UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

**Interação da proteína prion celular com laminina e STI-1
e suas possíveis implicações biológicas**

SILVIO MARQUES ZANATA

Orientadora: Dra. Vilma Regina Martins

São Paulo
18/02/2002

87
ti

BIBLIOTECA

INSTITUTO DE QUÍMICA

Universidade de São Paulo

20.522

DEDALUS - Acervo - CQ

30100004801

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Z27i Zanata, Silvio Marques
Interação da proteína prion celular com laminina e STI-1 e
suas possíveis implicações biológicas / Silvio Marques Zanata. --
São Paulo, 2002.

1v. (várias paginações)

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador : Martins, Vilma Regina

1. Matriz extracelular : Biologia 2. Biologia celular 3.
Neurônio : Histologia humana I. T. II. Martins, Vilma
Regina, orientador.

574.87 CDD

**“Interação da Proteína Prion Celular com
Laminina e STI-1 e suas Possíveis
Implicações Biológicas”**

SILVIO MARQUES ZANATA

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências –
Área: Bioquímica.

Aprovado por:

Profa. Dra. VILMA REGINA MARTINS
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. HUGO AGUIRRE ARMELIN
IQ – USP

Profa. Dra. BETTINA MALNIC
IQ – USP

Prof. Dr. RICARDO DELLA COLETTA
FOP - UNICAMP

Prof. Dr. JOSÉ ORIVALDO MENGELE JUNIOR
ICB - USP

SÃO PAULO
18 DE FEVEREIRO 2002.

“Uma vida sem investigação não é digna de ser vivida”

Platão, Apologia de Sócrates

PARA

MINHA ESPOSA LIA

A MEUS PAIS MARIA HELENA E NORIVAL

A MINHA ORIENTADORA VILMA REGINA MARTINS

Meus sinceros agradecimentos

À Vilma, pela confiança em mim depositada, pelas inúmeras oportunidades concedidas, pela amizade e pelo comprometimento em realmente ensinar seus alunos, proporcionando assim uma sólida formação científica.

Ao professor Brentani, fonte de sabedoria, pela oportunidade de ter trabalhado sob sua égide e inspiração.

Aos amigos Adriana Mercadante, Regina Nomizo, Edgard Graner, Orestes Vicente Forlenza e Silvio Veiga pela amizade sincera e pela contribuição na minha formação científica.

A todos os amigos do laboratório 306: Adriana Freitas, Ana Lúcia, Angelita, Fátima, Glaucia, Kil, Marilene, Michele, Priscila, Ricardo, Rosa e Wanda.

Aos professores Bayardo Torres, Bettina Malnic, Bianca Zingales, Célia Regina Cameiro Whitaker, Elisabeth de Oliveira, Hugo Armelin, Humberto Torloni, José Oriovaldo Mengele Júnior, Luiza Lina Villa, Luis Fernando Lima Reis, Mari Sogayar, Maria Aparecida Juliano, Maria Julia Manso Alves, Ohara Augusto, Paulo Teng Am Sumoji, Peter Tiedelman, Ricardo Della Colleta, Roger Chammas, Sandro José de Souza, Shirley Schreier, pela ajuda intelectual ou material em algum momento durante a execução desta tese.

Aos demais colegas: Suely, Carlinhos, Miúki, Eudes, Roseli, Sampaio, Luis, Zila, Lionel, João, José, Chamberlein, Isabel, Lea, Edilberto, Raquel e membros dos demais laboratórios.

Aos funcionários da administração, serviços gerais e manutenção pela presteza e rapidez nos mais diversos serviços.

Aos professores Massucato, Hugo, Colli, Gil, Varran, Junior, Teng, Peter, Shuck, Thomaz, Adnei, os quais me ensinaram que não só ciência faz bem à saúde como praticar esportes também.

Aos amigos de longos anos Telma (e seu pais), Flávio, Léo, Emerson (e Raquel), Raphael (e Mieko), pelo companherismo e dedicação.

Ao professor Andreas Püschel, por ter me recebido em seu laboratório no Max-Planck Institut für Hirnforschung, Frankfurt am Main, Alemanha, e aos colegas do mesmo laboratório pelo aprendizado e divertidas partidas de totó.

Aos meus pais, que moldaram o meu caráter, devo tudo e considero a educação que me foi dada o maior investimento que puderam ter feito por mim.

Aos meus sogros, Emika e Ysao, por me tratarem como filho e confiarem em mim e meu cunhado Jun pela amizade e iguarias japonesas.

A Sra. Marli por colocar meu pai na “linha” e pelas tortas salgadas após os longos dias de trabalho no laboratório.

Ao meu irmão Junior pela amizade fraternal e incentivo ao longo de todos estes anos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À FAPESP, principal financiadora deste trabalho.

Às agências CAPES, Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD) e a Max-Planck Gesellschaft pelas bolsas concedidas durante o tempo de permanência na Republica Federal da Alemanha.

Índice

Abreviaturas	1
Resumo	2
Summary	3
Prefácio	4
Introdução	6
Doenças Neurodegenerativas envolvendo prions	6
Prions	6
Propriedades do PrPc/PrPsc	8
A proteína PrPc	9
A função normal do PrPc	9
Proteínas ligantes do PrPc	11
A laminina	12
A proteína receptora de PrPc de 66 kDa	12
Objetivos	14
Materiais e métodos	15
Materiais	15
Métodos empregados no estudo da relevância biológica da interação PrPc-Ln	17
Caracterização da proteína ligante/receptor de PrPc de 66 kDa	19
Resultados	25
Discussão	44
Posfácio	58
Conclusões	61
Referências Bibliográficas	62
Curriculum Vitae	78
Anexos	79

