ambiente, para evitar ligações inespecíficas. Após serem novamente lavados com TBS os poços foram incubados com ^{125}I - γ 1-BSA (concentrações crescentes) em TBS (20mM Tris-Cl, pH 7.5; 150mM NaCl) a 4°C por 16 horas

Após abundante lavagem a radiação dos poços foi medida utilizando-se contador gama (1275 Minigamma LKB Wallac). A partir do cálculo da atividade

específica de ^{125}I - γ 1-BSA pudemos obter a massa de peptídeo marcado que se ligou a $\text{PrP}^{\text{C} 129\text{M}/171\text{N}}$ e $\text{PrP}^{\text{C} 129\text{V}/171\text{S}}$.

Ainda construímos uma curva de ligação inespecífica, adicionando-se aos poços adsorvidos com $\text{His}_6\text{-PrP}^{\text{C} 129\text{M}/171\text{N}}$ ou $\text{His}_6\text{-PrP}^{\text{C} 129\text{V}/171\text{S}}$, além do peptídeo marcado, uma quantidade 5 vezes maior de peptídeo não marcado em relação ao marcado. Subtraindo-se os valores inespecíficos dos valores totais correspondentes obteve-se uma curva denominada específica. Como controle utilizamos $\text{His-PrP}^{\text{C}}$ de camundongo, tratado conforme as proteínas recombinantes humanas.

A curva específica é então linearizada pelo método de SCATCHARD (1949), o que permite a determinação do Kd (constante de dissociação no equilíbrio) da interação γ 1-BSA/ $\text{His-PrP}^{\text{C}}$.

2.8 DETERMINAÇÃO DO PADRÃO DE GLICOSILAÇÃO

Culturas celulares de HEK293 transfectadas com $\text{pEGFP-PrP}^{\text{C} 129\text{V}/171\text{N}}$ e $\text{pEGFP-PrP}^{\text{C} 129\text{V}/171\text{S}}$ conforme item 2.3, foram visualizadas em microscópio Olympus IX70, filtro SWB, para verificar eficiência de transfecção, que se mostrou alta. As células tranfectadas foram lavadas 2x com tampão de lavagem gelado (20mM tris HCL pH 7,5; NaCl 8,8 mg/mL) e delas obtivemos extratos celulares utilizando tampão de lise gelado (10mM tris HCL pH 7,5; EDTA 2mM, SDS 1% e inibidores de protease na concentração indicada pelo fabricante) e ciclos de congelamento (em gelo seco) e descongelamento (em gelo). Os sobrenadantes de cada transfecção obtidos após centrifugação (20000xg, por 20 min a 4°C) foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (foram aplicadas quantidades

correspondentes a 50 μ g de proteína de cada extrato) e *Immunoblot* conforme item 2.6.

3 RESULTADOS

Nosso trabalho teve início em função de dados obtidos pelo grupo que sugeriam uma alta prevalência de variantes alélicas provenientes de alterações em três códons (110, 117 e 171) em pacientes com esclerose hipocampal, em comparação aos controles. Com o intuito de verificar se essas alterações implicariam em prejuízo da função fisiológica de PrP^C, principalmente interação da proteína com seus ligantes, e também na distribuição celular de PrP^C, decidimos produzir proteínas recombinantes com essas alterações. Para isso amplificamos e clonamos a fase aberta de leitura de *Prnp* humano, apresentando essas variações na sequência de aminoácidos, em vetores apropriados.

3.1 AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA CODIFICADORA DE PrP^C HUMANO ATRAVÉS DE REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE

Para amplificar a sequência nucleotídica que codifica a proteína PrP^C humana desenhamos *primers*, como são conhecidos os iniciadores necessários para as Reações em Cadeia da Polimerase, que flanqueiam a fase aberta de leitura de *Prnp*. Com base no cDNA (NCBI GI 11079225) deste gene foram sintetizados *primers* que hibridam dos nucleotídeos 110 a 121 (primer FHPrPc) e 794 a 805 (primer RHPrPc), conforme Figura 1 (caixas azuis).

```

cgcgagcttc tcctctcctc acgaccgagg cagagcagtc attatggoga accttggetg
ctggatgctg gttctctttg tggccacatg gagtgacctg ggcctctgca agaagcgccc
gaagcctgga ggatggaaca ctgggggag ccgatacccg gggcagggca gccctggagg
caaccgctac ccacctcagg gcggtggtgg ctgggggag cctcatggtg gtggctgggg
gcagcctcat ggtggtggct gggggcagcc ccatggtggt ggctggggac agcctcatgg
tggtggtggt ggtcaaggag gtggcaccca cagtcagtgg aacaagccga gtaagccaaa
aaccaacatg aagcacatgg ctggtgctgc agcagctggg gcagtgggtg ggggccttgg
cggctacatg ctgggaagtg ccatgagcag gccatcata catttcggca gtgactatga
ggaccgttac tatcgtgaaa acatgcaccg ttacccaac caagtgtact acaggcccat
ggatgagtac agcaaccaga acaactttgt gcacgactgc gtoaatatca caatcaagca
gcacacggtc accacaacca ccaaggggga gaacttcacc gagaccgagc ttaagatgat
ggagcgcgtg gttgagcaga tgtgtatcac ccagtacgag agggaatctc aggcotatta
ccagagagga togagcatgg tctcttctc ctotccacct gtgatcctcc tgatctcttt
cctcatcttc ctgatagtgg gatgaggaag gtcttctgt tttcaccatc tttctaactc
ttttccagct tgagggaggc ggtatccacc tgcagccctt ttagtggtgg tgtctcactc

```

Figura 1 - Nucleotídeos 1 a 900 do cDNA dePrP^C humano (NCBI GI 11079225) mostrando a fase aberta de leitura, em negrito, e locais de hibridação dos *primers* FHPrPc e RHPrPc (caixas azuis), FIIHPrPc e RIIHPrPc (caixas rosas), FIHPrPc e RIHPrPc (caixas verdes) e F1 e R2 (caixas vermelhas).

Esses *primers* contém ainda sítios de enzimas de restrição *EcoRI* (“primer Forward”) e *BamHI* (“primer Reverse”), necessários para clonagem da sequência amplificada no vetor para célula eucariótica. Utilizando esses *primers* obteríamos como produto de PCR a sequência nucleotídica correspondente aos códons 23 a 254 de PrP^C, flanqueados pelos sítios de enzimas de restrição *EcoRI* (extremidade 5’) e *BamHI* (extremidade 3’).

Optamos por realizar a PCR utilizando Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) que é composta por *Taq* DNA Polymerase recombinante, polimerase termoestável de *Pyrococcus* e “Platinum[®] *Taq* antibody”. Essa mistura

assegura uma fidelidade maior da reação, pois a polimerase de *Pyrococcus* tem atividade de exonuclease (3'→5'), sendo capaz de corrigir um possível erro durante a adição de um nucleotídeo. Além disso, o “Platinum® *Taq* antibody” é um reagente (anticorpo) que liga-se à polimerase, bloqueando sua ação à temperatura ambiente. A atividade da enzima só é recuperada após o passo de denaturação do DNA na ciclagem de PCR (94°C). Essa característica faz com que a inespecificidade da reação seja reduzida.

Ainda assim, nas reações iniciais obtivemos além da banda específica de aproximadamente 700 pares de bases (pb) várias bandas inespecíficas conforme mostra canaleta 1 do gel de agarose representado na Figura 2. Ao aumentar a temperatura de hibridação com o intuito de diminuir a inespecificidade da reação, verificamos que não havia amplificação da banda de interesse (canaleta 6). Utilizando o mix de reagentes “PCR SuperMix High Fidelity” (Invitrogen) não obtivemos amplificação quer a 48° (canaleta 2) quer a 50° (canaleta 7). Fizemos ainda uma PCR utilizando como DNA molde um produto de PCR diluído (1:1000) que apresentava bandas inespecíficas, e o resultado também se mostrou insatisfatório (canaleta 3, hibridação a 48° e canaleta 8 a 50°).

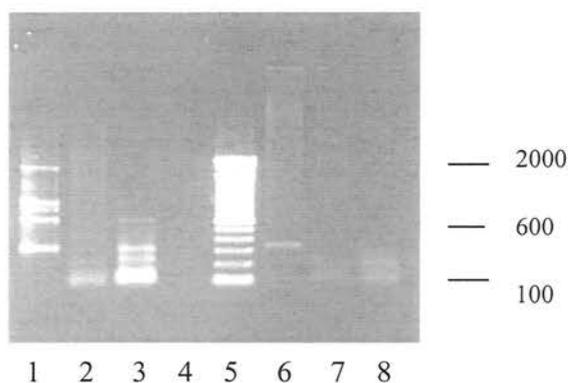


Figura 2 - Gel de agarose mostrando produtos de PCRs obtidos a temperatura de hibridação de 48 °C (1, 2, 3 e 4) e 50 °C (6, 7 e 8) com *taq platinum* (1, 4 e 6) ou com “SuperMix High Fidelity” (2,3, 7 e 8). Os produtos representados em 3 e 8 são referentes a PCR efetuada a partir de um produto de PCR diluído (1:1000) também efetuada com “SuperMix High Fidelity” como DNA molde. Controle negativo (ausência de DNA molde) e marcador 100pb estão respectivamente nas canaletas 4 e 5.

Resolvemos então desenhar um novo par de *primers* (denominados FIIHPrPc e RIIHPrPc e indicado por caixas rosas na Figura 1; cada um contendo 9 nucleotídeos a mais que os iniciadores desenhados anteriormente, para aumentar a especificidade da reação).

Então foram realizadas diferentes PCRs variando-se temperatura de hibridação dos *primers*, enzima/kit (PCR SuperMix High Fidelity, Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase High Fidelity) e massa de DNA molde. As condições que proporcionaram uma reação bastante específica foram hibridação de 60° C, enzima Platinum[®] *Taq*, e 200 ng de DNA.

O produto da PCR foi separado eletroforéticamente em gel de agarose 1%, para que pudessemos cortar do gel (Figura 3) apenas a banda específica de aproximadamente 700 pb.

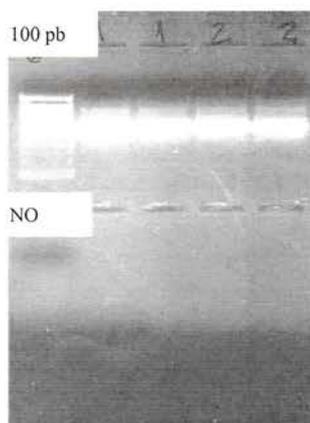


Figura 3 - Gel de agarose 1% mostrando produto de PCR obtido a partir de DNA genômico (heterozigoto para os polimorfismos nos códons 129 e 171) e *primers* FIIHPrPc e RIIHPrPc (canaletas superiores) e controle negativo da reação, ausência de DNA molde (canaleta inferior à esquerda). Canaleta superior à esquerda mostra marcador 100 pb.

3.2 CLONAGEM DA SEQUÊNCIA AMPLIFICADA DE PrP^C EM VETOR PARA EXPRESSÃO EM CÉLULA EUCARIÓTICA (pEGFP-C1)

Das bandas específicas cortadas do gel representado na Figura 3, obtivemos o fragmento de DNA desejado (inserto) através de purificação pelo método de fenol/clorofórmio. Este inserto foi então digerido com as enzimas de restrição *Eco*R1 e *Bam* H1, para tornar suas extremidades coesivas com as do plasmídeo pEGFP-C1. Após digestão os insertos foram novamente purificados pelo método de fenol/clorofórmio e então clonados no plasmídeo pEGFP-C1 (Clontech, Figura 4), digerido com as mesmas enzimas.

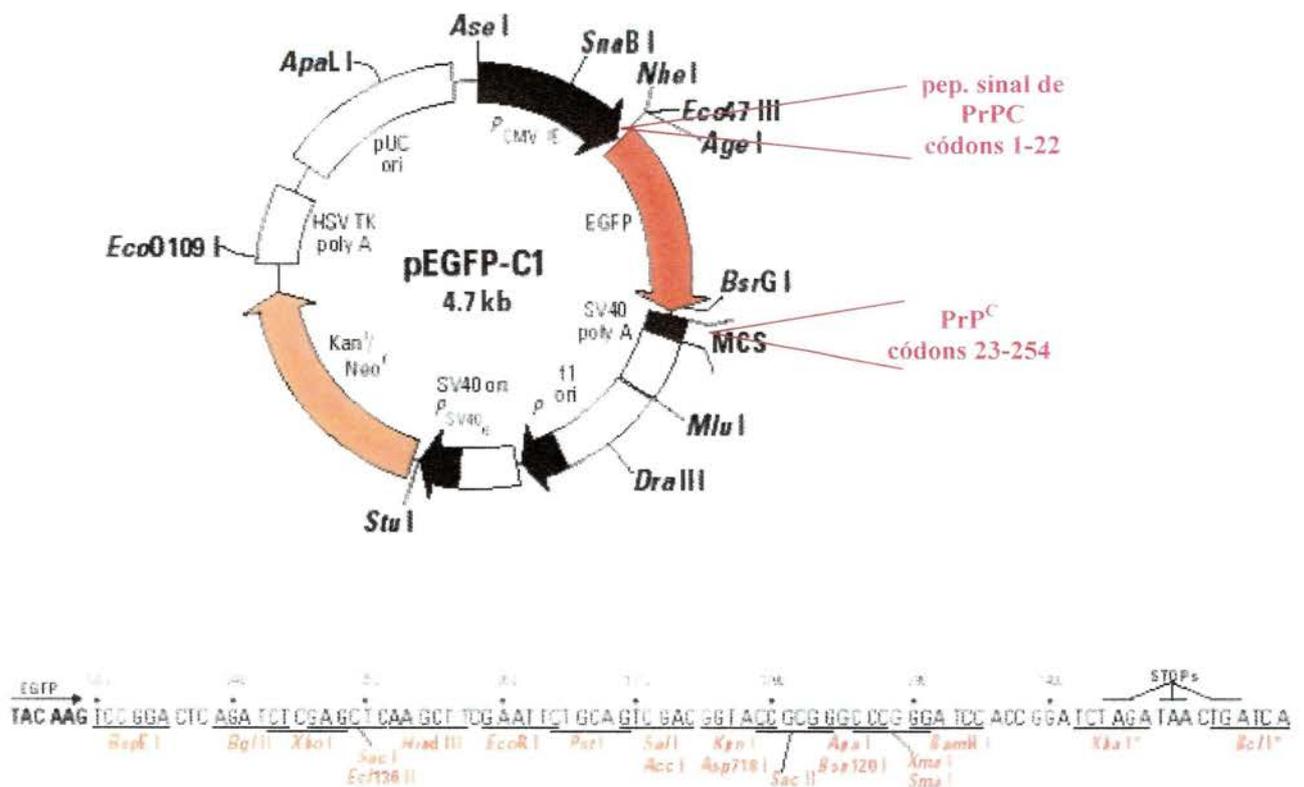


Figura 4 - Mapa do plasmídeo pEGFP-C1 (Clontech) utilizado na clonagem de PrP^C entre sítios de restrição *Eco RI* e *Bam HI* presentes no sítio múltiplo de clonagem (MCS).

Nosso objetivo inicial era clonar o alelo selvagem do gene da proteína prion celular humana e os alelos com as alterações nos códons 110, 117 e 171 encontradas a princípio nos pacientes com Esclerose Hipocampal. Para isso, escolhemos inicialmente duas amostras de DNA de pacientes que supostamente continham as alterações dos códons 110 e 117, e após amplificar, purificar, digerir e clonar o inserto em pEGFP-C1, partimos para o sequenciamento dos clones obtidos.