Abreviaturas

BSA	albumina sérica bovina
Cf.	certificar
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propane-sulfonate
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DTT	Ditiotreitol
E16	Embriões com 16 dias de gestação
EDTA	etilenodiamino tetraacetato
EHS	sarcoma murino Engelbreth-Holm-Swarm
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Fração 55%	fração protéica de 55% de sulfato de amônio de extrato total de cérebros de camundongos
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEPES	N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfonato]
IgG	Imunoglobulina do tipo G
IPG	Immobilized pH gradient
Kd	Constante de dissociação no equilíbrio
Ln	laminina
NEM	N-Etilmaleimida
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PMSF	fenilmetilsulfonil fluoreto
PrPc	proteína prion celular
PrPsc	proteína prion "scrapie"
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
STI-1	Stress Inducible Protein -1
Tris	tris (hidroximetil)amino metano

Resumo

A conversão da proteína príon celular (PrPc) em sua isoforma anormal PrPsc está associada a uma série de doenças neurodegenerativas, genericamente designadas por doenças priônicas. Embora a literatura tenha enfatizado o estudo do PrPsc e o mecanismo de propagação das doenças de príon, pouco tem sido feito para o entendimento do papel fisiológico do PrPc. Em 1997 nosso grupo descreveu um receptor/ligante para o PrPc utilizando o princípio da hidropaticidade complementar. Neste trabalho isolamos e identificamos este ligante de PrPc como sendo a STI-1 (Stress Inducible Protein-1). *In vitro*, a STI-1 interage com o PrPc de maneira específica, saturável e com alta afinidade ($K_d=8 \times 10^{-8} \text{M}$). Paralelamente, mostramos que o PrPc se liga ao domínio RNIAEIIKDI da laminina (Ln) ($K_d=2 \times 10^{-8} \text{M}$). O bloqueio de PrPc na superfície de neurônios hipocampais de embriões de ratos e camundongos, reduziu a neuritogênese induzida por Ln. Além disso, neurônios provenientes de animais PrP^{-/-} são incapazes de estender neuritos sobre o peptídeo RNIAEIIKDI, sugerindo que o PrPc é o único receptor celular para este domínio da Ln. Estes dados indicam que a interação PrPc-Ln seja relevante nos fenômenos de adesão e diferenciação neuronais. A caracterização das interações PrPc-Ln e PrPc-STI-1 representa contribuições importantes para a elucidação do papel biológico do PrPc.

Summary

Conversion of the cellular prion protein (PrPc) to its abnormal isoform PrPsc is associated with some neurodegenerative and fatal diseases called prion diseases. Although the literature has been emphasizing the mechanism of PrPsc conversion and illness propagation, little attention has been given to the PrPc physiological role. In 1997, our group described a PrPc receptor/ligand based on the complementary hydropathy theory. Herein, we identify the PrPc receptor/ligand as STI-1, the Stress Inducible Protein-1. *In vitro* studies showed that STI-1 is a specific, saturable and high affinity ligand for PrPc ($K_d=8 \times 10^{-8} \text{M}$). In parallel, we demonstrated that PrPc interacts with RNI AEI IKDI domain of laminin (Ln) ($K_d=2 \times 10^{-8} \text{M}$). The blockage of PrPc, both from embryonic rats and mice hippocampal neurons, inhibited Ln-induced neurite outgrowth. In addition, neurons from PrPc null mice are unable to extend neurites on RNI AEI IKDI, suggesting that PrPc is the unique cellular receptor for this Ln domain. These data indicate that PrPc-Ln interaction is relevant for neuronal adhesion and differentiation. The characterization of PrPc-Ln and PrPc-STI-1 interactions represents important contributions for the elucidation of the PrPc physiological role.

Prefácio

“A Ciência é construída por fatos assim como uma casa é feita por tijolos, contudo um apanhado de fatos não é Ciência da mesma forma que uma pilha de tijolos não é uma casa”.

Bertrand Russell

Provavelmente a confecção de uma tese de doutorado é o apogeu de um longo processo, iniciado alguns anos antes com a entrada do estudante no laboratório. Durante este período o estudante está sujeito a um processo de amadurecimento que necessariamente implica no convívio com alguns experimentos bem sucedidos e muitos outros mal sucedidos. Os bem sucedidos nos estimulam a continuar enquanto os mal deveriam nos ensinar mais dos que os bem. Infelizmente não há lugar para os experimentos mal sucedidos, nem nos periódicos, nem em teses. Creio que se houvesse certamente a literatura científica dobraria de volume.

Serão descritos aqui alguns dados por mim adquiridos durante os quase sete anos que permaneci no Instituto Ludwig, e que se tomados isoladamente não se apresentam como um conjunto experimental coeso. Explica-se tal fato levando-se em conta que tais experimentos são como algumas peças que perfazem um grande “quebra-cabeça”. Tais “peças” foram agrupadas a outras, produzidas principalmente por outros três “jogadores”: Adriana F. Mercadante, Edgard Graner e Marilene H. Lopes.

Produzimos com isso algumas regiões bem definidas, deste grande “quebra-cabeça” chamado Biologia Celular dos Prions. Creio que isso se deve principalmente, se não exclusivamente, ao sistema de intensa discussão, cooperação e complementaridade que se desenvolveu no Laboratório de Biologia

Celular e Molecular sob a orientação e orquestração segura de Vilma Martins e Ricardo Brentani. Cada artífice foi responsável por um determinado ponto de um projeto maior, sempre sendo explorada a capacidade individual de cada um. Esse método resultou em um trabalho mais completo, pois foi pensado e executado por várias cabeças.

Particularmente tal método foi muito frutífero para minha formação, pois me permitiu desenvolver habilidades e ter contato com as mais diversas metodologias, que dificilmente seriam abordadas se eu tivesse trabalhado sozinho.

A frase de Bertrand Russell citada no começo deste prefácio aplica-se bem a esta tese e a forma que os resultados foram sendo obtidos no decorrer do meu doutoramento.

Desta forma, o “apanhado de tijolos” que aqui será apresentado, de fato, por si só não perfazem uma “casa”. Contudo, para uma apreciação mais completa da inserção de cada um destes tijolos na “casa dos prions”, convido o leitor a se direcionar ao anexo, onde são apresentados os trabalhos que receberam cada um destes tijolos.

Introdução

Doenças neurodegenerativas envolvendo prions

Durante a última década, patógenos responsáveis por doenças neurodegenerativas têm sido caracterizados e se mostrado diferentes dos então conhecidos viróides e vírus. A infecção descrita até então como "scrapie" se mostrou dependente de um componente protéico que foi denominado *prior* (revisado por Prusiner et al., 1998; Prusiner, 1997).

As doenças priônicas incluem as encefalopatias espongiformes transmissíveis de gado, carneiros, felinos, ungulados e de alguns animais selvagens (revisado por Prusiner et al., 1998; Prusiner, 1997). Em humanos a forma Kuru foi descrita em nativos da Papua-Nova Guiné que mantinham a tradição de ingerir vísceras de seus antepassados mortos (Gajdusek, 1977). Além desta, a doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), a síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) e a Insônia Familiar Fatal também atingem a espécie humana (Prusiner, 1993).

As doenças que envolvem prions têm recebido especial atenção (Bateman et al., 1995; Britton et al., 1995) devido à acentuada disseminação da encefalopatia espongiforme bovina no gado europeu, em particular do Reino Unido (Anderson et al., 1996), e sua provável transmissão para seres humanos por ingestão de derivados de carne contaminada (Aguzzi, 1996; Butler, 1996). Isso transformou as doenças priônicas em um grande problema econômico e de saúde pública mundial.

Prions

O conhecimento do agente infeccioso e dos mecanismos patológicos envolvidos com as encefalopatias espongiformes foi possível a partir da transmissão do scrapie de ovelhas para animais de laboratório, pois permitiu uma redução drástica no tempo de incubação da doença (de anos para meses) (revisado por Prusiner et al., 1998).

No começo dos anos 80 dois trabalhos publicados pelo grupo de Stanley Prusiner descreveram o isolamento da partícula infecciosa oriunda dos cérebros de animais de laboratório experimentalmente infectados com “scrapie”. O protocolo de purificação consistia de extrações com detergentes, proteólise limitada, centrifugação diferencial e sedimentação através de gradiente descontínuo de sacarose. O material obtido mostrou-se extremamente insolúvel, com características tintoriais semelhantes a depósitos amilóides (coloração pelo vermelho Congo e birrefringência sob microscopia de luz polarizada, Prusiner et al., 1983). Em microscopia eletrônica de transmissão, o agente infeccioso purificado apresentou-se como pequenos agregados de estruturas alongadas, com tamanho e formato irregulares. Utilizando-se o mesmo protocolo de purificação, material semelhante, sob o aspecto bioquímico e microscópico, foi extraído do cérebro de pacientes diagnosticados como portadores de CJD (Prusiner et al., 1982, Prusiner et al., 1983).

Tais partículas foram então utilizadas na produção de anticorpos monoclonais os quais, curiosamente, reconheceram uma proteína de 33-35 kDa, presente tanto nos cérebros de animais doentes como de animais não infectados (Oesch et al., 1985, Barry et al., 1986). Com a ajuda destes anticorpos foi possível isolar uma proteína constituinte do agente infeccioso. A partir da análise química de uma pequena porção da região amino terminal desta proteína, foi possível sintetizar peptídeos que foram utilizados como antígeno na produção de anticorpos policlonais em coelhos. Tais anticorpos reagiram com a mesma proteína de 33-35 kDa (Barry et al., 1986), sugerindo assim que a proteína presente nas partículas infecciosas do scrapie era um componente do cérebro de animais normais.

O termo prion (“proteinaceous infectious particle”) foi alcunhado em 1982 por Stanley Prusiner para salientar a natureza unicamente protéica das partículas infecciosas purificadas dos cérebros infectados. A proteína expressa constitutivamente no sistema nervoso central foi chamada de prion celular (PrPc), enquanto que a depositada no cérebro de animais infectados foi denominada de prion *scrapie* (PrPsc). Após a digestão proteolítica do PrPsc tem-se uma forma

truncada, chamada de PrP 27-30 (Oesch et al., 1985), enquanto que o mesmo tratamento aplicado ao PrPc leva a sua completa digestão.

O estudo das propriedades físico-químicas do PrPsc foi facilitado pela solubilização dos agregados de PrPc 27-30, extraídos do cérebro de animais de laboratório portadores de “scrapie”, sem reduzir seu poder de infecção. Inicialmente, várias tentativas empregadas para a solubilização das partículas infecciosas, como o uso de detergentes, de sais, alterações de pH e sonicação, foram infrutíferas (McKinley et al., 1983, 1986, Bolton et al., 1984). Entretanto, outros métodos, como a desnaturação térmica, o uso de detergentes desnaturantes, como o dodecil sulfato de sódio (SDS), de fortes agentes caotrópicos e de ácidos ou bases foram eficientes para a dissolução das partículas, no que diminuiu seu poder de infecção (revisado por Prusiner, 1997, Prusiner, 1982).

Além disso, métodos físico-químicos que normalmente alteravam ácidos nucléicos, tais como radiação ultravioleta, ação de nucleases e dietil pirocarbonato não desempenharam qualquer efeito sobre a capacidade infecciosa dos prions. (Prusiner, 1982)

Baseado neste conjunto de dados, Prusiner (1982) propôs assim que a partícula infecciosa prion era constituída principalmente, se não puramente, de proteína. A idéia de um agente infeccioso completamente destituído de ácido nucléico representou um choque para a comunidade científica na época, pois representava uma séria profanação ao dogma central da biologia molecular, que estabelece o fluxo de informação genética partindo do ácido nucléico para proteína e não o inverso (revisado por Keyes, 1999 a,b).