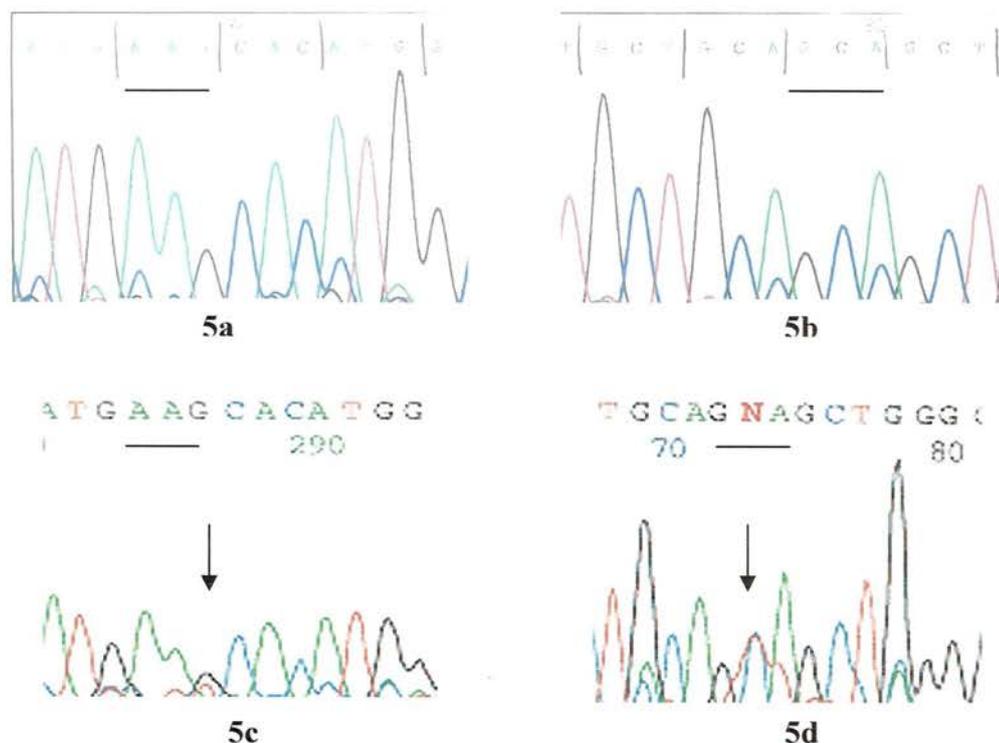


Figura 5 - Sequenciamento de fragmento de fase aberta de leitura de PrP^C clonada em pEGFP-C1 mostrando genótipos selvagens dos códons 110 (a) e 117 (b), sublinhados, e sequenciamento de fragmento da fase aberta de leitura de PrP^C obtida a partir de amplificação direta do DNA mostrando dois picos (indicados por flechas) nos códons 110 (c) e 117 (d) sugerindo a presença de polimorfismos em heterozigose nessas posições, sublinhadas.

Verificamos diferenças entre o sequenciamento resultante de nossa clonagem (Figuras 5a e b) e o sequenciamento direto do DNA do paciente, realizado por outro membro do grupo (Figura 5c e d), com relação aos códons 110 e 117.

Realizamos outras clonagens desses e de outros DNAs sem contudo encontrar as alterações de interesse. Buscamos então na literatura mais artigos que trouxessem informações sobre sequenciamento de *Prnp*. Em um de seus artigos WINDL et al. (1999) utilizaram três metodologias para detectar alterações na sequência de *Prnp*: digestão com endonucleases de restrição, sequenciamento direto do produto de PCR e sequenciamento após clonagem de parte do produto de PCR. A combinação das metodologias assegura a identificação de uma alteração que poderia ter sido mal

interpretada, por exemplo em função da dificuldade em sequenciar regiões ricas em citosinas e guaninas (CG). De fato a incorporação de cromóforos nessas regiões é um pouco dificultada, o que pode acarretar em erros de interpretação do sequenciamento (FINN et al. 2002). Levando-se em conta que os códons 110 e 117 encontram-se numa região rica em C e G, passamos a questionar a presença dessas variantes alélicas em nossos pacientes e decidimos selecionar outro método de identificação de SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) em *Prnp*. Optamos por utilizar o método de digestão com endonucleases que baseia-se na criação ou extinção de um sítio enzimático em função da troca de nucleotídeo de interesse e também DHPLC (denaturing high-performance liquid chromatography), tarefas realizadas por outro membro do grupo.

O ressequenciamento do DNA de todos os pacientes epilépticos bem como a metodologia de DHPLC e o uso de endonucleases mostraram que alguns de nossos pacientes apresentavam um polimorfismo silencioso do códon 117 (GCA→GCG) mas nenhum deles apresentava a variante alélica A117V (GCA→GTA) que era inicialmente nosso objeto de estudo. Já no códon 110 não havia alteração alguma. Por outro lado a alteração N171S confirmou-se presente em 23% de nossos pacientes (em heterozigose) e em nenhum dos controles (WALZ et al. 2003) (Anexo 1). Tendo em vista que o alelo 171N→S não é responsável por um fenótipo e também é encontrado em indivíduos normais, optamos por nos referir a essa alteração como polimorfismo. Além disso, FINK et al. (1994) já haviam considerado essa alteração como um polimorfismo raro. Recentemente esse polimorfismo também foi encontrado em maior frequência em tribos africanas e seus descendentes (MEAD et al. 2003).

Um outro polimorfismo (M129V) foi encontrado na mesma frequência nos casos e controles. Essa posição encontra-se dentro de uma região de grande importância estrutural da molécula de PrP^C (RIEK et al. 1998) e poderia ter um papel importante na sua função fisiológica. O polimorfismo no códon 171 pode estar ou não associado àquele no códon 129 portanto nosso objetivo passou a ser a obtenção da proteína prion celular selvagem (PrP^{C 129M/171N}), proteína com o polimorfismo no aminoácido 129 (PrP^{C 129V/171N}), com o polimorfismo no 171 (PrP^{C 129M/171S}), e com as duas alterações (PrP^{C 129V/171S}) em fusão com GFP (green fluorescent protein) e também as proteínas recombinantes correspondentes.

3.3 SEQUENCIAMENTO DA FASE ABERTA DE LEITURA DE *Prnp* E SELEÇÃO DO ALELO DE INTERESSE

As seqüências nucleotídicas correspondentes aos códons 23-254 (254 é *stop* códon, NCBI GI:11079226) de PrP^C humano, obtidas por Reações em Cadeia da Polimerase como visto anteriormente e flanqueadas pelos sítios de restrição enzimática, foram clonados no Sítio de Clonagem Múltiplo (MCS) do vetor pEGFP-C1 (Clontech Laboratories) entre os sítios de enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*.

O plasmídeo pEGFP-C1 codifica uma variante da proteína fluorescente verde (GFP). A 5' do gene EGFP há um sítio de início da tradução chamado "Kozak consensus" que aumenta eficiência de tradução em células eucarióticas. O Sítio de Clonagem Múltiplo (MCS) em pEGFP-C1 está entre as seqüências codificadoras de EGFP e do sítio de poliadenilação de SV40. Genes clonados no MCS serão expressos fundidos ao C-terminal da EGFP (Figura 6) se estiverem na mesma fase de

leitura de EGFP e não houver códons de parada da tradução. Os sinais de poliadenilação de SV40 a 3' do gene EGFP direcionam o direto processamento da extremidade 3' do mRNA. O cassete de resistência à neomicina que consiste de um promotor precoce de SV40, do gene que confere resistência à neomicina/kanamicina e de sinais de poliadenilação do gene de Timidina Kinase do vírus *Herpes simplex* permite que células eucarióticas transfectadas permanentemente sejam selecionadas com uso de G418 (pEGFP-C1 Vector Information, www.clontech.com).

Além de possuir essas características, o plasmídeo pEGFP-C1 (Figura 4) por nós utilizado foi modificado por uma aluna do grupo que inseriu, imediatamente a 5' do gene EGFP, a sequência codificadora do peptídeo sinal de PrP^C de camundongo, que é clivada ao endereçar a proteína para a superfície celular (LEE et al. 2001). Essa ferramenta é bastante útil pois permite que a proteína fluorescente verde continue fusionada a PrP^C após clivagem do peptídeo sinal. Por isso é que, conforme visto anteriormente, a sequência amplificada a partir da fase aberta de leitura de *Prnp* e que foi clonada em pEGFP-C1 não compreendia os nucleotídeos correspondentes aos códons 1 a 22, que codificam o peptídeo sinal.

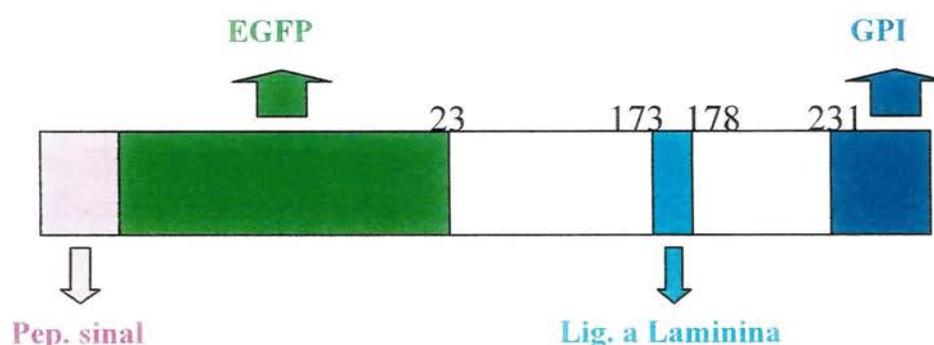


Figura 6 - Aminoácidos 23 a 253 de PrP^C em fusão com a proteína fluorescente verde. Este produto é obtido através da clonagem da sequência nucleotídica de PrP^C no vetor pEGFP-C1. Sequência codificadora de peptídeo sinal de camundongo foi previamente clonado a 5' do gene de EGFP, pois é clivado quando do endereçamento da proteína quimérica para a superfície celular.

A Figura 7 corresponde ao sequenciamento de parte da fase aberta de leitura de *Prnp* amplificada a partir de DNA purificado de um de nossos pacientes, a sequência confere com o cDNA de *Prnp* (NCBI GI 11079225). É possível observar dois picos na posição da primeira base do códon 129 (indicado pela flecha azul) correspondente aos nucleotídeos A e G. Sendo ATG o genótipo mais frequente na população e codificador do aminoácido metionina, convencionou-se chamar o genótipo GTG (codificador do aminoácido valina) de polimórfico. Também é possível notar dois picos na posição da segunda base do códon 171 (indicado pela flecha rosa) que correspondem aos nucleotídeos A e G, sendo o genótipo AAC o de maior prevalência na população e o genótipo AGC (presente em 23% de nossos pacientes) responsável pela troca de asparagina para serina nesta posição. Através desse sequenciamento, realizado por outro membro do grupo, pudemos classificar o paciente como heterozigoto tanto para 171 como para 129.

O produto amplificado a partir desse DNA (representado na Figura 7) foi clonado em pEGFP-C1. É necessário lembrar que O DNA amplificado a partir da fase aberta de leitura de *Prnp* é proveniente de dois alelos, o alelo selvagem e o alelo portador do polimorfismo em 171, visto que nossos pacientes são heterozigotos para 171. Portanto é necessário fazer uma triagem do produto de clonagem PrP^C-pEGFP. Com esse intuito o produto da ligação PrP^C-pEGFP-C1 foi utilizado para transformar bactérias *E coli* da cepa DH5 α , que é muito eficiente na produção de plasmídeo. Alguns clones bacterianos foram selecionados (em geral 10 clones foram triados por transformação) e expandidos em caldo Luria-Bertani para purificação plasmidial (em pequena escala) e sequenciamento do alelo clonado.

Fundação Antonio Prudente

Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora Pós-Graduação

Após avaliação dos clones pudemos obter vetores de expressão contendo o alelo selvagem ($\text{PrP}^{\text{C129M/171N}}$; Figura 8a) e $\text{PrP}^{\text{C129V/171S}}$ (Figura 8b).

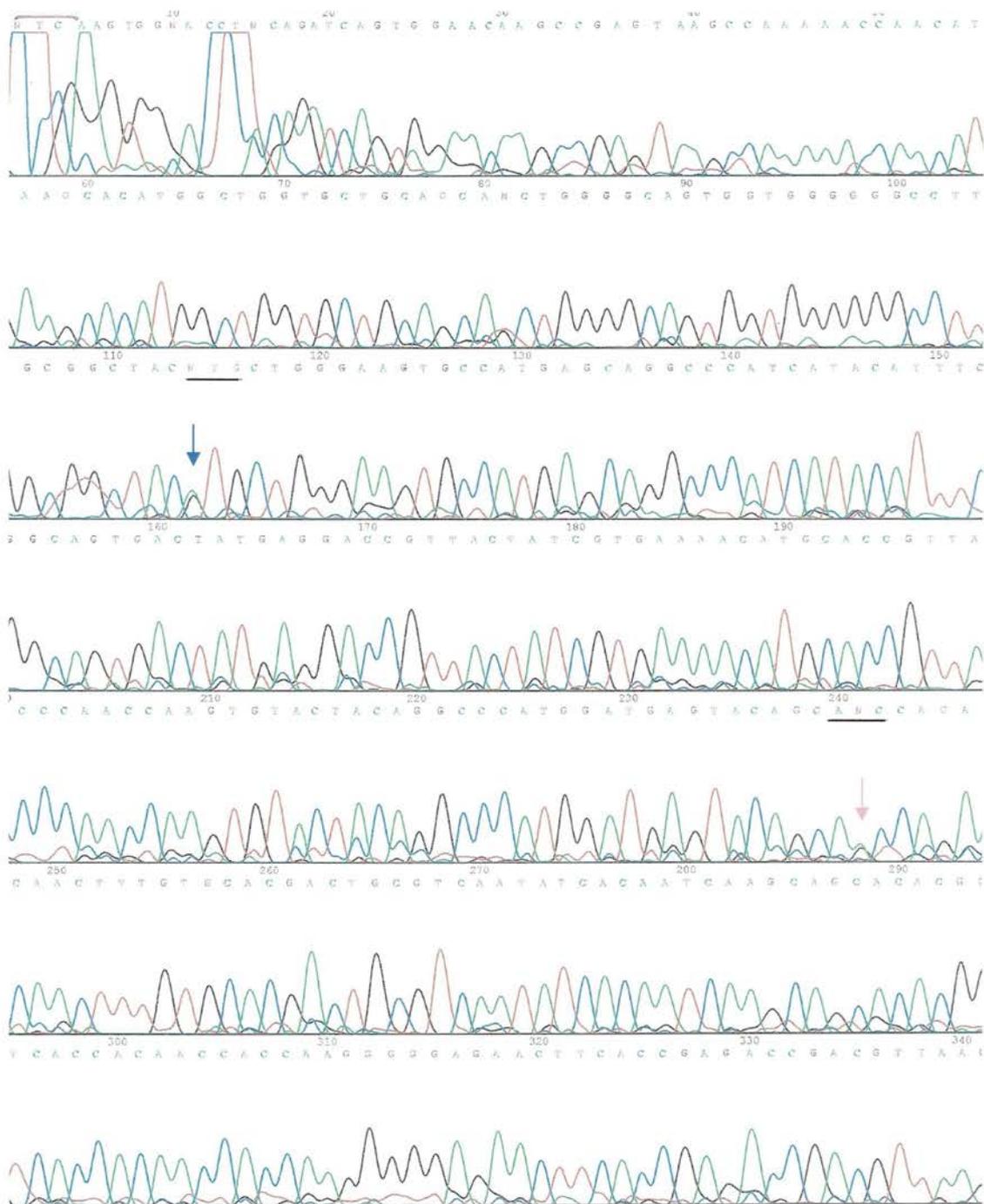


Figura 7 - Sequenciamento de parte da fase aberta de leitura de *Prnp*, DNA genômico, mostrando heteroziguidade do códon 129 (M/V indicado pela flecha azul) bem como do códon 171 (N/S indicado pela flecha rosa).