Propriedades do PrPc/PrPsc

Determinou-se então que PrPsc é uma isoforma anormal, modificada pós traducionalmente, de PrPc, sendo que ambas proteínas são ligadas à membrana celular por uma âncora de glicosil fosfatidil inositol (GPI) (Oesch et al., 1985, Stahl et al., 1987). Enquanto que a sequência primária de ambas as proteínas é a mesma, sua estrutura secundária difere acentuadamente, sendo que o PrPc é

constituído predominantemente por α -hélices (42%), enquanto o PrPsc é rico em regiões contendo folhas β -pregueadas (43%) (Pan et al., 1992). Com o auxílio de peptídeos sintéticos foi possível avaliar que as α -hélices poderiam ser convertidas em estruturas β -pregueadas (Gasset et al., 1992) e que estes últimos poderiam induzir mudanças conformacionais em peptídeos com estrutura helicoidal (Nguyen et al., 1995). Paralelamente foi mostrada a conversão do PrPc em PrPsc *in vitro* (Kocisko et al., 1994), sendo a proteína resultante de tal conversão rica em estruturas β -pregueadas, o que explicaria a deposição tóxica de agregados insolúveis nos tecidos cerebrais (revisado por Kakizuka, 1998).

A proteína PrPc

A proteína PrPc é codificada a partir de uma seqüência aberta de leitura localizada em um único exon tanto em camundongos e ratos como em humanos (revisado por Prusiner, 1997). O mRNA do PrPc pode ser detectado no tubo neural de camundongos a partir do décimo terceiro dia de vida intra-uterina, sendo sua quantidade aumentando após o nascimento (Manson et al., 1992).

Além da adição da ancora de GPI outra modificação pós-traducional marcante nas duas isoformas é a de possuírem carboidratos ligados à cadeia polipeptídica (Rogers et al., 1990).

Outra propriedade do PrPc é a capacidade desta molécula de ligar íons Cu^{2+} com afinidade da ordem de μM através de 4 histidinas contidas em 5 ou 6 regiões repetidas, de oito aminoácidos cada, localizada na região amino terminal (Homshaw et al., 1995, Brown et al., 1997a, Viles et al., 1999).

A função normal do PrPc

Estudos com animais "knockout" (-/-) para o gene do PrPc são controversos. O grupo de Sakagushi (1996) mostrou que os animais possuem distúrbios motores e diminuição acentuada da camada de células de Purkinje no cerebelo. Enquanto Collinge e colaboradores (1994) mostraram que os animais possuem resposta eletrofisiológica anormal no hipocampo, isto é diminuição da LTP ("long term potentiation"), o grupo de Charles Weissmann (Büeler et al., 1992) mostrou que

os animais não possuem alteração significativa. Recentemente foi descrito pelo nosso grupo que animais "knockout" são mais sensíveis a drogas indutoras de distúrbios epiléticos (Walz et al., 1999) e que possuem atividade locomotora alterada (Roesler et al., 1999). Além disso, Kuwahara e colaboradores mostraram atividade apoptótica diferenciada em linhagens neuronais imortalizadas de animais "knockout" (Kuwahara et al., 1999).

Há um consenso entre os grupos que os animais são viáveis e sobrevivem mais de 500 dias (vida média apresentada por camundongos). Desta forma verificou-se que os animais que tiveram o gene de PrPc removido são viáveis durante o período embrionário e na fase adulta, apesar deste gene ser conservado e provavelmente muito importante.

Shmerling e colaboradores (1998) mostraram que os sinais de ataxia em animais "knockout" podiam ser revertidos com a re-introdução do gene PrPc normal (animais transgênicos). Curiosamente, a produção de transgênicos com deleção na região do PrPc onde nós mostramos a interação com a proteína receptora (Martins et al., 1997) não é capaz de reverter a ataxia no animal "knockout".

Já as propriedades do PrPc em ligar íons Cu^{2+} e possuir atividade semelhante a SOD (revisado por Brown, 2001) sugeriram que o PrPc está tanto envolvido na homeostase deste íon metálico como na regulação antioxidante associada a SOD. De fato em animais PrP^{-/-} a quantidade do elemento cobre presente em preparações de membrana de cérebro é de 10 a 15 vezes menor quando comparada a animais selvagens (Brown et al., 1997a). Além disso, animais transgênicos com expressão aumentada de PrPc têm maior resistência ao estresse oxidativo enquanto neurônios PrP^{-/-} são mais sensíveis a tal estresse (revisado por Brown, 2001).

Proteínas ligantes de PrPc

A identificação de proteínas ligantes de PrPc poderia trazer pistas sobre sua função fisiológica, bem como na elaboração de um mecanismo envolvido na transmissão e progressão das doença que envolvem prions. O PrPc possui uma série de características estruturais que permitiriam sua interação com outras proteínas. Dois potenciais sítios de interação são: a presença de uma hélice anfipática próxima ao centro da molécula, a qual em outras proteínas está envolvida em interações proteína-proteína, e a âncora de GPI, a qual pode ser internalizada e enviar sinais (Oesch et al., 1990).

É curioso constatar que uma grande quantidade de moléculas pode se associar pelo menos *in vitro*, com o PrPc, tais como heparina, chaperoninas HSP 60 e BiP, proteína acídica fibrilar glial (GFAP), apolipoproteína-1 e o receptor de 37/66 kDa de laminina (revisado por Martins et al., 2001). Recentemente foi observado que distroglicana (Keshet et al., 2000) e algumas N-CAM's (neural cell adhesion molecules) (Schmitt-Ulms et al., 2001) são ligantes de PrPc. Contudo os argumentos para a relevância biológica para tais interações são pobres de consistência.