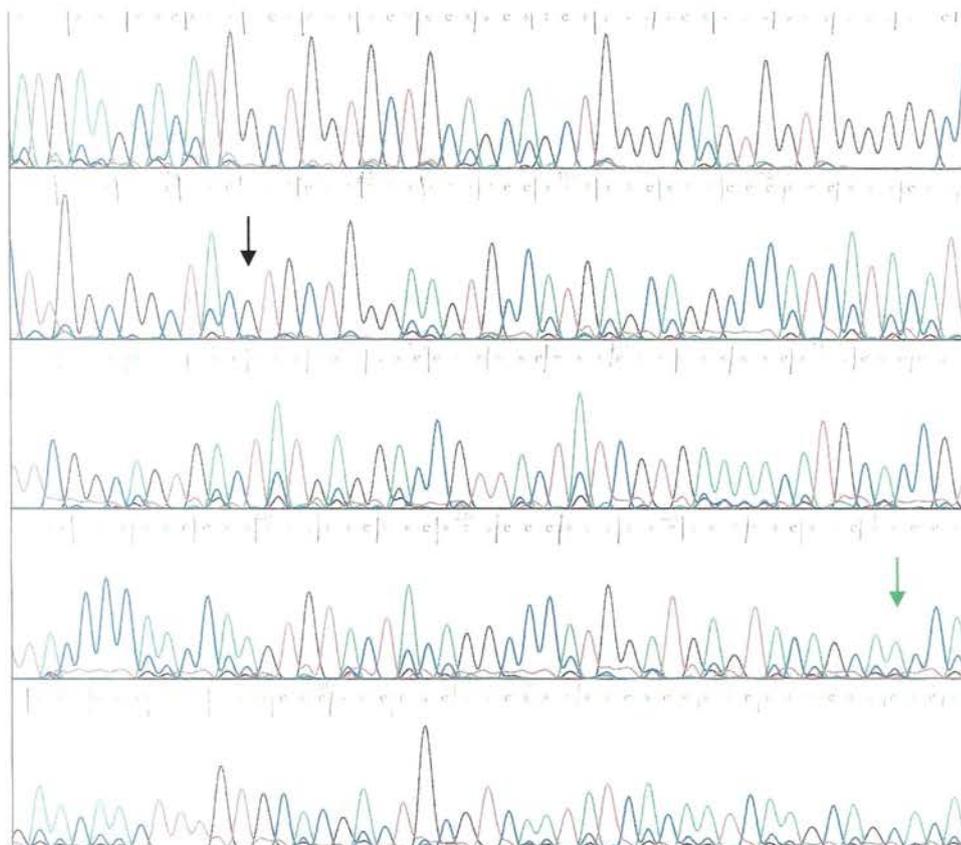


Figura 8c - Sequenciamento de parte da fase aberta de leitura de *Prnp* clonada em pEGFP-C1 mostrando códons 129 (GTG) indicado pela flecha preta e 171 (AAC) indicado pelas flecha verde, que correspondem a PrP^{C129V / 171N}. A sequência confere com o cDNA de *Prnp* (NCBI GI 11079225).

Paralelamente passamos a buscar os alelos PrP^{C 129V/171N} e PrP^{C 129M/171S}. O primeiro foi facilmente obtido (Figura 8c) a partir da clonagem de um produto amplificado de DNA extraído de um paciente heterozigoto para 129 e sem o polimorfismo N171S.

Selecionamos então um DNA previamente classificado como heterozigoto para 171 e homozigoto para metionina no códon 129, e iniciamos nova clonagem conforme já descrito anteriormente. Após transformar bactéria *E coli* obtivemos algumas poucas colônias bacterianas as quais foram expandidas para obtenção de plasmídeos cujos insertos de *Prnp* foram sequenciados, e se mostraram todos alelos do tipo selvagem. Selecionamos então outro DNA com as mesmas características do

anterior e o resultado obtido foi o mesmo, ou seja, todos os clones correspondiam ao alelo selvagem de *Prnp*.

Uma possível explicação para o insucesso das tentativas de clonagem do alelo PrP^{C129M/171S} seria a de que os *primers* FIIHPrPc e RIIHPrPc poderiam estar hibridando, e portanto amplificando, preferencialmente a um dos alelos (selvagem) em detrimento do alelo de interesse (PrP^{C 129M/171S}), por isso decidimos amplificar a fase aberta de leitura com o mesmo par de *primers* (F1 e R2) que vinha sendo usado pela aluna do grupo responsável pelo sequenciamento do DNA genômico de nossos pacientes. Essa nova abordagem ainda teria a vantagem de fornecer um melhor rendimento de PCR e de eliminar um dos passos de nossa antiga abordagem, o de digerir os fragmentos resultante da PCR com endonucleases, o que implica em uma segunda purificação e portanto em perda do produto. Isto torna-se especialmente importante se considerarmos que a reação de ligação (e portanto também a transformação) não estava sendo eficiente devido a dificuldade de obter a quantidade necessária do inserto após purificação do produto de PCR com nossos *primers* FIIRPrPc e RIIPrPc.

3.4 NOVA ABORDAGEM: AMPLIFICAÇÃO DA FASE ABERTA DE LEITURA DE PrP^C COM PRIMERS F1 E R2 E CLONAGEM DA SEQUÊNCIA AMPLIFICADA EM pCR 2.1

Os *primers* F1 e R2 hibridam nos nucleotídeos 65 ao 82 (“forward”) e 841 ao 861 (“reverse”) (caixas vermelhas, Figura 1) do cDNA de PrP^C (Pub Med, GI: 11079225). Tendo em vista que o produto dessa reação compreende a sequência de

interesse (nucleotídeos 110 a 805) foi possível cloná-la no plasmídeo pCR 2.1 seguindo protocolo do fabricante. É necessário esclarecer que essa sequência não pode ser clonada em pEGFP-C1 diretamente por dois motivos: além de conter nucleotídeos a mais e não estar na fase de leitura correta para poder ser expressa em fusão com a proteína fluorescente verde também não está flanqueada pelos sítios de endonucleases *EcoRI* e *BamHI* e portanto não apresenta extremidades coesivas com o vetor. Esses problemas foram contornados através da clonagem da sequência em pCR 2.1 (TA Cloning[®] Kit, Invitrogen) que apresenta a vantagem de não requerer *primers* que contém sítios de restrição enzimática. O Kit baseia-se na atividade da *Taq* polimerase de adicionar uma única deoxiadenosina (A) às extremidades 3' dos produtos de PCR. O vetor linearizado fornecido pelo Kit tem um único resíduo de deoxitimidina (T) nas extremidades 3', o que permite que os insertos de PCR liguem-se eficientemente a esse vetor (TA Cloning[®] Kit Instruction Manual, Invitrogen).

O produto de ligação pCR 2.1- PrP^C foi utilizado para transformação de bactérias quimiocompetentes. Segundo a abordagem que vínhamos seguindo, após expansão dos clones bacterianos e purificação plasmidial, deveríamos sequenciar a inserto de *Prnp* inserido no vetor. Porém optamos por realizar uma abordagem mais simples e rápida que consiste em selecionar alguns clones bacterianos, amplificar o inserto de *Prnp* de seus plasmídeos e digerí-los a endonuclease *Bbv I* que permite identificar a presença do polimorfismo no códon 171.

3.5 DIGESTÃO COM ENDONUCLEASES *Bbv I*, ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA E COLORAÇÃO COM PRATA

Realizamos uma Reação em Cadeia da Polimerase com o intuito de amplificar as sequências clonadas no vetor pCR 2.1. Nesta PCR foram utilizados os *primers* F1 e R2. O produto de PCR foi precipitado com isopropanol, ressuspensão em água e digerido com *Bbv I*.

A endonuclease *BbvI* reconhece o sítio GCAGC e corta o DNA oito nucleotídeos a 3' desta sequência (GCAGC(N)₈^NNNN). Como já comentado anteriormente, o polimorfismo 171 é caracterizado pela troca do nucleotídeo A (AAC) por G (AGC), e essa troca cria um sítio adicional para a enzima *BbvI*. O alelo selvagem que, amplificado com os *primers* F1 e R2, apresenta 9 sítios reconhecidos por essa endonuclease, passa a ter mais um sítio em função desse polimorfismo, que é facilmente reconhecido pela presença de uma banda de 160 pb na eletroforese dos fragmentos resultantes da digestão (Figura 9a).

| # | Ends | Coordinates | Length (bp) | # | Ends | Coordinates | Length (bp) |
|----|-----------------|-------------|-------------|----|-----------------|-------------|-------------|
| 1 | BbvI-(RightEnd) | 550-797 | 248 | 1 | BbvI-(RightEnd) | 550-797 | 248 |
| 2 | BbvI-BbvI | 344-549 | 206 | 2 | BbvI-BbvI | 344-503 | 160 |
| 3 | (LeftEnd)-BbvI | 1-98 | 98 | 3 | (LeftEnd)-BbvI | 1-98 | 98 |
| 4 | BbvI-BbvI | 217-312 | 96 | 4 | BbvI-BbvI | 217-312 | 96 |
| 5 | BbvI-BbvI | 120-168 | 49 | 5 | BbvI-BbvI | 120-168 | 49 |
| 6 | BbvI-BbvI | 313-340 | 28 | 6 | BbvI-BbvI | 504-549 | 46 |
| 7 | BbvI-BbvI | 169-192 | 24 | 7 | BbvI-BbvI | 313-340 | 28 |
| 8 | BbvI-BbvI | 193-216 | 24 | 8 | BbvI-BbvI | 169-192 | 24 |
| 9 | BbvI-BbvI | 99-119 | 21 | 9 | BbvI-BbvI | 193-216 | 24 |
| 10 | BbvI-BbvI | 341-343 | 3 | 10 | BbvI-BbvI | 99-119 | 21 |
| | | | | 11 | BbvI-BbvI | 341-343 | 3 |

Figura 9a - Tabela a esquerda mostra fragmentos obtidos do inserto de *Prnp* 171N amplificado com F1 e R2 e digerido com *BbvI*. Tabela a direita mostra fragmentos obtidos do inserto de *Prnp* 171S amplificado com F1 e R2 e digerido com *BbvI*, note que a presença do polimorfismo em 171 cria novo sítio enzimático identificado pela banda de 160 pb que não existe na tabela a esquerda.

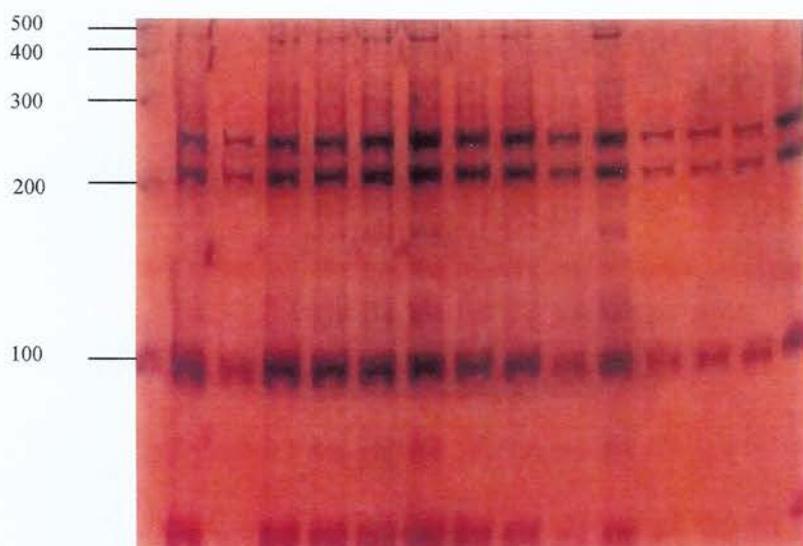


Figura 9b - Gel de poliacrilamida corado com prata mostrando fragmentos resultantes da digestão do inserto de *Prnp* amplificado com *primers* F1 e R2 e digerido com *Bbv I*. É possível notar que nenhum dos clones possui o polimorfismo em 171, que é caracterizado pela presença de uma banda de 160 pb

Tendo em vista que nenhum dos clones apresentava a banda de 160 pb (Figura 9b), e portanto não apresentavam o polimorfismo 171 N→S, resolvemos digerir o inserto (amplificado com F1 e R2) utilizado na clonagem em pCR 2.1. Na Figura 10 podemos notar que o DNA utilizado nessa clonagem (canaleta 4) realmente não apresentava o polimorfismo em questão.

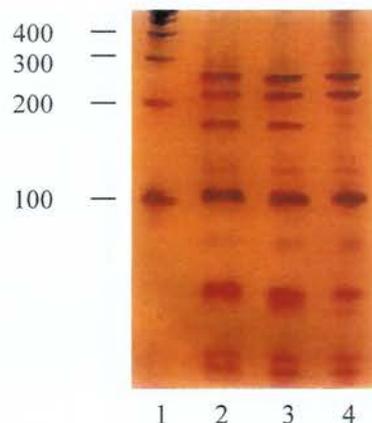


Figura 10 - Gel de poli-acrilamida corado com prata mostrando fragmentos resultantes da digestão do inserto de *Prnp* amplificado com *primers* F1 e R2 a partir de DNA purificado e digerido com *Bbv I*. Canaleta 1 mostra marcador 100pb, 2 e 3 mostram produtos da digestão de insertos amplificados a partir de DNAs heterozigotos para 171, confirmado pelas bandas de 160 e 206. Canaleta 4 corresponde a inserto clonado em pCR2.1, note que a banda de 160 pb está ausente, portanto o DNA utilizado nesta clonagem não possuía o polimorfismo em 171.

Desta forma, foram obtidos inicialmente os clones contendo os alelos de PrP^C_{129M/171N} e PrP^C_{129V/171S}, e logo após obtivemos também o clone de PrP^C_{129V/171N}. O clone PrP^C_{129M/171S} não foi obtido durante o curso deste trabalho. É possível que tenha ocorrido uma troca de DNA e tenhamos clonado um DNA errado. O grupo continua em busca do alelo PrP^C_{129M/171S} mas este trabalho continuou com análise dos alelos obtidos.

Com o intuito de verificar se o polimorfismo N171S seria capaz de influenciar a distribuição celular de PrP^C decidimos expressar, em célula eucariótica, PrP^C 129V/171S e PrP^C 129V/171N humanos em fusão com a proteína fluorescente verde (GFP). Para isso lançamos mão de técnicas de transfecção e das construções PrP^C-pEGFP-C1.

3.6 TRANSFECÇÃO DE CÉLULA EUCARIOTA COM O VETOR pEGFP-C1

A linhagem celular HEK 293 foi transfectada com vetores pEGFP-C1 nos quais estavam clonados as sequências nucleotídicas correspondentes a PrP^C 129V/171N e PrP^C 129V/171S. Optamos por transfectar células HEK 293 porque são facilmente cultiváveis, apresentam expressão muito baixa de PrP^C não interferindo com a proteína recombinante, por apresentarem alta eficiência de transfecção e ainda por serem de origem humana.

O método de transfecção utilizado foi o de captura de DNA mediada por precipitado de fosfato de cálcio: os íons Ca⁺⁺ e PO₄³⁻ reagem para formar o precipitado de Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ com o DNA em solução, que é então capturado pela célula. Este é um método simples e eficiente.

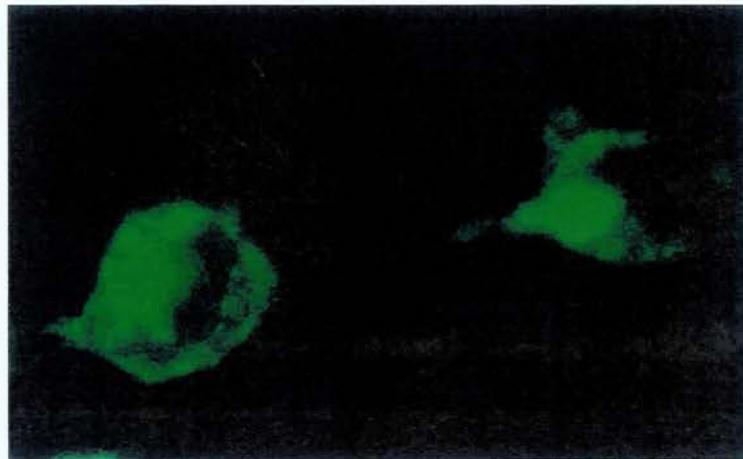
As células transfectadas com os plasmídeos pEGFP foram observadas em microscopia confocal e de fluorescência e apresentaram boa eficiência de transfecção.

A microscopia de confocal é uma ferramenta valiosa na obtenção de imagens com alta resolução e na reconstrução tridimensional de uma variedade de amostras

biológicas. A fina espessura do campo de varredura (0,5 a 1,5 micrometro) permite que a informação seja coletada a partir de uma seção óptica bem definida, eliminando a fluorescência fora de foco e resultando em um aumento no contraste e na intensidade do sinal detectado.

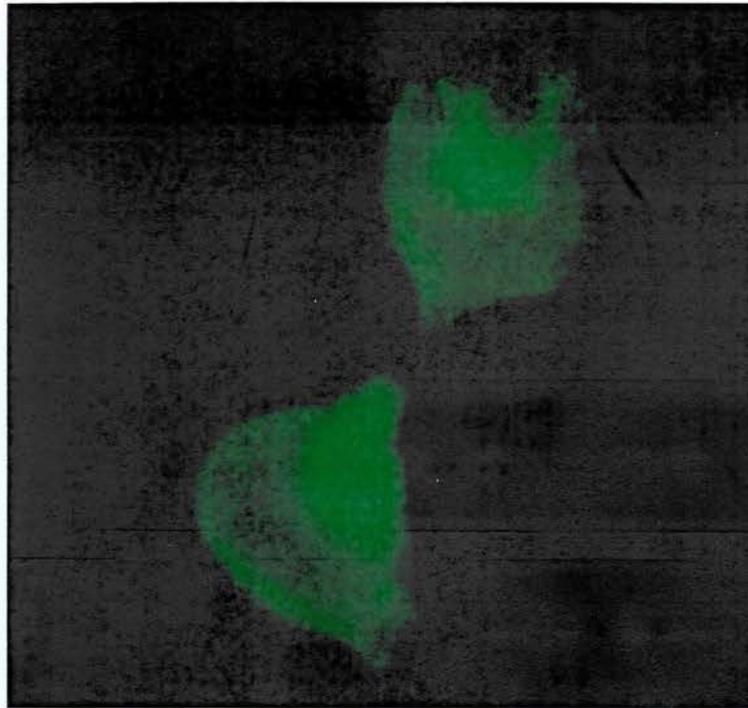
Outra vantagem da Microscopia Confocal é a possibilidade de se observar células vivas, sem fixação ou artefatos de seccionamento físico, o que traz novos esclarecimentos quanto à estrutura e função celular.

As imagens obtidas por microscopia confocal nos permitem concluir que $\text{GFP-PrP}^{\text{C } 129\text{V}/171\text{S}}$ e $\text{GFP-PrP}^{\text{C } 129\text{V}/171\text{N}}$ são corretamente endereçadas para a superfície celular e encontram-se nos mesmos compartimentos intracelulares que correspondem a complexo de Golgi e vesículas de reciclagem (LEE et al. 2001) não apresentando diferença na distribuição celular (Figura 11).



11a

Figura 11a - Imagem de microscopia confocal mostrando distribuição de $\text{GFP-PrP}^{\text{C } 129\text{V}/171\text{N}}$ em células HEK293.



11b

Figura 11b - Imagem de microscopia confocal mostrando distribuição de GFP-PrP^C_{129V/171S} em células HEK293.

3.7 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE GLICOSILAÇÃO DE GFP-PrP^C

^{129V/171N} E GFP-PrP^{C 129V/171S}

A glicosilação é uma característica importante da maioria das proteínas de superfície, incluindo a proteína prion celular, que possui dois sítios variavelmente ocupados de *N*-glicosilação, Asn181 e Asn197, em humanos. Tendo em vista que o polimorfismo N171S não altera a distribuição celular de PrP^C e está próximo aos sítios de glicosilação, decidimos avaliar se o mesmo poderia alterar o padrão de glicosilação da proteína. Para isso, obtivemos extratos de HEK293 transfectadas com pEGFP-PrP^{C 129V/171N} e pEGFP-PrP^{C 129V/171S} conforme descrito em materiais e métodos, os quais foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. Após transferência para membrana de nitrocelulose, realizamos um *Immunoblot* (anticorpo primário que reconhece PrP^C), através do qual pudemos identificar três bandas correspondentes a GFP-PrP^C não glicosilado, monoglicosilado e diglicosilado. Na Figura 12 podemos observar que GFP-PrP^{C129V/171S} (coluna 1) e GFP-PrP^{C129V/171N} (coluna 2) apresentam mesmo padrão de glicosilação.

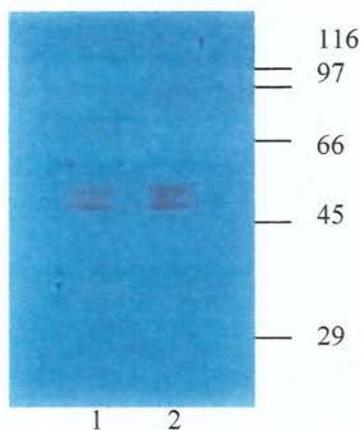


Figura 12 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e reação de *immunoblot* de extratos de cultura celular de HEK293 transfectadas com pEGFP-PrP^C 129V/171S (1) e pEGFP-PrP^C 129V/171N (2) mostrando bandas correspondentes aos três estados de glicosilação de PrP^C, diglicosilado (banda superior), monoglicosilado (banda intermediária, mais sutil) e não-glicosilado. À direita está indicado peso molecular.

O peso molecular apresentado pela proteína recombinante GFP-PrP^C de aproximadamente 60 kDa, corresponde a 27 kDa de GFP e 33-35 kDa de PrP^C. Apesar do anticorpo anti-PrP^C reconhecer a proteína endógena, a banda equivalente ao PrP^C endógeno não é detectada neste ensaio devido à sua baixa expressão.

A alta frequência de variantes alélicas de PrP^C ^{129V/171S} em pacientes com epilepsia sugere que uma perda de função parcial da proteína pode estar envolvida no mecanismo epileptogênico. Uma vez que este polimorfismo (N171S) está localizado próximo ao domínio de ligação à laminina (173 a 180) (GRANER et al. 2000a; ³COITINHO et al.), a mudança poderia alterar a interação PrP^C-LN. Para avaliar essa hipótese produzimos proteínas PrP^C recombinantes.

3.8 SUBCLONAGEM DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DE PrP^C ^{129M/171N} E PrP^C ^{129V/171S} HUMANOS EM VETOR DE EXPRESSÃO PARA CÉLULA PROCARIÓTICA

A partir de vetores pEGFP-C1 nos quais estavam clonados PrP^C^{129M/171N} e PrP^C^{129V/171S} amplificamos a sequência nucleotídica que corresponde aos aminoácidos 23 a 230 de PrP^C através de Reações em Cadeia da Polimerase. Os *primers* utilizados hibridam dos nucleotídeos 110 a 121 (FIHPrPc) e 722 a 733 (RIHPrPc) (caixas verdes, Figura 1) do cDNA (NCBI GI 11079225) do gene de PrP^C (*Prnp*). A sequência correspondente aos códons 231 a 254 é removida para adição da ancora de GPI nas células eucariotas e não precisa ser clonada no vetor de expressão para célula procariótica.

Esses *primers* contém ainda sítios de enzimas de restrição *Bam*HI (“primer Forward”) e *Eco*RI (“primer Reverse”), assim como produto de PCR obtemos a sequência nucleotídica correspondente aos códons 23 a 230 de PrP^C flanqueados pelos sítios de enzimas de restrição *Bam*HI (extremidade 5’) e *Eco*RI (extremidade 3’),

³ Coitinho AS. Dados não publicados.

ficando as extremidades do inserto coesivas com as do vetor pRSET-A (Invitrogen™).

O produto da PCR foi separado eletroforéticamente em gel de agarose 1%, para que pudéssemos cortar do gel a banda específica de aproximadamente 650 pb. Da banda cortada obtivemos a sequência nucleotídica desejada (inserto) após purificação pelo método de fenol/clorofórmio. Este inserto foi então digerido com as enzimas de restrição *Eco* R1 e *Bam* H1 para tornar suas extremidades coesivas com as do vetor e após digestão o inserto de PrP^C foi novamente purificado pelo método de fenol/ clorofórmio e clonado em pRSET-A (Figura 13).

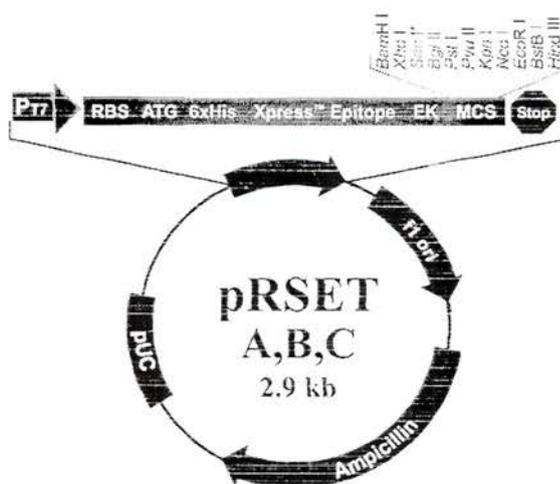


Figura 13 - Mapa do plasmídeo pRSET-A (Invitrogen™) utilizado na clonagem de PrP^C 129M/171N e PrP^C 129V/171S entre os sítios de restrição *Bam* HI e *Eco* RI.

O fragmento de DNA contendo os nucleotídeos que codificam para os aminoácidos 23-230 da proteína PrP^C 129M/171N humana foi então clonado no plasmídeo pRSET-A (Invitrogen™) que foi gentilmente cedido por Dr. Zahn (ZAHN et al. 1997). O mesmo foi feito com o inserto de PrP^C 129V/171S.

O vetor pRSET-A (Figura 13), possui o promotor T7 que regula expressão do gene heterólogo, um sítio de ligação do ribossomo situado no vetor de forma a permitir uma tradução eficiente, um *tag* N-terminal composto de 6 resíduos de histidina (*N-terminal 6xHis tag*) que permite a purificação da proteína recombinante em resinas que quelam metal além do gene de resistência à ampicilina que possibilita a seleção de células transformadas com o plasmídeo.

Os produtos de clonagem PrP^C 129M/171N-pRSET e PrP^C 129V/171S-pRSET foram utilizados para transformar cepa de *E coli* DH5 α . Então selecionamos clones resistentes (dois ou três) em placas de meio LB contendo ampicilina, e estes foram expandidos para obtenção de plasmídeo utilizando kit Wizard *Plus*[®] Minipreps (Promega). Após sequenciamento dos clones selecionados, escolhemos um deles para transformar cepa BL-21 de *E coli*, que apresentam boa expressão de PrP^C. Então seguimos o protocolo de purificação da proteína prion celular de ZAHN et al. (1997).

3.9 EXPRESSÃO DE HIS₆-PrP^C EM BACTÉRIA, WESTERN BLOT E IMMUNOBLOT

As proteínas recombinantes produzidas em bactéria (rendimento de aproximadamente 5 mg por litro de cultura de bactéria) foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 10% no qual aplicamos 10 μ g de cada proteína recombinante: His₆-PrP^C de camundongo (mouse), His₆-PrP^C 129M/171N e His₆-PrP^C 129V/171S, e marcador de alto peso molecular. O gel foi corado com azul de Coomassie (Figura 14a), e pudemos ver a presença de bandas do mesmo tamanho de

His₆-PrP^C de camundongo (aproximadamente 27 kDa), conforme esperado para as proteínas recombinantes humanas.

Em uma segunda abordagem, proteínas recombinantes (His₆-PrP^C ^{129M/171N} e His₆-PrP^C ^{129V/171S}) foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e transferidas para membranas de nitrocelulose. Para verificar a eficiência da transferência usou-se corante Ponceau.

A membrana foi então bloqueada com TBST contendo 5% de leite desnatado liofilizado e incubada com anticorpo primário policlonal que reconhece PrP^C de camundongo produzido em camundongos nocaute de *Prpn* (pelo grupo). Aplicamos no mesmo gel PrP^C de camundongo como controle positivo e como controle negativo foi utilizado soro pré-imune de camundongo na mesma diluição. Depois de lavada com TBST, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase e revelada com o substrato para essa enzima.

Filmes radiográficos (Figura 14b) foram expostos às membranas: as canaletas 3 e 5 mostram as proteínas recombinantes humanas His₆-PrP^C ^{129V/171S} e His₆-PrP^C ^{129M/171N}, respectivamente, que são especificamente reconhecidas pelo anticorpo que reconhece PrP^C. Além disso seu tamanho corresponde ao esperado, sendo semelhante ao de PrP^C de camundongo previamente mostrado pelo grupo (canaleta 1). A pequena degradação observada em His₆-PrP^C ^{129V/171S} não deve ter alterado o ensaio de ligação realizado posteriormente. Nas canaletas 2, 4 e 6 nenhuma banda foi reconhecida com o soro pré-imune de camundongo.

que encontra-se o sítio de ligação a PrP^C (⁴COITINHO et al.). Ensaio semelhante foi realizado com PrP^C de camundongo e a proteína recombinante STI-1 (ZANATA et al. 2002).

Obtivemos curvas de ligação (μg de peptídeo marcado adicionado X μg de peptídeo marcado ligado) total, inespecífica (com peptídeo não marcado em concentração 5x maior em relação ao peptídeo marcado), e específica (diferença das ligações inespecífica e total).

Para construir essas curvas os valores fornecidos pelo gamma-counter em cpm (contagem por minuto) foram convertidos em massa de peptídeo marcado (obtido a partir da atividade específica de I¹²⁵ γ 1-BSA), com esses dados calculamos a concentração do mesmo que ficou ligada em cada poço.

A partir da razão concentração de peptídeo ligado/peptídeo livre (bound/free) obtivemos o gráfico de Scatchard (SCATCHARD 1949). Esse gráfico fornece uma reta através da qual podemos calcular o Kd (constante de dissociação), que é o inverso do seu coeficiente angular.

Aqui estão representados gráficos correspondentes a um dos ensaios realizados. Entretanto foram realizados mais dois ensaios de ligação de PrP^C de camundongo e humanos com I¹²⁵ γ 1-BSA (em dias diferentes), que forneceram resultados semelhantes aos mostrados. Nesses ensaios, não houve ligação inespecífica do peptídeo marcado com BSA (dados não mostrados)

Observamos que a interação His₆-PrP^C ^{129M/171N} / I¹²⁵ γ 1-BSA é específica (Figura 15a), e apresenta um Kd (constante de dissociação aparente) de 8×10^{-7} M (Figura 15b), o que indica uma alta afinidade. Na Figura 16 vemos que a interação

⁴ Coitinho AS. Dados não publicados.

His₆-PrP^{C 129V/171S} / I¹²⁵γ1-BSA também é específica (16a) e apresenta um Kd de 11×10^{-7} M (16b), sendo portanto bastante semelhante à interação His₆-PrP^{C 129M/171N} / I¹²⁵γ1-BSA. Sabe-se que quanto maior a constante de dissociação, menor a afinidade da ligação, mas neste caso obtivemos Kds muito próximos. Portanto podemos dizer que o polimorfismo N171S não altera a afinidade de PrP^C pelo peptídeo da cadeia γ1 de LN pelo menos *in vitro*.

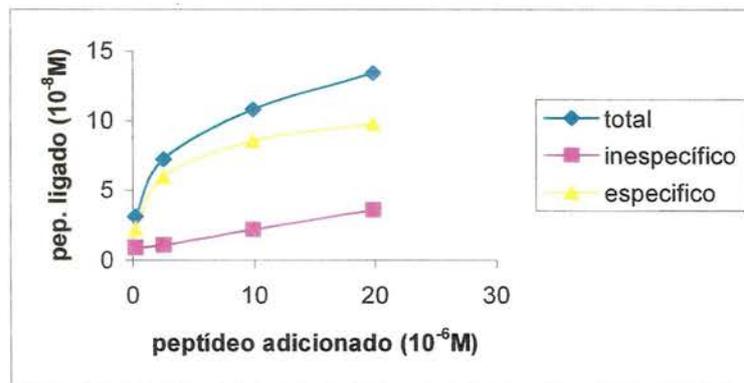


Figura 15a

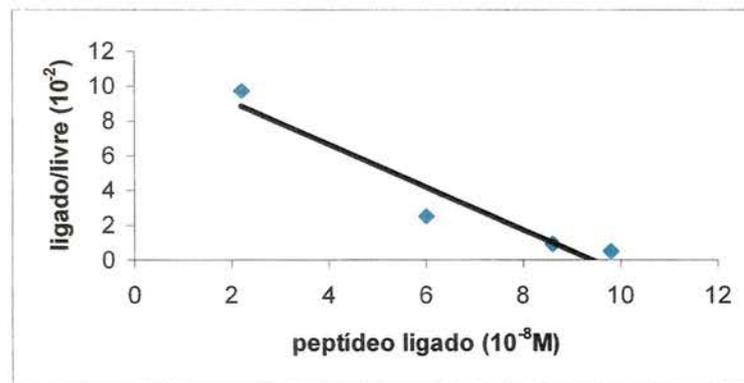


Figura 15b

Figura 15a - Curvas total, inespecífica e específica da interação entre PrP^{C129M/171N} recombinante e o peptídeo da cadeia γ1 de laminina (I¹²⁵γ1-BSA). A curva representando a ligação específica foi construída subtraindo-se a ligação inespecífica da total. **b)** Gráfico de Scatchard obtido a partir dos valores da curva específica. Pode-se calcular o Kd da interação PrP^{C 129M/171N} / I¹²⁵γ1-BSA (8×10^{-7} M), dado pelo inverso do coeficiente angular da reta.