Nosso grupo, em 1997, caracterizou uma proteína de 66 kD que se liga ao PrPc e que provavelmente esteja envolvida em sua internalização (cf. item abaixo) (Martins et al., 1997). Coincidentemente, na mesma época, o receptor de Ln de 37/66 kDa recebeu especial atenção como sendo um receptor para o PrPc (Rieger et al., 1997; Gauczynski et al., 2001; Hundt et al., 2001), o qual em associação com heparan sulfato proteoglicano pode participar da internalização de 20-50% do PrPc ligado à membrana (Hundt et al., 2001).

Resultados obtidos recentemente pelo nosso grupo mostraram que o PrPc liga-se com alta afinidade e especificidade à laminina (Ln), uma proteína de matriz extracelular. A região responsável pela interação ao PrPc está mapeada na cadeia gama γ_1 da Ln, mais precisamente o peptídeo RNIAEIIKDI (Mercadante, 2000, Graner et al., 2000a,b). Uma vez constatada tal interação procurou-se neste trabalho explorar quais seriam as implicações biológicas de tal interação.

A laminina

A Ln é uma molécula em forma de cruz composta por três cadeias polipeptídicas: cadeias α (400 kDa), β (210 kDa) e γ (200 kDa). Esta glicoproteína possui múltiplos domínios e é um dos principais componentes não colagênicos das membranas basais, tais como as alinhadas ao epitélio, as que circundam os vasos e nervos e as que estão localizadas sob a *pia-mater* do cérebro (Timpl e Dziadek, 1986)

A Ln é uma molécula vital nos processos de adesão e diferenciação celulares em particular os que envolvem a neuritogênese (Beck et al., 1990). Esta função da molécula é determinada por domínios específicos (Beck et al., 1990), entre eles o decapeptídeo da cadeia γ_1 mencionado RNIAEIIKDI (Liesi et al., 1989).

Desta forma buscou-se neste trabalho avaliar o papel da interação PrPc-Ln nos processos de adesão celular e diferenciação neuronal.

Proteína receptora de PrPc

A proteína PrPc cicla constitutivamente entre a superfície celular e um compartimento intracelular (Taraboulos et al., 1992). Usando microscopia eletrônica e análise bioquímica, observou-se que em cultura de neuroblastomas e de neurônios o PrPc está presente em vesículas revestidas de clatrina, que participam na sua internalização (Shyng et al., 1994). Esta via de endocitose colocou uma questão importante, já que a ausência de um domínio intracitoplasmático na molécula de PrPc impede sua interação direta com os adaptadores componentes das vesículas revestidas de clatrina (revisado por Robinson, 1994). Foi sugerido que o prion pudesse interagir com uma proteína transmembrânica que contivesse o sinal de internalização por "coated pits" (Shyng et al., 1994). Estes dados são conflitantes com os obtidos pelo grupo de Prusiner que sugerem a internalização do PrPc por caveola (Vey et al., 1996) e a existência de uma isoforma transmembrânica de PrPc (Hegde et al., 1998). Contudo, uma via não exclui a outra já que ambas podem ser utilizadas simultaneamente para a internalização de proteínas (Anderson, 1993).

É sabido que na estrutura primária os aminoácidos (aa) 117 a 137 da proteína de PrPc de galinha (resíduos 105 a 122 no PrPc humano) são críticos para sua internalização (Shyng et al.,1995). O mesmo peptídeo correspondente aos aa de 114 a 126 do PrPc humano é capaz de mimetizar, em cultura primária de neurônios, a neurotoxicidade do PrPsc (Forloni et al.,1993). Esta região da molécula é a mais conservada entre as espécies (Gabriel et al.,1992) e está entre os domínios que podem sofrer mudanças conformacionais secundárias de α hélice para folha β -pregueada (principal característica das moléculas infecciosas) (Gasset et al.,1992).

Desta forma, a presença de uma proteína receptora/ ligante de PrPc que fosse responsável por sua internalização, por possível transdução de sinal e ainda, pela entrada do agente PrPsc e que participe na infecção celular tem sido bastante discutida.

Nosso grupo, utilizando a teoria da hidropaticidade complementar (Brentani, 1988, Brentani, 1990) caracterizou uma proteína de 66 kD que se liga ao PrPc e medeia a neurotoxicidade do PrP₁₀₆₋₁₁₆ em cultura primaria de neurônios (Martins et al., 1997).

Desde a descrição da existência de uma proteína receptora/ligante de PrPc com 66kDa (Martins et al., 1997) nosso laboratório tem incessantemente trabalhado na caracterização bioquímica, bem como na clonagem do gene desta proteína.

Neste trabalho é descrita a identidade protéica do receptor/ligante de 66 kDa inicialmente caracterizado (Martins et al., 1997) e sua capacidade de interagir com o PrPc sob diferentes condições experimentais.

Objetivos

O presente trabalho tem como objetivos:

Avaliar o papel da interação PrPc-Laminina na diferenciação e neuritogênese em culturas celulares

Identificar o receptor/ligante de PrPc de 66 kDa, demonstrando sua capacidade de interação com o PrPc.

Materiais e Métodos

Materiais

Vetores

O vetor de expressão pEGFP-C1PrPc utilizado foi descrito por Lee e colaboradores (2001a). Já o vetor pEGFP-C1STI-1 foi construído a partir da subclonagem da sequência da STI-1 contida no vetor pGEX-STI-1 (Zanata et al, submetido).

Anticorpos

Anticorpos anti-STI-1 foram obtidos a partir da imunização de coelhos neozelandeses com His₆-STI-1 purificada em coluna de NTA-Ni-Agarose. Estes anticorpos foram fornecidos na forma de imunoglobulinas purificadas pelo fornecedor Bethyl Co. (USA). Anticorpos policlonais contra GST-PrPc e GST foram obtidos no laboratório a partir da imunização de coelhos com estas proteínas imobilizadas em géis de acrilamida através de rota intramuscular e subcutânea.