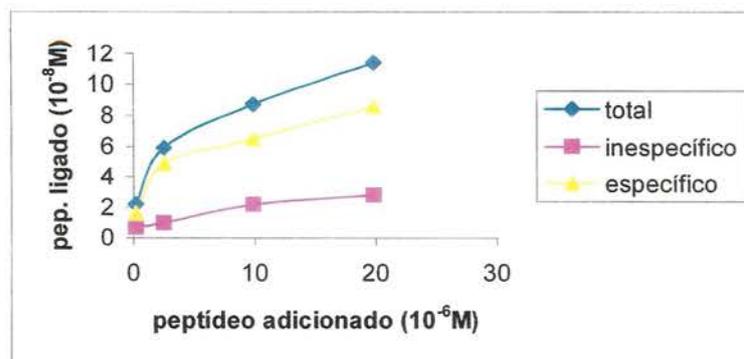


Figura 16a

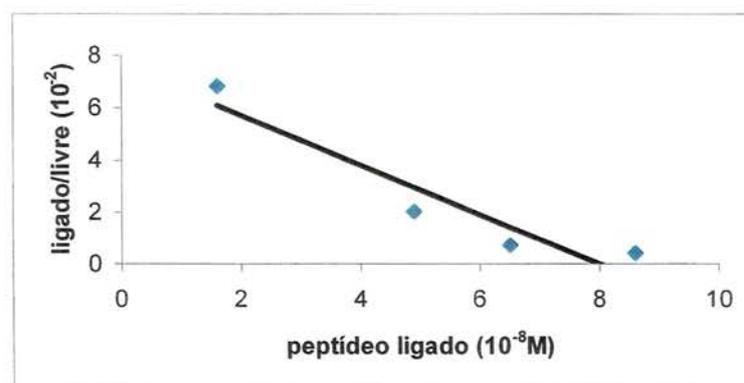


Figura 16b

Figura 16a - Curvas total, inespecífica e específica da interação entre $PrP^{C129V/171S}$ recombinante e o peptídeo da cadeia $\gamma 1$ de laminina ($I^{125}\gamma 1$ -BSA). A curva representando a ligação específica foi construída subtraindo-se a ligação inespecífica da total. **b)** Gráfico de Scatchard obtido a partir dos valores da curva específica. Pode-se calcular o K_d da interação $PrP^{C129V/171S} / I^{125}\gamma 1$ -BSA ($11 \times 10^{-7} M$), dado pelo inverso do coeficiente angular da reta.

Como controle do ensaio utilizamos PrP^C de camundongo (fig 17) e obtivemos um K_d de $14 \times 10^{-7} M$ que é maior (menos específico) daquele determinado previamente para a interação PrP^C de camundongo/laminina íntegra ($10^{-8}M$, GRANER et al. 2000a). Isto pode ocorrer devido a variação de estrutura do peptídeo inserido na molécula de laminina em relação ao peptídeo em solução. Comparando-se as curvas específicas das fig. 15a, 16a e 17a pode-se dizer que a interação do

peptídeo $\gamma 1$ -BSA com PrP^C de camundongo é equivalente aquela das proteínas recombinantes humanas.

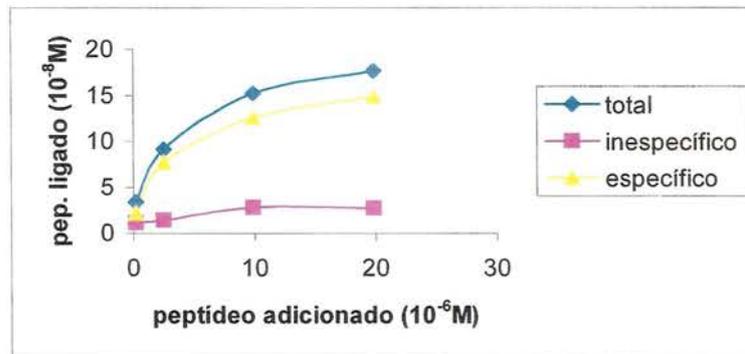


Figura 17a

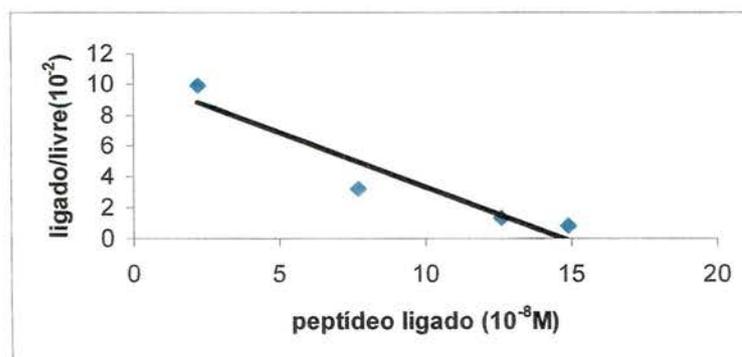


Figura 17b

Figura 17a - Curvas total, inespecífica e específica da interação PrP^C recombinante de camundongo e o peptídeo da cadeia $\gamma 1$ de laminina ($I^{125}\gamma 1$ -BSA). A curva representando a ligação específica foi contruída subtraindo-se a ligação inespecífica da total. **b)** Gráfico de Scatchard obtido a partir dos valores da curva específica. Pode-se calcular o Kd da interação PrP^C de camundongo/ $I^{125}\gamma 1$ -BSA ($14 \times 10^{-7} M$), dado pelo inverso do coeficiente angular da reta.

Além da proteína recombinante His₆-PrP^C de camundongo utilizada como controle do ensaio de ligação, o grupo possui outra proteína recombinante His₆-PrP^C de camundongo que foi renaturada na presença de Cu⁺². Sabe-se que PrP^C atua no metabolismo do cobre, sendo que a capacidade de ligar este íon pode modular a

atividade de superóxido dismutase (enzima antioxidante) e portanto proteger a célula contra o estresse oxidativo (BROWN et al. 2002). Assim, achamos interessante verificar se a associação de Cu^{2+} a proteína recombinante modificava a afinidade da mesma pelo ligante (peptídeo da cadeia $\gamma 1$).

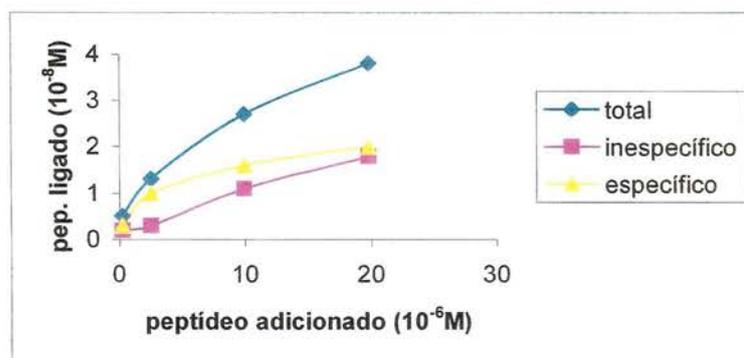


Figura 18a

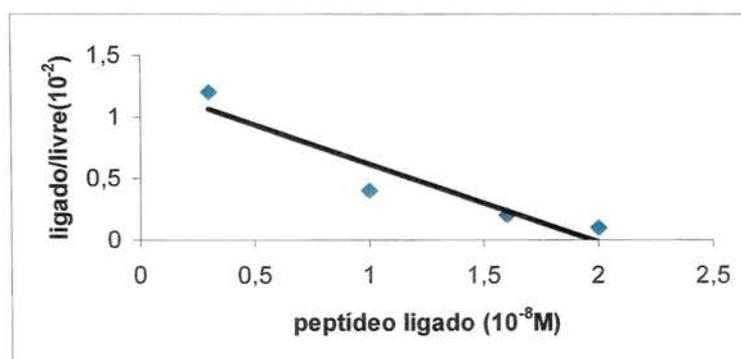


Figura 18b

Figura 18a - Curvas total, inespecífica e específica da interação PrP^{C} de camundongo renaturado na presença de Cu^{2+} e o peptídeo da cadeia $\gamma 1$ de laminina ($\text{I}^{125}\gamma 1\text{-BSA}$). A curva representando a ligação específica foi contruída subtraindo-se a ligação inespecífica da total. **b)** Gráfico de Scatchard obtido a partir dos valores da curva específica. Pode-se calcular o K_d da interação PrP^{C} de camundongo renaturado na presença de $\text{Cu}^{2+}/ \text{I}^{125}\gamma 1\text{-BSA}$ ($16 \times 10^{-7} \text{ M}$), dado pelo inverso do coeficiente angular da reta.

Comparando-se as curvas específicas das Figuras 17a e 18a observamos que a curva específica da interação PrP^C de camundongo renaturado na presença de cobre/¹²⁵I- γ 1-BSA parece atingir saturação com uma menor concentração de ¹²⁵I- γ 1-BSA adicionado. Tendo em vista que a afinidade das proteínas renaturadas na presença e ausência de Cu²⁺ são bem semelhantes (Kds de 16x10⁻⁷ M e 14x10⁻⁷ M respectivamente), pode-se concluir que o número de sítios ligantes de PrP^C de camundongo renaturado na presença de cobre é menor. Sabendo-se que as proteínas foram dosadas antes de serem adsorvidas aos poços do ensaio de ligação, pode-se pensar que parte das moléculas de PrP^C renaturadas na presença de cobre não liga γ 1-BSA, o que seria compatível com uma pequena degradação ocorrida durante o processo de renaturação da proteína.

A não existência de alterações na interação de γ 1-BSA com PrP^C renaturado na presença de cobre indica que provavelmente nenhuma alteração deve ocorrer nas proteínas humanas. Assim, não realizamos a renaturação dos proteínas recombinantes humanas na presença de cobre.

A variante alélica PrP^C ^{129V/171N} clonada em pRSET só foi obtida após a realização destes ensaios de ligação. Além disso o grupo ainda está clonando a variante PrP^C ^{129M/171S}. Entretanto acreditamos que a mudança no códon 129, que é comumente encontrada, não deve interferir na ligação *in vitro* de PrP^C à LN, uma vez que o raro polimorfismo em 171 não alterou essa ligação.

Fundação Antonio Prudente

Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora Pós-Graduação

4 DISCUSSÃO

O agente infeccioso protéico denominado PrP^{Sc} é uma isoforma de uma proteína celular, PrP^C, e sabe-se que essas moléculas diferem apenas na conformação protéica (PRUSINER 1998a). Já foi demonstrado que PrP^C está envolvido com várias funções fisiológicas incluindo homeostase de íons cobre e proteção contra estresse oxidativo (VASSALLO e HERMS 2003), adesão neuronal, extensão e manutenção de neuritos (GRANER et al. 2000a e b) e transdução de sinal (MOUILLET-RICHARD et al. 2000; CHIARINI et al. 2002).

A geração de camundongos com deleção do exon codificador de PrP^C possibilitou a realização de estudos que levaram à descoberta de que a ausência de *Prnp* causa alterações eletrofisiológicas no hipocampo (*in vitro*) que resultam em aumento da excitabilidade neuronal e poderiam promover atividade epileptiforme (COLLINGE et al. 1994; COLLING et al. 1996; MALLUCCI et al. 2002). Além disso, esses camundongos apresentaram alterações nas fibras de Mossy (hipocampo) semelhantes àsquelas encontradas em epilepsia de lobo temporal (COLLING et al. 1997) e ainda prejuízo da inibição mediada por receptor GABA_A no hipocampo (COLLINGE et al. 1994). *In vivo* estes animais apresentam maior sensibilidade a convulsões induzidas quimicamente (WALZ et al. 1999) o que, associado às evidências de que PrP^C protege contra estresse oxidativo (VASSALLO e HERMS 2003) e que sua perda induz hiperexcitabilidade neuronal (MALLUCCI et al. 2002), nos levou a propor que a perda total (camundongos nocaute) ou parcial (em humanos) da função de PrP^C poderia predispor à epileptogênese (WALZ et al. 2002).

Para abordar essa idéia nosso grupo comparou sequências de *Prnp* de pacientes tratados cirurgicamente para epilepsia de lobo temporal relacionada a esclerose hipocampal com seqüências de *Prnp* de indivíduos sadios.

A epilepsia ou síndrome epiléptica é um grupo de doenças de alta prevalência e incidência (a cada ano 100 mil novos casos de epilepsia são diagnosticados nos EUA). Crises convulsivas frequentemente ocorrem como parte de uma síndrome epiléptica e são sintomas de uma patologia de base que pode ser genética, traumática, metabólica, infecciosa, maligna ou farmacológica (BROWNE e HOLMES 2001). Alguns tipos de epilepsia são refratárias a tratamento farmacológicos, e a principal delas é a epilepsia de lobo mesial temporal relacionada a esclerose hipocampal (MTLE-HS), que também é responsável pelo maior número de cirurgias realizadas em pacientes epiléticos pelo Centro de Cirurgia de Epilepsia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP). Em função desses pontos pacientes com MTLE-HS foram inicialmente selecionados para análise de *Prnp*. Além disso, como visto anteriormente, camundongos nocautes de *Prnp* apresentam alterações fisiológicas hipocampais, o que também tornava a esclerose hipocampal o tipo de epilepsia mais interessante para dar início ao estudo de *Prnp*. Alguns estudos já foram iniciados pelo grupo na tentativa de verificar se os polimorfismos que encontramos nos casos de MTLE-HS relacionam-se também com outros tipos de epilepsia.

Este trabalho teve início em função dos dados preliminares do grupo que sugeriam alta prevalência de alterações nos códons 110 (K/N), 117 (A/V) e 171 (N/S) de *Prnp* de pacientes com esclerose hipocampal, o tipo mais comum de epilepsia refratária a fármacos, tratável cirurgicamente. Porém, com base nos sequenciamentos dos clones obtidos a partir dos DNAs desses pacientes,

consideramos importante realizar outros métodos de identificação de SNPs. De fato a identificação de polimorfismos é uma tarefa que requer alguns cuidados, e a associação de metodologias pode evitar problemas de interpretação. Em um estudo alemão (WINDL et al. 1999) possíveis alterações em *Prnp* foram confirmadas por três metodologias: digestão por endonucleases, sequenciamento direto do produto de PCR e sequenciamento a partir da clonagem de partes do produto de PCR. No caso do polimorfismo silencioso no códon 117, a co-segregação com outro polimorfismo leva a amplificação preferencial deste alelo e perda da análise do outro alelo, portanto é necessário o uso de diferentes pares de *primers*. Essa fonte de erro foi evitada em nossas análises pelo uso de dois pares de *primers* na clonagem, bem como pela associação de outras metodologias. Assim, através do uso de endonucleases de restrição, DHPLC (denaturing high-performance liquid chromatography) e ressequenciamento das amostras de DNA identificamos a presença de deleções do domínio de repetições (*octarepeat*), do polimorfismo silencioso no códon 117 e principalmente do polimorfismo N171S (FINK et al. 1994) que está presente em heterozigose em 23% de nossos pacientes e em nenhum dos controles (WALZ et al. 2003) (Anexo 1).

Um outro polimorfismo (M129V) foi encontrado na mesma frequência nos casos (podendo ou não estar associado àquele no códon 171) e controles. Interessantemente há dados que sugerem que a presença de M ou V no códon 129 associada à mutação D178N de *Prnp* resulta em diferenças nas razões das glicofomas (PETERSEN et al. 1996) e na conformação protéica, o que poderia explicar os diferentes fenótipos causados pela mesma mutação: 129M/178N causa FFI enquanto 129V/178N causa CJD. Além disso o aa 129 está em uma região

estruturada em folha β (RIEK et al. 1998), o que pode alterar a conformação da proteína com a mutação D178N e contribuir para a diferença de fenótipos observados. Desta forma, além da importância na conformação protéica, o polimorfismo em 129 poderia ter um papel importante na sua função fisiológica de PrP^C, e passou a ser também alvo de nosso estudo.

A alta frequência de variantes alélicas de PrP^C ^{129V/171S} em pacientes com epilepsia do lobo temporal (WALZ et al. 2003) (Anexo 1) apontam para um envolvimento de PrP^C com mecanismo epileptogênico. Ainda nessa linha, como já discutido anteriormente, camundongos nocaute para *Prnp* apresentam maior sensibilidade a convulsões induzidas quimicamente por três agentes diferentes (WALZ et al. 1999), entre eles o ácido caínico.

É interessante notar que a excitotoxicidade mediada pelo ácido caínico envolve indução de tPA que atua na conversão de plasminogênio em plasmina no cérebro levando à degradação de laminina e morte neuronal (CHEN e STRICKLAND 1997), sugerindo que a interação neurônio-laminina está envolvida com plasticidade neuronal no hipocampo. Mecanismos adaptativos envolvendo neuroplasticidade são necessários para recuperação da função cerebral após injúria, porém uma disfunção destes mecanismos pode estar envolvida no processo epileptogênico (WALZ et al. 2002).