Para obtenção de anticorpos anti-rPrPc em animais “knockout”, 15µg de proteína recombinante (GST-PrPc ou His₆-PrPc) foram injetadas na cavidade intraperitonal na forma de emulsão com adjuvante completo de Freund (Sigma) na primeira imunização e incompleto nos demais reforços. Os soros dos animais M185, M200 e M201 foram utilizados na maioria dos ensaios. O soro R340 foi obtido a partir da imunização de coelhos com PrP 27-30 e foi gentilmente doado pelo Dr Charles Weissman (Londres, UK).

Todos os anticorpos utilizados foram testados por mais de uma técnica analítica (“Western blotting”, FACS, ELISA, imunofluorescência), mostrando-se específicos contra seus antígenos e não apresentando reação cruzada com outras moléculas.

Obtenção de Ln-1, peptídeos sintéticos, rPrPc, imunoglobulinas e plasmídeos

A Ln utilizada em todos os experimentos foi a do tipo 1 ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$) e foi purificada a partir do rabdomiosarcoma murino EHS, de acordo com Paulsson e colaboradores (1987). O peptídeo ativo da cadeia $\gamma 1$ da Ln (RNIAEIIKDI), bem como o peptídeo complementar (HVATKAPHHGPCRSSA), foram sintetizados quimicamente pela empresa Neosystem (Strasbourg, França) ou fornecidos pela Dra. Maria Aparecida Juliano (INFAR - Universidade Federal de São Paulo)

A proteína PrPc expressa em sistema heterólogo de *E. coli* com etiqueta de seis histidinas (His₆), foi purificada como descrito na literatura (Zanh et al., 1997).

Imunoglobulinas foram obtidas de soros hiperimunes ou soro de animais não imunizados a partir de cromatografia de afinidade em coluna de ProteínaA/G-Sepharose (Harlow e Lane, 1988)

Determinação da concentração protéica foi medida pelo método de Bradford (1976)

Plasmídeos pEGFP-STI-1 e pEGFP-PrPc foram inseridos na cepa DH5 α (*E. coli*) e sua produção purificação em larga escala foi levada a cabo em colunas de troca iônica segundo especificado pelo fabricante (Qiagen GmbH, Heidelberg, Alemanha)

Linhagens celulares

Células PC-12 (feocromocitoma de rato), usadas nos experimentos de neuritogênese (Graner et al, 2000a,b) e adesão (Graner et al, 2000b) foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% soro fetal bovino, sendo as células pré-tratadas por 5 dias com NGF- β (50ng/ml - Sigma) antes de serem semeadas sobre Ln nos ensaios de neuritogênese. As culturas foram mantidas em estufas a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂, com umidade controlada 95%.

Culturas primária de fibroblastos de embriões de camundongos PrP^{-/-} foram obtidas conforme descrito na literatura (Freshney, 1992).

As linhagens HEK 293T (rim de embrião humano - gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Hugo Armelin, IQ-USP) e N2A (neuroblastoma de rato - gentilmente cedida pela Profa. Dra. Mari Sogayar, IQ-USP) foram mantidas em meio MEM ou DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino e mantida nas mesmas condições que as demais linhagens empregadas.

Métodos empregados no estudo da relevância biológica da interação PrPc-Ln

Silanização de lâminas para cultura celular. (Modificado de Aplin & Hughes, 1981, Graner et al., 2000a)

Lâminas para cultura celular (Lab-tek, Nalge-Nunc International) com oito câmaras foram tratadas, a temperatura ambiente, por 4 minutos com solução 0,5M de 3-aminopropyltrimethoxysilane dissolvido em solução 95% de etanol (Merck) 5% água deionizada. Os poços foram então lavados rapidamente com solução de etanol-água (95%/5%), água deionizada e PBS e incubados por 30 minutos com solução 0,25% de glutaraldeído em PBS. Uma seqüência de três lavagens com PBS foi feita e soluções com as proteínas de interesse, diluídas em PBS, foram então adicionadas (EHS-Ln: 10 µg/ml; RNIAEIIKDI-BSA: 200 ng/ml) e incubadas por 16 horas a 4°C. Nova seqüência de lavagens com PBS foi feita e bloqueio de sítios inespecíficos, por 1 hora a temperatura ambiente, com solução 1% de BSA em PBS. Uma última série de lavagens foi feita e as lâminas mantidas em PBS até o momento da utilização.

Preparação de células hipocampais de embriões de rato e camundongo (Graner et al., 2000a)

Culturas primárias do hipocampo foram obtidas de cérebros de embriões de ratos (E17/18), assepticamente dissecados em solução salina balanceada de Hank's (HBSS) (Gibco-BRL), e dissociadas por tripsinização (0,5 mg/ml por 15 minutos a 37°C) e trituração mecânica. Esta trituração é feita com o auxílio de duas pipetas Pasteur, as quais tiveram o diâmetro de suas pontas diminuídas com

o auxílio da chama de bico de Bunsen. Após dissociação, a suspensão de células foi lavada 3 vezes em HBSS contendo desoxirribonuclease I (Sigma) 10µg/ml, soro de cavalo inativado pelo calor (Sigma) 10% (v/v), MgCl₂ 8mM, e HEPES (Sigma) 10mM. As células foram então ressuspensas em meio Neurobasal (Gibco-BRL) contendo suplemento B-27 (Gibco-BRL), glutamina (2mM), penicilina (100 I.U.), estreptomicina (100µg/ml), e 5% (v/v) de soro fetal bovino, e semeadas sobre lâminas de vidro (8 câmaras, Lab-Tek, Nunc Neogene International) pré-tratadas com LN ou o peptídeo RNIAEIIKDI. A quantidade de 10⁴ células por poço foi normalmente utilizada.

Quando células de camundongo foram utilizadas a etapa de incubação com tripsina não foi feita, sendo a dissociação feita apenas com as pipetas Pasteur. Além disso, as células são semeadas nas lâminas com meio Neurobasal sem soro fetal bovino.