As lamininas compõem uma família de glicoproteínas de matriz extracelular importantes para desenvolvimento e manutenção da organização celular. Importantes funções celulares atribuídas à laminina incluem estímulo de crescimento e diferenciação neuronal, promoção do crescimento neurítico e mediação da comunicação celular (LUCKENBILL-EDDS 1997; BECK et al, 1990). A laminina é

um potente estimulador do crescimento neurítico e um peptídeo sintético correspondente a uma sequência da cadeia $\gamma 1$, mais tarde mostrado pelo nosso grupo como sendo o sítio ligante de PrP^C (GRANER et al. 2000a e b), possui propriedades neuroplásticas (BECK et al. 1990).

Tendo em vista que PrP^C está relacionado com neuroplasticidade (GRANER et al. 2000a e b), assim como a laminina (LUCKENBILL-EDDS 1997), imaginamos que um possível prejuízo da interação PrP^C-laminina em função do polimorfismo N171S que está localizado próximo ao domínio de ligação à laminina (173 a 180) (⁵COITINHO et al.) poderia predispor à epileptogênese.

Com o intuito de avaliar o possível prejuízo da interação citada acima realizamos ensaios de ligação de proteínas recombinantes His-PrP^C com peptídeo da cadeia $\gamma 1$ de laminina e verificamos que as afinidades das proteínas recombinantes PrP^{C 129M/171N} e PrP^{C 129V/171S} pelo peptídeo $\gamma 1$ de laminina mostraram-se semelhantes. Portanto podemos dizer que o polimorfismo N171S não altera a afinidade de PrP^C pelo peptídeo da cadeia $\gamma 1$ de laminina, pelo menos *in vitro*.

Sabe-se que algumas mutações patológicas de *Prnp* alteram a localização subcelular de PrP^C, isto é, os mutantes são parcialmente retidos no Retículo Endoplasmático devido ao prejuízo no transporte para a superfície celular (IVANOVA et al. 2001). Além disso, mutações de aminoácidos podem ter efeito no padrão de glicosilação e conseqüentemente na conformação de PrP^C (RIEK et al. 1998; WONG et al. 2000).

Com o intuito de verificar se o polimorfismo N171S seria capaz de influenciar a distribuição celular e padrão de glicosilação de PrP^C decidimos

⁵ Coitinho AS. Dados não publicados.

expressar, em célula eucariótica, PrP^{C129V/171S} e PrP^{C129V/171N} humanos em fusão com a proteína fluorescente verde (GFP). As imagens obtidas de microscopia confocal nos permitem concluir que GFP-PrP^{C129V/171S} e GFP-PrP^{C129V/171N} são corretamente endereçadas para a superfície celular e encontram-se nos mesmos compartimentos intracelulares que incluem complexo de Golgi e vesículas de reciclagem, de maneira semelhante à proteína de camundongo (LEE et al. 2001).

Extratos celulares com alta expressão de GFP-PrP^{C129V/171N} e GFP-PrP^{C129V/171S} obtidos após transfecção de células HEK foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida e *Immunoblot*, através do qual pudemos concluir que GFP-PrP^{C129V/171S} e GFP-PrP^{C129V/171N} apresentam o mesmo padrão de glicosilação.

Portanto até o momento não encontramos evidências que expliquem uma alteração na função de PrP^C relacionada ao polimorfismo N171S de alta prevalência em pacientes epiléticos. É possível que este co-segregue com outro polimorfismo em um dos intron de *Prnp* ou até mesmo em outro gene do mesmo *locus* e este sim tenha implicações biológicas, mas essas são apenas especulações.

Pouco se sabe a respeito da sinalização desencadeada por PrP^C e seus ligantes, mas há evidências que apontam para uma ativação da proteína kinase Fyn mediada por PrP^C (MOUILLET-RICHARD et al. 2000). Como Fyn é uma proteína intracelular e PrP^C está ancorada na face externa da membrana celular é provável que a sinalização dependente de PrP^C que causa ativação de Fyn envolva fatores intermediários. Recentemente o grupo mostrou que a interação de PrP^C com seu ligante STI-1 desencadeia sinalização pelas vias de cAMP/PKA e MAPK, sendo que a primeira delas está envolvida com proteção contra morte celular programada em neurônios retinianos (ZANATA et al. 2002; CHIARINI et al. 2002).

O grupo tem ainda dados de que a interação de PrP^C com seu peptídeo ligante na molécula de laminina (peptídeo da cadeia $\gamma 1$) induz aumento de cálcio intracelular (⁶LEE et al.). Ainda não sabemos se esse aumento de cálcio está relacionado à atividade de canais iônicos ou se é um evento intermediário de uma via de sinalização. Sabe-se que disfunções de canais iônicos estão relacionadas a diferentes tipos de epilepsia (HIROSE et al. 2000), e ainda há estudos que revelam que receptores de acetilcolina mutantes podem reduzir correntes de entrada de cálcio o que poderia alterar mecanismos inibitórios neuronais e desencadear uma crise epiléptica (HIROSE et al. 2000). Assim, pode-se pensar que o aumento do cálcio intracelular mediado pela interação PrP^C- $\gamma 1$ poderia ser alterado pela presença do polimorfismo N171S, o que promoveria hiperexcitabilidade neuronal e portanto epileptogênese. Portanto, o grupo pretende agora avaliar a sinalização desencadeada por moléculas de PrP^C com os polimorfismos nos códons 129 e 171.

⁶ Lee KS, et al. Dados não publicados.

5 CONCLUSÕES

Após realizar os ensaios de ligação de PrP^C humanos com I¹²⁵γ1-BSA concluímos que o polimorfismo de *Prnp* N171S não altera a afinidade *in vitro* de PrP^C e laminina.

Com relação à distribuição celular de PrP^C em função da presença/ausência do polimorfismo em 171 é possível afirmar que ambas as proteínas são corretamente endereçadas à superfície celular e também encontram-se em compartimentos intracelulares bem como apresentam o mesmo padrão de glicosilação.

Até o momento nenhuma alteração grosseira na função de PrP^C foi observada em função do polimorfismo em alta frequência entre os indivíduos com esclerose hipocampal. O trabalho deve ser continuado pelo grupo e alterações mais sutis como mudança de padrões de sinalização celular dados pela interação PrP^C –LN serão investigados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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.

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; 51:734-7.

Berr C, Helbecque N, Sazdovitch V, et al. Polymorphism of the codon 129 of the prion protein (PrP) gene and neuropathology of cerebral ageing. **Acta Neuropathol** 2003; 106:71-4.

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

Browne TR, Holmes GL. Epilepsy. **N Engl J Med** 2001; 344: 1145-51.

Büeler H, Fischer M, Lang Y, et al. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. **Nature** 1992; 356:577-582.

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

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

Chesebro B, Race R, Wehrly K, et al. Identification of scrapie prion proteins mRNA in scrapie infected and uninfected brain. **Nature** 1985; 315: 331-333.

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

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

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

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

Croes EA, Dermaut B, Houwing-Duistermaat JJ, et al. Early cognitive decline is associated with prion protein codon 129 polymorphism. **Ann Neurol** 2003; 54:275-6.

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.

Dermaut B, Croes EA, Rademakers R, et al. PRNP Val129 homozygosity increases risk for early-onset Alzheimer's disease. **Ann Neurol** 2003; 53:409-12.

Engel J Jr. Surgery for seizures. **N Engl J Med** 1996; 334:647-52.

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.

Finn PJ, Sun L, Nampalli S, et al. Synthesis and application of charge-modified dye-labeled dideoxynucleoside-5'-triphosphates to 'direct-load' DNA sequencing. **Nucleic Acids Res** 2002; 30:2877-85.

Goldmann W, Hunter N, Martin T, Dawson M, Hope J. Different forms of the bovine PrP gene have five or six copies of a short, G-C rich element within the protein-coding exon. **J Gen Virol** 1991; 72:201-4.

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

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

Griffith JS. Self-replication and scrapie. **Nature** 1967; 215:1043-4.

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

Hirose S, Okada M, Kaneko S, Mitsudome A. Are some idiopathic epilepsies disorders of ion channels?: A working hypothesis. **Epilepsy Res** 2000; 41:191-204.

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

Huang Z, Prusiner SB, Cohen FE. Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment. **Fold Des** 1996; 1:13-9.

Ivanova L, Barmada S, Kummer T, Harris DA. Mutant prion proteins are partially retained in the endoplasmic reticulum. **J Biol Chem** 2001; 276:42409-21.

Kaneko K, Vey M, Scott M, Pilkuhn S, Cohen FE, Prusiner SB. COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. **Proc Natl Acad Sci** 1997; 94:2333-8.

Kretzschmar HA, Stowring LE, Westaway D, Stubblebine WH, Prusiner SB, DeArmond SJ. Molecular cloning of a human prion protein cDNA. **DNA** 1986; 5:315-324.

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

Liao YC, Tokes Z, Lim E, et al. Cloning of rat "prion-related protein" cDNA. **Lab. Invest.** 1987; 57: 370-374.

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** 1986; 83:6372-6.

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

Magalhaes AC, Silva JA, Lee KS, et al. Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. **J Biol Chem** 2002; 277:33311-8.

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

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

Martins VR, Linden R, Prado MA, 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.

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.

Meyer RK, McKinley MP, Bowman KA, Braunfeld MB, Barry RA, Prusiner SB. Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. **Proc Natl Acad Sci** 1986; 83:2310-4.

Monnet C, Marthiens V, Enslin H, Frobert Y, Sobel A, Mege RM. Heterogeneity and regulation of cellular prion protein glycoforms in neuronal cell lines. **Eur J Neurosci** 2003; 18:542-8.

Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, et al. Signal transduction through prion protein. **Science** 2000; 289:1925-8.

Moussa F. **Participação da interação prion celular-laminina nos processos de adesão, migração e invasão de células tumorais.** São Paulo; 2001. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antonio Prudente].

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

Pan T, Li R, Wong BS, Liu T, Gambetti P, Sy MS. Heterogeneity of normal prion protein in two-dimensional immunoblot: presence of various glycosylated and truncated forms. **J Neurochem** 2002; 81:1092-101.

Petersen RB, Parchi P, Richardson SL, Urig CB, Gambetti P. Effect of the D178N mutation and the codon 129 polymorphism on the metabolism of the prion protein. **J Biol Chem** 1996; 271:12661-8.

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

Prusiner SB. Scrapie prions. **Annu Rev Microbiol** 1989; 43:345-74.

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

Prusiner SB. The prion diseases. **Brain Pathol.** 1998b; 8:499-513.

Riek R, Wider G, Billeter M, Hornemann S, Glockshuber R, Wuthrich K. Prion protein NMR structure and familial human spongiform encephalopathies. **Proc Natl Acad Sci** 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; 71:349-53.

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

Russelakis-Carneiro M, Saborio GP, Anderes L, Soto C. Changes in the glycosylation pattern of prion protein in murine scrapie. Implications for the mechanism of neurodegeneration in prion diseases. **J Biol Chem** 2002; 277:36872-7.

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

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989a. p.1.82-1.84:Protocol II: fresh competent *E.coli* prepared using calcium chloride.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989b. p.16.30-16.36:Introduction of recombinant vectors into mammalian cells.

Scatchard G. The attraction of proteins for small molecules and ions. **Ann NY Acad Sci** 1949; 51:660-72.

Sparkes RS, Simon M, Cohn VH, et al. Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. **Proc Natl Acad Sci** 1986; 83:7358-62.

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

Venstrom KA, Reichardt LF. Extracellular matrix. 2: Role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system. **FASEB J** 1993; 7:996-1003.

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 RMRPS, Velasco TR, 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, et al. Molecular genetics of human prion diseases in Germany. **Hum Genet** 1999; 105:244-52.

Wong NK, Renouf DV, Lehmann S, Hounsell EF. Glycosylation of prions and its effects on protein conformation relevant to amino acid mutations. **J Mol Graph Model** 2000; 18:126-34.

Zahn R, von Schroetter C, Wuthrich K. Human prion proteins expressed in *Escherichia coli* and purified by high-affinity column refolding. **FEBS Lett** 1997; 417:400-4.

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.

ANEXO 1

Surgical outcome in mesial temporal sclerosis correlates with prion protein gene variant

R. Walz, MD, PhD; R.M.R.P.S. Castro, MSc; T.R. Velasco, MD; V. Alexandre Jr., MD; M.H. Lopes; J.P. Leite, MD, PhD; A.C. Santos, MD, PhD; J.A. Assirati Jr., MD; L. Wichert-Ana, MD; V.C. Terra-Bustamante, MD; M.M. Bianchin, MD, PhD; P.C. Maciag, MD, PhD; K.B. Ribeiro, DDS; R. Guarnieri, MD; D. Araújo, MD; O. Cabalero, MD, PhD; R. Moura, MSc; A.C.M. Salim; K. Kindlmann; M.C. Landemberger; W. Marques Jr., MD, PhD; R.M.F. Fernandes, MD, PhD; L.N. Serafini, MD, PhD; H.R. Machado, MD, PhD; C.G. Carlotti Jr., MD, PhD; R.R. Brentani, MD, PhD; A.C. Sakamoto, MD, PhD; and V.R. Martins, PhD

Abstract—Background: Mesial temporal lobe epilepsy related to hippocampal sclerosis (MTLE-HS) is the most common surgically remediable epileptic syndrome. Ablation of the cellular prion protein (PrP^c) gene (*PRNP*) enhances neuronal excitability of the hippocampus in vitro and sensitivity to seizure in vivo, indicating that PrP^c might be related to epilepsy. **Objective:** To evaluate the genetic contribution of *PRNP* to MTLE-HS. **Methods:** The *PRNP* coding sequence of DNA from peripheral blood cells of 100 consecutive patients with surgically treated MTLE-HS was compared to that from a group of healthy controls matched for sex, age, and ethnicity (n = 180). The presence of *PRNP* variant alleles was correlated with clinical and presurgical parameters as well as surgical outcome. **Results:** A variant allele at position 171 (Asn→Ser), absent in controls, was found in heterozygosis (Asn171Ser) in 23% of patients ($p < 0.0001$). The *PRNP* genotypes were not correlated with any clinical or presurgical data investigated. However, patients carrying the Asn171Ser variant had a five times higher chance of continued seizures after temporal lobectomy (95% CI 1.65 to 17.33, $p = 0.005$) than those carrying the normal allele. At 18 months after surgery, 91.8% of patients with the normal allele at codon 171 were seizure free, in comparison to 68.2% of those carrying Asn171Ser ($p = 0.005$). **Conclusions:** The *PRNP* variant allele Asn171Ser is highly prevalent in patients with medically untreatable MTLE-HS and influences their surgical outcome. The results suggest that the *PRNP* variant allele at codon 171 (Asn171Ser) is associated with epileptogenesis in MTLE-HS.

NEUROLOGY 2003;61:●●●-●●●

Fnu

Epilepsy is a health problem with a prevalence of 5 to 10 cases per 1,000 habitants in developed countries, which may be even higher in developing countries.¹ Moreover, it affects people of all ages, races, and socioeconomic backgrounds,¹ and accounts for a worldwide illness burden similar to that of breast cancer in women and lung cancer in men.²

Twenty percent of the epilepsies are medically intractable and mesial temporal lobe epilepsy related to hippocampal sclerosis (MTLE-HS) is the most common form of surgically remediable epileptic syndrome.³ Anterior and mesial temporal lobectomy is a

safe and effective treatment for medically intractable MTLE-HS.³ However, the literature regarding prognostic factors for the surgical outcome of MTLE-HS is often contradictory.⁴ Although prolonged febrile seizures, aberrant brain development, perinatal brain damage, and gene defects have been implicated, the pathophysiologic mechanisms involved in the development of MTLE-HS have not been completely elucidated.^{5,6} An association between MTLE-HS and polymorphism of the interleukin-1a gene has been suggested,⁷ but not confirmed by another group.⁶ Variant alleles of the gene encoding the

See also page XXX

Additional material related to this article can be found on the *Neurology* Web site. Go to www.neurology.org and scroll down the Table of Contents for the November 11 issue to find the title link for this article.

From CIREP, Centro de Cirurgia de Epilepsia (Drs. Walz, Velasco, Alexandre, Leite, Wichert-Ana, Terra-Bustamante, Guarnieri, Araújo, Fernandes, Bianchin, and Sakamoto), Departamento de Neurologia, Psiquiatria e Psicologia Médica (Drs. Walz, Leite, Santos, Marques, and Sakamoto), Departamento de Anatomia e Cirurgia (Drs. Assirati, Machado, and Carlotti), and Departamento de Patologia (Dr. Serafini), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP), Ribeirão Preto; Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer (R.M.R.P.S. Castro, M.H. Lopes, K.B. Ribeiro, R. Moura, K. Kindlmann, and M.C. Landemberger); and Ludwig Institute for Cancer Research (Drs. Maciag, Cabalero, Brentani, and Martins, and A.C.M. Salim), São Paulo Branch, Brazil.

Supported by grants from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) (99/07124-8, 98/143352) and FAEPA-HC.

Received July 24, 2003. Accepted in final form August 13, 2003.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Roger Walz, Centro de Cirurgia de Epilepsia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP), 14.048-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil; e-mail: rogerwalz@hotmail.com.br; or Dr. Vilma R. Martins, Ludwig Institute for Cancer Research, Rua Prof. Antônio Prudente 109 4A, 01509-010 São Paulo, SP, Brazil; e-mail: vmartins@ludwig.org.br

Copyright © 2003 by AAN Enterprises, Inc. 1

GABA(B) receptor 1 (G1465A)⁸ and the prodynorphin gene promoter⁹ have also been associated with temporal lobe epilepsy (TLE).

Cellular prion protein (PrP^c) is a glycoprotein anchored to the outer cell surface whose structure conversion is related to uncommon diseases, i.e., the spongiform encephalopathies.^{10,11} PrP^c is encoded by a single exon of a single gene that is highly expressed, predominantly in neurons, throughout adult life.¹¹ This protein binds copper and has antioxidant properties.^{12,13} In addition, PrP^c interacts with laminin and stress-inducible protein 1 (STI1), mediating neuronal cell adhesion, neurite extension and maintenance, and signal transduction.¹⁴⁻¹⁷

Ablation of the cellular prion protein gene (*PRNP*) enhances neuronal excitability of the hippocampus in vitro¹⁸⁻²⁰ and sensitivity to seizure in vivo,²¹ suggesting that total or partial modification of PrP^c function might be related to epilepsy.²²

We describe the presence of *PRNP* variant alleles in a high proportion of patients with clinically untreatable MTLE-HS and evaluate the association of these variant alleles with clinical, demographic, neurophysiologic, and neuroimaging data, as well as surgical outcome.

Methods. *Patients and controls.* DNA samples were collected from the peripheral blood cells of 100 consecutive patients surgically treated for MTLE-HS during their postoperative follow-up at the Ribeirão Preto Epilepsy Surgery Program between September 2000 and April 2002. The surgical treatment was indicated because seizures occurred at least monthly despite adequate use of anticonvulsants.

The inclusion criteria were as follows³: 1) seizure semiology consistent with MTLE, usually with epigastric, autonomic, or psychic auras, followed by behavioral arrest, progressive clouding of consciousness, orolimentary and manual automatism, and autonomic phenomena; 2) anterior and mesial temporal interictal spikes; 3) no lesion other than atrophy and increased signal in hippocampal formation identified by MRI; 4) histopathologic examination compatible with hippocampal sclerosis; 5) presurgical investigation compatible with unilateral seizure onset; 6) absence of dual pathology that could be identified by available methods (clinical, electrophysiologic, and neuroimaging methods and histopathology); 7) at least 1 year of postoperative follow-up.

The exclusion criteria were as follows³: 1) focal neurologic abnormalities on physical examination; 2) generalized or extratemporal EEG spikes; 3) marked cognitive impairment on neuropsychological testing.

The control group included 180 healthy adults without a previous history of neurologic or psychiatric disease selected during the same period when we collected the cases. They were individuals accompanying patients from the internal medicine outpatient clinic of the same hospital as the patients. Similarly to the patients, all controls came from the same region of the state of São Paulo, were not related one to another, and had no personal or family signs or symptoms suggesting any type of spongiform encephalopathy. Patients and controls came from white (European Brazilians) and nonwhite (African Brazilians) backgrounds. There were no Amerindians or Asians in our sample.

Our research ethics committee approved the study, and informed consent was obtained from controls, patients, or persons legally responsible for them.

Clinical parameters and presurgical evaluation of patients. Clinical characteristics included sex, ethnicity, age at surgery, age at the onset of epilepsy (recurrent seizures), duration of epilepsy, a positive history for an initial precipitating insult (IPI), epilepsy duration until surgery, monthly complex partial seizure frequency impairing awareness in the year before surgery, and side of surgery. A positive family history of epilepsy was defined

when at least one first-degree relative reported at least two spontaneous seizures during his or her life.

Presurgical evaluation was performed by an experienced multidisciplinary team and included a detailed clinical history and neurologic examination, interictal and ictal video-EEG analysis, structural and functional imaging, psychiatric evaluation, neuropsychological testing, and, when appropriate, the intracarotid amobarbital test (Wada test) for memory and speech representation.²³ Detailed methods of neuroimaging and video-EEG analysis are available as supplementary data at www.neurology.org.

Surgical procedure and postoperative follow-up. The surgical approach was similar for all patients. A neurosurgeon experienced in surgery for epilepsy resected a maximum of 4 to 5 cm of the anterior lateral temporal lobe. Mesial resection included the amygdala and at least 1 to 3 cm of the anterior hippocampus (most commonly, 3.0 cm).

After surgery, patients were treated with the same antiepileptic drugs (AED) that they received before surgery and the dose was adjusted to reduce side effects and maintain the necessary serum levels. Patients were also instructed to maintain the medication dosage during the first 3 years after surgery even if they were free of seizures.

The outcome of surgery was defined on the basis of seizure status determined by outpatient clinical interviews. Patients were categorized as seizure free if they experienced no complex partial seizures or generalized tonic-clonic seizures after surgery. Nondisabling auras (Engel class Ib) were not considered seizures in our analysis. Patients who presented a single complex partial or a generalized tonic-clonic seizure clearly related to AED withdrawal (Engel class Id) or during the first month after surgery (perioperative period) but remained well controlled with adequate use of medication were considered seizure free.

A postoperative MRI was carried out 6 to 12 months after surgery. Surgical resection was considered satisfactory if it included both the head and body of the hippocampus, and unsatisfactory if no more than half of the hippocampus was resected.

Seizure outcome and postoperative MRI status were assessed by experienced epileptologists and radiologists who were blind to all clinical parameters, presurgical and surgical data, and the genetic analysis.

PRNP analysis. DNA was extracted from a 3 mL aliquot of whole blood using the Puregene Genomic DNA Isolation Kit (Gentra Systems). Primers (Life Technologies, S.P., Brazil) were designed to amplify two different overlapping fragments of the *PRNP* open reading frame (ORF) (Gene Bank: D-00015): fragment 1—nucleotides 77 to 497 (421 bp), forward: 5' ATGCTGGT-TCTCTTTGTG 3', reverse: 5' AACGGTCCATAGTCACTGC 3', and fragment 2—nucleotides 307 to 870 (563 bp), forward: 5' TCATGGTGGTGGCTGGGGTCA 3', reverse: 5' CGCCTCCCT-CAAGCTGGAAAA 3'. Amplification reactions were carried out using touchdown PCR. The PCR products were sequenced with the DYEnamic ET terminator sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech) according to manufacturer's instructions using an ABI Prism-377 apparatus (Perkin-Elmer). We also analyzed *PRNP* ORF using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) of PCR-amplified products using forward and reverse primers for fragment 1 (described above) and the forward (5' ATCATACTTTTCGGCAGT 3') and reverse (5' CTCCCTCAAGCTGGAAAAAGA 3') primers for the second half of the *PRNP* ORF, nucleotides 463 to 867. A DNasep column (Transgenomic, CA) was used and the parameters of gradient and flow rate adjusted by the Wavemaker system control software (Transgenomic). PCR products from the complete coding region of *PRNP* obtained using the forward primer of fragment 1 and reverse primer of fragment 2 described above were digested with *PvuII*, *NspI*, and *BbvI* (Amersham Pharmacia Biotech and New England Biolabs) to confirm the sequence at codons 117, 129, and 171.²⁴⁻²⁶ In addition, due to the experimental difficulty in defining the exact position of the alteration within codon 117, a GC-rich DNA sequence,²⁷ we cloned (TA-cloning kit, Invitrogen) the PCR products of the complete coding region of *PRNP* from DNA from all patients and controls who presented an alteration at this codon.

Statistical analysis. Differences in sex and ethnicity distribution between cases and controls were analyzed by the two-tailed Fisher exact test. The proportions of cases and controls bearing a given *PRNP* genotype were ascertained. The magnitude of association between *PRNP* alleles and the occurrence of MTLE-HS was

Table 1 Frequency of *Prnp* alleles in patients and controls

| Residue position | Genotype | Exposed (%) | | Crude | | Adjusted§ | |
|------------------|---------------------------|---------------------|------------------|------------------|----------|------------------|---------|
| | | Controls n = 180 | Cases n = 100 | OR (95% CI) | p Value* | OR (95% CI) | p Value |
| 117 | Ala/Ala | 173 (96.1) | 91 (91.0) | 1.00 | | 1.00† | |
| | Ala/Ala _{silent} | 7 (3.9) | 9 (9.0) | 2.44 (0.88–6.78) | 0.08 | 2.23 (0.78–6.38) | 0.13 |
| 129 | Met/Met | 104 (57.8) | 57 (57.0) | 1.00 | | 1.00‡ | |
| | Met/Val | 68 (37.8) | 32 (32.0) | 0.89 (0.50–1.46) | 0.57 | 0.84 (0.49–1.44) | 0.52 |
| | Val/Val | 8 (4.4) | 11 (11.0) | 2.51 (0.95–6.59) | 0.06 | 2.35 (0.88–6.27) | 0.08 |
| 171 | Asn/Asn | 180 (100.0) | 77 (77.0) | 1.00 | | — | — |
| | Asn/Ser | 0 (0) | 23 (23.0) | Undefined | <0.0001 | NA | NA |
| Octarepeat | R12234 | 170 (94.4) | 95 (95.0) | 1.00 | | 1.00 | |
| | R12234/R1234 | 10 (5.6) | 5 (5.0) | 0.84 (0.28–2.69) | 0.84 | 0.99 (0.33–3.03) | 0.99 |
| | R1234 | 0 (0) | 0 (0) | — | — | — | — |

* Binary Logistic Regression.

† Multiple logistic regression adjusted for gender, ethnicity, codon 129 distribution, and presence of the octarepeat deletion.

‡ Multiple logistic regression adjusted for gender, ethnicity, genotypes at position 117, and presence of octarepeat deletion.

§ Hosmer and Lemeshow goodness.

NA = non-applicable of fit, $p = 0.897$.

measured by the OR and respective 95% CI. Crude and adjusted OR were estimated by unconditional logistic regression using the statistical program SPSS version 10.0 (Chicago, IL). To examine the independent effect of each genotype, OR were also derived after additional adjustment for codons 117 and 129. A p level < 0.01 was considered to be statistically significant.

Association between a certain *PRNP* genotype and the clinical and presurgical evaluation data of patients was also determined. Analyses were done using the Mann-Whitney U test for continuous variables and the two-tailed Fisher exact test for categorical ones.

The Kaplan-Meier method was used to establish the cumulative probability of event-free survival. Differences between groups were determined by the log-rank test. The Cox proportional hazards model was applied to identify independent risk factors for having seizures after surgery. Only variables with $p \leq 0.25$ (by the log-rank test) were included in the final multiple Cox model.

For the statistical analysis of clinical and presurgical evaluation results the level of significance was set at $p < 0.05$. Our study fulfills the fundamental requisites when performing genetic investigations of complex multietiologic diseases.²⁸

Results. The sex and ethnic distribution were similar in patients and controls. Men represented 46% ($n = 84$) of the controls and 44% ($n = 44$) of the patients ($p = 0.7$). European Brazilians represented 86% ($n = 155$) of the controls and 88% ($n = 88$) of the patients ($p = 0.7$). The mean age of patients and controls was 36.2 (SD \pm 10.7) and 36.5 (SD \pm 10.5) years.

PRNP variant alleles were confirmed using three different experimental approaches: DNA sequencing, DHPLC, and endonuclease digestion (for codons 117, 129, and 171), and their frequencies in patients and in controls are shown in table 1. Two well-described *PRNP* polymorphic sites were present in our population. The single octapeptide repeat (24 bp) deletion (R12234)²⁹ was present in heterozygosity (R12234/R1234) in 5.0% of the patients and 5.6% of the controls ($p = 0.84$, OR = 0.89, 95% CI 0.28 to 2.69). The second polymorphic site was at codon 129 (Met \rightarrow Val), which is located at the first PrP^c α -helix and is important for protein conformation.³⁰ The common polymorphism at this codon appears to act as a genetic susceptibility factor

in familial, sporadic, iatrogenic, and new variant Creutzfeldt-Jakob disease (CJD).³¹ In our population, heterozygous samples (Met/Val) at codon 129 had a nonsignificant decrease in OR for epilepsy ($p = 0.57$, OR = 0.89, 95% CI 0.50 to 1.46), whereas homozygous Val/Val showed a trend toward the opposite effect ($p = 0.06$, OR = 2.51, 95% CI 0.95 to 6.59), as compared to Met/Met individuals (see table 1). The octapeptide repeat deletion and codon 129 genotype frequencies in our controls were similar to those described in white populations.^{29,31}

Another polymorphic site at codon 117 where a GCA is altered to GCT without an amino acid change (Ala117Ala_{silent}) was present in heterozygosity in 7 (3.9%) of our controls and in 9 (9.0%) of the patients. This variant allele has been described in 5 to 10% of the normal white population,²⁶ close to the percentage observed in our cases and controls. A nonsignificant association with epilepsy was observed for those individuals carrying the Ala117Ala_{silent} allele ($p = 0.08$, OR = 2.44, 95% CI 0.88 to 6.78).

We additionally verified the presence of a variant allele in codon 171 (Asn \rightarrow Ser), previously described in a familial form of atypical psychosis.³² The Asn/Ser heterozygous genotype was found in 23 (23.0%) of the patients and was absent in the control group ($p < 0.0001$) (see table 1), whereas the Ser/Ser genotype was not observed in our samples. This variant allele was first described as a rare polymorphism²⁴ and very recently Colling's group was unable to detect it in a total of 944 tested individuals from East Asian, South Asian, Pacific, South American, and European populations.³³ Conversely, its frequency is around 5 to 8% in some African or African descendant populations (Cameroon and Jamaica).³⁴ Thus, the absence of this variant allele in our controls is in accordance with the literature and ethnicity is not a bias because more than 80% of both patients and controls are European Brazilians.

The distribution of Asn/Ser heterozygous alleles in pa-

Table 2 Surgical outcome according to *Prnp* genotype

| <i>Prnp</i> variants | All | | Overall surgical outcome | | | Crude HR to remain with seizures | 95% CI | <i>p</i> Value |
|---------------------------|------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------------|----------------|----------------------------------|------------|----------------|
| | Patients n = 98 (%) | Seizure-free n = 85 (%) | Seizure n = 13 (%) | Cumulative % of seizure-free | <i>p</i> Value | | | |
| Position 117 | | | | | | | | |
| Ala/Ala | 89 (90.8) | 77 (90.6) | 12 (92.3) | 86.6 | | 1.00 | | |
| Ala/Ala _{silent} | 9 (9.2) | 8 (9.4) | 1 (7.7) | 87.5 | 0.64 | 0.78 | 0.10–5.98 | 0.81 |
| Position 129 | | | | | | | | |
| Met/Met | 56 (57.1) | 49 (57.6) | 7 (53.8) | 87.2 | | 1.00 | | |
| Met/Val | 31 (31.6) | 27 (31.8) | 4 (30.8) | 86.3 | | 1.04 | 0.30–3.56 | 0.95 |
| Val/Val | 11 (11.2) | 9 (10.6) | 2 (15.4) | 79.5 | 0.86 | 1.51 | 0.31–7.29 | 0.60 |
| Position 171 | | | | | | | | |
| Asn/Asn | 76 (77.6) | 70 (82.4) | 6 (46.2) | 91.8 | | 1.00 | | |
| Asn/Ser | 22 (22.4) | 15 (17.6) | 7 (53.8) | 68.2 | 0.005 | 4.12 | 1.38–12.77 | 0.01 |
| Octarepeat | | | | | | | | |
| R12234 | 93 (94.9) | 80 (94.1) | 13 (100.0) | 86.2 | | 1.00 | | |
| R12234/R1234 | 5 (5.1) | 5 (5.9) | 0 (0.0) | 100.0 | 0.41 | NA | — | — |

tients was not changed by genotypes at positions 117 or 129 or octapeptide repeat deletion as verified by stratified analysis, suggesting that this variant allele might be independently associated with epilepsy (data not shown).