Ensaio de Neuritogênese (Graner et al., 2000a,b)

Células (10⁴ células/poço Lab Tek) obtidas da dissecação de cérebros de embriões E16-17(camundongo) E17-18(rato) foram semeadas em lâminas de oito câmaras e deixadas para aderir por 2 horas a 37°C e 5% de CO₂ em 400 µl de meio Neurobasal acrescidos de suplementos. Após a adesão, todo o meio de cultura foi cuidadosamente retirado com uma pipeta e meio Neurobasal, sem soro, acrescido com os anticorpos e esterilizados por ultrafiltração (filtro estéril 0,22µm, Corning Co.), adicionado aos poços.

Após 14 horas de incubação com os anticorpos, o meio foi novamente retirado e as células fixadas com solução 3,7% de paraformaldeído (tamponado em PBS) por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS, coradas com hematoxilina de Harrys (0,21M de sulfato de alumínio e potássio (Merck), 17mM de hematoxilina (Merck), 12mM de óxido de mercúrio II (Merck) e 5% de etanol (Merck)), e montadas em meio de montagem (Permount, Fisher Scientific).

Células apresentando neurito foram contadas em 10 campos por poço (aproximadamente 500 células por poço) utilizando microscópio de contraste de

fase. Um neurito foi definido como um processo celular com um comprimento maior ou igual a quatro corpos celulares. A porcentagem de neuritos foi calculada frente ao número total de neurônios piramidais contados.

No caso da neuritogênese com células PC-12 foi utilizada a mesma técnica, com ligeiras modificações (Graner et al., 2000b).

Caracterização da proteína receptora/ligante de PrPc 66 kDa

Preparação de fração protéica de 55% (fração 55%) de sulfato de amônio e de membrana plasmática de cérebro de camundongos (Martins et al., 1997).

Extrato total de cérebros e a fração protéica precipitada com 55% de sulfato de amônio foram preparadas a partir da homogeneização de cérebros de camundongos Balb-c sacrificados por disjunção medular na altura do pescoço como anteriormente descrito (Martins et al., 1997). No caso da fração 55%, cortes com 30% e 45% de sulfato de amônio foram feitos nas etapas de pré-purificação da proteína de 66kDa. Após a preparação os extratos protéicos foram em seguida estocados à -70°C, quando não utilizados imediatamente. Todas as etapas de preparação foram levadas a cabo a 4°C.

Já a reparação de extrato de membrana celular de cérebros de camundongos foi feita segundo descrito na literatura (Arvan et al., 1983) e anteriormente empregado pelo nosso grupo (Martins et al., 1997).

Focalização da fração 55% utilizando IPG dry strip. (Görg e cols., 1995)

As proteínas da fração 55% (1,5mg/tira de gel IPG), dialisadas contra água deionizada, foram liofilizadas quase a secura e redissolvidas (250µl) em solução de reidratação (6,5M de uréia, 2,0M de tiouréia, 1% de CHAPS, 0,5% de Triton-X100, 2,8mg/ml de DTT, 2% de tampão IPG pH 3-10 Linear (Pharmacia) e traços de azul de bromofenol).

A amostra foi então aplicada à tira IPG (Immobiline DryStrip pH 3-10L, Pharmacia) como descrito pelo fabricante (Berkelman e Stenstedt, 1998). Brevemente, a amostra é pipetada no centro de uma canaleta do aparato de reidratação (Immobiline DryStrip Reswelling Tray, Pharmacia) e a tira IPG é depositada delicadamente com a face de poliacrilamida voltada para baixo. A tira é então recoberta com óleo mineral e deixada reidratando durante 16 horas.

Após adsorção da amostra no gel e sua reidratação, esta foi ligeiramente lavada com água deionizada e acoplada no aparato Multiphor II (Pharmacia) para separação isoelétrica das proteínas (20°C). A voltagem total aplicada para a separação consistiu de várias etapas curtas com baixa voltagem seguida de uma etapa longa com voltagem mais alta (60min-300V, 30min-400V, 30min-600V e 1320min-2000V). Após um total de aproximadamente 43500Vh a tira foi retirada, ligeiramente lavada com água deionizada e congelada no -80°C, em tubos de ensaio com rosca, quando não utilizada imediatamente.

SDS-PAGE em sistema vertical (segunda dimensão)

Para separação eletroforética por peso molecular, tiras IPG submetidas à focalização isoelétrica foram incubadas por 20 min com tampão de equilíbrio (50mM de Tris-HCl, pH 8,5, 6M de uréia, 30% (m/v) de glicerol, 2% de SDS e traços de azul de bromofenol) acrescido de 1% m/v de DTT como agente redutor. Em seguida as tiras foram incubadas por mais 20 min com tampão de equilíbrio acrescido de 5% (m/v) de iodoacetamida como agente alquilante de grupos tiol.

As tiras são então lavadas ligeiramente com água deionizada e aplicadas (gel contra gel) sobre gel gradiente de poliacrilamida (8-18%) pré-polimerizado

(ExcelGel SDS, Pharmacia). Ao lado das tiras foram aplicados marcadores de peso molecular e a fração de 55%. A separação eletroforética foi feita a 15°C e com uma corrente constante de 20mA. Após a frente de migração, que pode ser observada como uma faixa azul, ter-se distanciado aproximadamente 1-2mm da tira IPG, a eletroforese foi interrompida, a tira IPG removida e a tira de tampão catódica deslocada até onde se encontrava originalmente a tira IPG. A eletroforese foi finalmente interrompida quando a frente de migração chegou ao lado anódico do gel.

As proteínas separadas desta maneira foram transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando o sistema Nova Blot Semi-Dry (Pharmacia) ou visualizadas com o corante PhastGel Blue R (Pharmacia) conforme indicado pelo fornecedor.