OR were also derived after additionally controlling for the effect of genotypes at positions 117 and 129, the presence of the octarepeat deletion, sex, and ethnicity (see table 1). Neither the Met/Val genotype at position 129 nor the presence of the octarepeat deletion was found to be associated with MTLE-HS, whereas a trend for a higher frequency of Val/Val genotypes at position 129 was observed in the patients ($p = 0.08$, adjusted OR 2.35, 95% CI 0.88 to 6.27). Individuals carrying the silent variant allele Ala/Ala_{silent} at position 117 also disclosed a nonsignificantly increased OR for epilepsy ($p = 0.13$, adjusted OR 2.23, 95% CI 0.78 to 6.38). Independent effects of genotypes at position 171 could not be evaluated.

No other *PRNP* variant alleles besides those described here were found in cases or controls. All genotype distributions studied were in good agreement with Hardy-Weinberg equilibrium (data not shown).

Because all our patients were surgically treated we were able to perform histopathologic examinations of resected material and no spongiform degeneration was found in brain tissue.

No differences were found between *PRNP* variant alleles and the wild type genotype ($p \geq 0.15$) with respect to the clinical, demographic, and presurgical data investigated. There was a nonsignificant increased OR ($p = 0.44$, OR = 1.67, 95% CI 0.6 to 4.2) for positive family history of epilepsy in those patients with the variant allele Asn171Ser. For more details, see supplementary data at www.neurology.org.

The postoperative seizure outcome according to patient *PRNP* genotype is shown in tables 2 and 3; data related to patient characteristics can be found in supplementary tables E-1 and E-2 (available at www.neurology.org). Two patients who presented surgical complications that could affect seizure outcome (meningitis and hemorrhagic

stroke) were excluded from this analysis. The mean time of postoperative patient follow-up was 3.1 years (SD ± 1.3 , range 1.0 to 7.5 years). Of the 98 patients, 85 (86.7%) remain seizure free after surgery. This is in agreement with more recent data suggesting that, with careful selection of patients, a good seizure outcome may be achieved in approximately 90% of cases.^{4,35}

The seizure outcome was not correlated with any preoperative clinical, neurophysiologic, or neuroimaging data (see table 3 and supplementary data [www.neurology.org]). Variant alleles at positions 117 ($p = 0.64$) and 129 ($p = 0.86$) and the octarepeat deletion ($p = 0.41$) were also not correlated with surgical outcome (see table 2). However, the hazard ratio to continue to have seizures after temporal lobectomy in those patients carrying the Asn171Ser variant allele was more than four times higher than in those with the normal allele ($p = 0.01$, 95% CI 1.38 to 12.77) (see table 2). After an 18-month follow-up, the cumulative probability of being seizure free was 91.8% for patients with normal alleles at codon 171 (Asn171Asn) and only 68.2% for those with the Asn171Ser variant allele in heterozygosity ($p = 0.005$) (figure). After adjustment for ethnicity, history of IPI, presurgical MRI findings, interictal spikes, and age at epilepsy onset (see table 3), the risk for surgical failure in those patients with the variant allele at codon 171 remained high ($p = 0.005$, adjusted HR = 5.35, 95% CI 1.65 to 17.33). Positive history of IPI, bilateral findings on the presurgical MRI, presence of bilateral interictal spikes, and early age at epilepsy onset were not independently associated with a worse surgical outcome in our sample. Independent effects of ethnicity could not be evaluated.

One patient showing the variant allele at codon 171 had a generalized seizure in the first week after surgery, and became well during the next 2-year follow-up. Among the 15 seizure-free patients showing the abnormal variant allele at codon 171, one had a complex partial seizure related to AED withdrawal (Engel Id), in comparison with 8 of the 70 showing the normal allele ($p = 1.0$). Patients with AED

AQ: 1

T2 T3

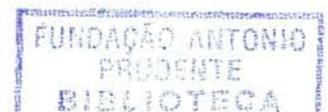


Table 3 Independent effect of the *Prnp* variant allele on the surgical outcome

| Variable | Crude HR | 95% CI | Adjusted HR* | 95% CI | p Value |
|------------------------|----------|------------|--------------|------------|---------|
| History of IPI | | | | | |
| No | 1.00 | | 1.00 | | |
| Yes | 1.93 | 0.65–5.73 | 0.48 | 0.15–1.57 | 0.23 |
| MRI findings | | | | | |
| Unilateral | 1.00 | | 1.00 | | |
| Bilateral | 2.53 | 0.53–11.4 | 1.75 | 0.36–8.40 | 0.48 |
| Interictal spikes | | | | | |
| Unilateral | 1.00 | | 1.00 | | |
| Bilateral | 2.45 | 0.67–9.11 | 1.58 | 0.38–6.45 | 0.52 |
| Age at epilepsy onset | | | | | |
| After the first decade | 1.00 | | 1.00 | | |
| First decade | 2.36 | 0.72–7.65 | 2.03 | 0.50–8.36 | 0.32 |
| Position 171 | | | | | |
| Asn/Asn | 1.00 | | 1.00 | | |
| Asn/Ser | 4.12 | 1.38–12.77 | 5.35 | 1.65–17.33 | 0.005 |

* Hazard-ratio to continue to have with seizure after surgery adjusted for ethnicity, history of IPI, pre-surgical MRI findings, IS, and age at epilepsy onset.

† Interictal spikes were not quantified in three patients.

IPI = initial precipitating insult.

withdrawal became well controlled with an adequate AED scheme during a mean follow-up of 3.4 years (range 1.7 to 5.5 years).

All patients who underwent semi-invasive investigation with foramen ovale electrodes had the Asn171Asn genotype.

The eight cases with bilateral MRI findings presented

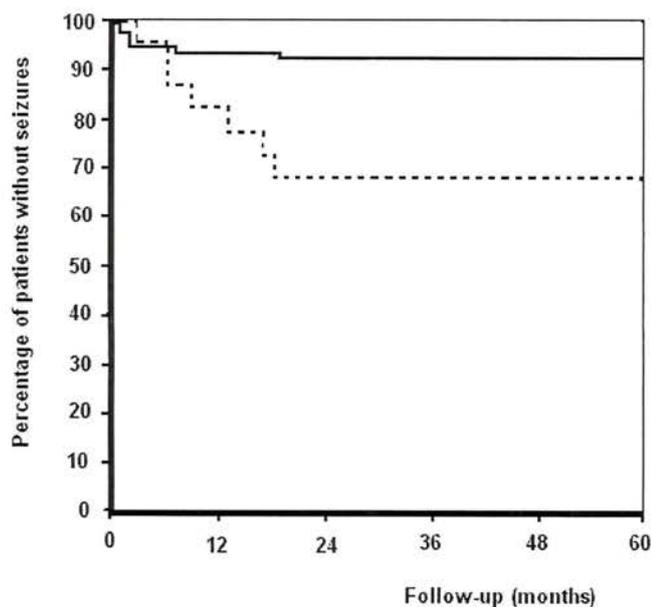


Figure. Kaplan-Meier event-free survival curves comparing the cumulative percentages of patients who were free of seizures according to the genotype at codon 171. There were more seizure-free patients with the Asn171Asn allele than patients with the Asn171Ser variant ($p = 0.005$ by log-rank test). Genotype, \square = Asn171Asn; $-\ - -$ = Asn171Ser.

symmetrically increased signals in the hippocampus but asymmetric hippocampal atrophy, which was coincident with the inferred epileptogenic zone (EZ). One patient with bilateral hippocampal atrophy was excluded from the outcome analysis due to postoperative meningitis. Finally, among the seven patients with bilateral hippocampal atrophy, all the seizure-free patients ($n = 5$) presented the Asn171Asn genotype; the others who persisted with seizures ($n = 2$) had the Asn171Ser variant allele ($p = 0.048$).

Discussion. Using a candidate gene approach, we found that the *PRNP* variant Asn171Ser is highly associated with medically untreatable MTLE-HS and independently influences the postsurgical seizure outcome of patients.

The association between *PRNP* and epilepsy and especially with MTLE-HS is plausible and supported by previous in vivo and in vitro experimental data. Mice devoid of *PRNP* presented a higher sensitivity to seizures chemically induced by different agents in four different protocols.²¹ This hyperexcitability can be related or attributed to the interaction of at least five distinct abnormalities reported in those animals: 1) disrupted Ca^{+2} -activated K^{+} currents, with loss of I_{HAP} conductance in the hippocampus¹⁸; 2) abnormal GABA-A inhibition in the hippocampus¹⁹; 3) mossy fiber reorganization in the hippocampus³⁶; 4) higher levels of oxidative stress in the neocortex and hippocampus¹³; and 5) changes in ectonucleotidases in both hippocampus and neocortex.³⁷ Furthermore, postnatal PrP^c knockout mice showed a significant reduction of after hyperpolarization potentials in the hippocampus.²⁰ These findings suggest that altered PrP^c functions could contribute to modifications of the intrinsic physiology of neurons and the neural network related to mechanisms of epileptogenesis,

particularly in the mesial temporal lobe structures.²² The exact role of *PRNP* variant alleles in PrP^c functions and in MTLE-HS remains to be determined. Position 171 is close to the site where PrP^c interacts with laminin, mediating neuritogenesis,¹⁵ which is closely related to neuroplasticity and epileptogenesis.²²

It would be important to establish why modifications in an abundantly expressed neuronal protein would affect focal epileptogenicity. A possible explanation could be that changes in PrP^c function (in humans) or the absence of PrP^c (in knockout mice) do not cause epilepsy but induce a proepileptogenic state that, in association with other inborn (genetic or developmental) or acquired (lesion) abnormalities (including a surgical scar), predisposes to temporal lobe epileptogenesis. It was surprising that the *PRNP* variant allele Asn171Ser does not correlate with presurgical variables; however, this finding is in agreement with the lack of association between those already studied presurgical variables and surgical outcome. Association between variant alleles, seizure semiology, and ictal electrophysiology patterns in MTLE-HS or even in other epileptic syndromes is an important point to be investigated in the future.

Although nonsignificant, the trend toward an association between epilepsy and the variant allele Val129Val is still interesting. The critical localization of amino acid 129 at the first PrP^c α -helix renders it important for protein conformation.³⁰ We speculate that the amino acid composition at this position might be directly related to protein function or interfere with other PrP^c domains with biologic activity.

The *PRNP* variant allele at codon 171 was found in many but not all patients with epilepsy. In addition, despite the association of the Asn171Ser variant allele with surgical failure, many patients who presented the variant allele became seizure free. These findings suggest that *PRNP* contributes only partially to the penetrance of MTLE-HS and its surgical outcome, possibly providing a genetic liability for developing the condition. However, only those individuals whose liability crosses the threshold would actually be at risk. In fact, it is well known that epilepsies in general are caused by the interaction of genetic and environmental factors. In these cases, as for other non-mendelian diseases, the combination of susceptibility alleles across the genome that is necessary for disease development provides only a risk of developing the disorder.^{38,39} The lack of association between familial history of epilepsy or seizures and the variant alleles also suggests that a complex pattern of inheritance is involved.⁸

The *PRNP* variant allele Asn171Ser is highly prevalent in patients with untreatable MTLE-HS and influences their surgical outcome, suggesting that *PRNP* modifications may play a role in the process of epileptogenesis of the most common type of surgically remediable epileptic syndrome.³ If confirmed by studies in independent patient population

samples, determination of *PRNP* sequences could improve the diagnosis and identification of high-risk groups, provide a basis for genetic counseling, and possibly lead to new therapeutic targets for the prevention and treatment of MTLE-HS.

References

- Hauser WA. Incidence and prevalence. In: Engel J, Pedley TA, eds. *Epilepsy: a comprehensive textbook*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998;47-57.
- Kale R. Bringing epilepsy out of the shadows. *BMJ* 1997;315:2-3.
- Engel J, Jr. Surgery for seizures. *N Engl J Med* 1996;334:647-652.
- McIntosh AM, Wilson SJ, Berkovic SF. Seizure outcome after temporal lobectomy: current research practice and findings. *Epilepsia* 2001;42:1288-1307.
- Berkovic SF, Jackson GD. The hippocampal sclerosis whodunit: enter the genes. *Ann Neurol* 2000;47:557-558.
- Buono RJ, Ferraro TN, O'Connor MJ, et al. Lack of association between an interleukin 1 beta (IL-1beta) gene variation and refractory temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2001;42:782-784.
- Kanemoto K, Kawasaki J, Miyamoto T, Obayashi H, Nishimura M. Interleukin (IL)1beta, IL-1alpha, and IL-1 receptor antagonist gene polymorphisms in patients with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 2000;47:571-574.
- Gambardella A, Manna I, Labate A, et al. GABA(B) receptor 1 polymorphism (G1465A) is associated with temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2003;60:560-563.
- Stogmann E, Zimprich A, Baumgartner C, Aull-Watschinger S, Holtt V, Zimprich F. A functional polymorphism in the prodynorphin gene promoter is associated with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 2002;51:260-263.
- Aguzzi A, Weissmann C. Prion research: the next frontiers. *Nature* 1997;389:795-798.
- Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13363-13383.
- Brown DR. Prion and prejudice: normal protein and the synapse. *Trends Neurosci* 2001;24:85-90.
- Klamt F, Dal-Pizzol F, Conte da Frota MJ, et al. Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. *Free Radic Biol Med* 2001;30:1137-1144.
- Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J* 2002;21:3317-3326.
- Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, et al. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Brain Res Mol Brain Res* 2000;76:85-92.
- Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Martins VR, Jay DG, Brentani RR. Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. *FEBS Lett* 2000;482:257-260.
- 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;21:3307-3316.
- Collinge SB, Collinge J, Jefferys JG. Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca(2+)-activated K+ 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;370:295-297.
- Mallucci GR, Ratte S, Asante EA, et al. Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *EMBO J* 2002;21:202-210.
- Walz R, Amaral OB, Rockenbach IC, et al. Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. *Epilepsia* 1999;40:1679-1682.
- Walz R, Castro RM, Velasco TR, et al. Cellular prion protein: implications in seizures and epilepsy. *Cell Mol Neurobiol* 2002;22:249-257.
- Velasco TR, Wichert-Ana L, Leite JP, et al. Accuracy of ictal SPECT in mesial temporal lobe epilepsy with bilateral interictal spikes. *Neurology* 2002;59:266-271.
- 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.
- Windl O, Giese A, Schulz-Schaeffer W, et al. Molecular genetics of human prion diseases in Germany. *Hum Genet* 1999;105:244-252.
- Wu Y, Brown WT, Robakis NK, et al. A PvuII RFLP detected in the human prion protein (PrP) gene. *Nucleic Acids Res* 1987;15:3191.
- 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;19:116-121.

28. Bird TD, Jarvik GP, Wood NW. Genetic association studies: genes in search of diseases. *Neurology* 2001;57:1153–1154.
29. Palmer MS, Mahal SP, Campbell TA, et al. Deletions in the prion protein gene are not associated with CJD. *Hum Mol Genet* 1993;2:541–544.
30. Riek R, Wider G, Billeter M, Hornemann S, Glockshuber R, Wuthrich K. Prion protein NMR structure and familial human spongiform encephalopathies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:11667–11672.
31. Zimmermann K, Turecek PL, Schwarz HP. Genotyping of the prion protein gene at codon 129. *Acta Neuropathol (Berl)* 1999;97:355–358.
32. Samaia HB, Mari JJ, Vallada HP, Moura RP, Simpson AJ, Brentani RR. A prion-linked psychiatric disorder. *Nature* 1997;390:241.
33. Mead S, Stumpf MP, Whitfield J, et al. Balancing selection at the prion protein gene consistent with prehistoric kurulike epidemics. *Science* 2003;300:640–643.
34. 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.
35. Kim R, Spencer D. Surgery for mesial temporal sclerosis. In: Lüders HO, Comair YG, eds. *Epilepsy surgery*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003;643–652.
36. Colling SB, Khana M, Collinge J, Jefferys JG. Mossy fibre reorganization in the hippocampus of prion protein null mice. *Brain Res* 1997;755:28–35.
37. Pereira GS, Walz R, Bonan CD, et al. Changes in cortical and hippocampal ectonucleotidase activities in mice lacking cellular prion protein. *Neurosci Lett* 2001;301:72–74.
38. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996;273:1516–1517.
39. Todd JA. Interpretation of results from genetic studies of multifactorial diseases. *Lancet* 1999;354(suppl 1):15–16.