Preparação de extratos celulares

Células foram coletadas dos recipientes de cultura lavadas 2 vezes com PBS gelado e lisadas em tampão de lise (PBS acrescido de 1% e NP-40 e inibidores de protease Complete (Roche) por incubação no gelo por 15 minutos. Os lisados foram centrifugados a 20000xg por 10 minutos a 4°C. Pequena fração do sobrenadante foi armazenado para análise posterior em SDS-PAGE, sendo o restante imediatamente submetido a reação de imunoprecipitação.

Reação de "Western blotting"

As proteínas dos extratos totais celulares ou imunocomplexos foram separadas eletroforéticamente em gel de poliacrilamida a 10% contendo SDS (SDS-PAGE). Aplicaram-se as soluções protéicas no gel, misturadas com tampão de amostra redutor, após fervura por 5 minutos.

As proteínas separadas através de SDS-PAGE foram transferidas e imobilizadas em membranas de nitrocelulose (0,45 μm - Schleicher & Schuell, Alemanha) durante 1 hora sob corrente constante de 0,8 mA/cm² no sistema Nova blot (Pharmacia) em tampão de transferência (39mM de glicina (Merck), 48mM de

Tris, 0,037% de SDS e 20% de metanol). Para averiguação da eficiência de transferência usou-se corante Ponceau (Sigma).

As membranas foram então bloqueadas (durante 2 horas) com TBST (120mM de NaCl, 20mM de Tris e 0,05% de Tween 20) contendo 5% de leite desnatado liofilizado (Molico, Nestlè) e incubadas com anticorpos primários diluídos em tampão de bloqueio a 4°C durante 16 horas. As membranas, após 3 lavagens de 10 minutos com TBST, foram incubadas com anticorpo anti-Ig de camundongo ou coelho conjugado com peroxidase (Pharmingen), diluído 1:10000 em tampão de bloqueio, por 1 hora à temperatura ambiente. Após uma nova série de lavagens, revelaram-se as membranas com substrato adequado para reação quimioluminescente (Amersham-Pharmacia). Um filme radiográfico (Kodak) foi exposto a membrana até obtenção do sinal adequado.

Ensaio de Citometria de Fluxo (FACS)

Fibroblastos PrP ^{-/-} ou células HEK 293T (10⁶ células/condição experimental) foram incubados ou não com His₆-PrPc por 2 horas a 4°C em PBS. Em seguida dois ciclos de lavagens foram aplicados às células, estas foram então incubadas com anticorpo policlonal anti-PrPc (Lee et al., 2001a) na diluição 1:100 por 45 minutos a 4°C. Em seguida as células foram lavadas duas vezes com PBS e então incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo acoplado à PE (ficoeritrina) na diluição 1:200 (Pharmingen) por 45 minutos a 4°C. As células foram lavadas mais duas vezes e a contagem de 10000 células foi realizada em um citômetro FACSCAN Consort 32 System com Software Lysis II (Becton Dickson). Os resultados foram normalizados pela incubação das células com soro pré-imune de camundongo utilizado como anticorpo primário.

Marcação de proteínas da superfície celular com biotina (Magdesian et al., 2001)

Linhagens celulares usadas neste estudo foram retiradas como descrito no ensaio de citometria de fluxo. Etapa fundamental na obtenção das células é a medida da viabilidade celular a partir da coloração de pequena alíquota da suspensão celular com solução 0,4% (m/v) de azul de tripan. A viabilidade celular deve ser superior a 95% para assegurar que a biotina não irá marcar proteínas localizadas no interior das células.

As células assim obtidas foram lavadas 3 vezes com PBS, pH 8,0, gelado e incubadas por 30 minutos com solução 0,5mg/ml de biotina (EZ-sulfo-NHS-LC-Biotin, Pierce), sendo que foram utilizadas $2,5 \times 10^7$ células ressuspendidas em 1 ml de solução reacional. Em seguida as células foram novamente lavadas com PBS gelado e processadas para obtenção de extrato celular protéico.

Ensaio de imunoprecipitação

Extratos celulares (entre 250 e 500ul) foram pré-clareados com uma mistura de IgG irrelevante de coelho (10ug) e 50 ul de Proteína A-Sepharose (Amersham-Pharmacia) ou soro irrelevante de camundongo (5ul), 20 ul de Proteína A-Sepharose (Amersham-Pharmacia) e 30 ul de Proteína G-Sepharose (Sigma) por incubação á 4°C sob agitação suave por 16 horas. O sobrenadante foi recuperado por centrifugação e nova quantidade de Proteína A/G-Sepharose adicionada aos lisados, sendo os anticorpos de interesse adicionados em seguida. Foram empregados anticorpos anti-ST11 (10ug) e anti-rPrPc (6ul, sendo 2ul M200, 2ul M201 e 2ul M185 - estes número referem-se aos animais doadores de soros) para a formação dos imunocomplexos. Após incubação de 8 horas á 4°C, sob agitação suave, a resina foi lavada 8 vezes por centrifugação com 1 ml de tampão de lise, sendo a última lavagem feita com tampão de lise acrescido de 0,1% de SDS. Os imunocomplexos foram eluídos da resina com tampão de amostra (120mM Tris-HCl pH6,8, 0,4% SDS, 20% glicerol, 0,01% azul de bromofenol, 2-mercaptoetanol).

Método de transfecção por cálcio (Püschel et al., 1995, Zanata et al., 2002)

Células HEK293T foram transfectadas, com plasmídeos de interesse, pelo método de co-precipitação com fosfato de cálcio. Brevemente, 12µg do plasmídeo de interesse foram adicionados na superfície de 750µl de água deionizada, seguido de 250 µl de solução 1 M de CaCl₂ e 1000µl de solução 2X BBS (50mM BES, 250mM NaCl, e 1mM Na₂HPO₄, pH 6,95). Após 5 minutos de incubação a temperatura ambiente foram adicionados 8 ml de meio MEM COMPLETO (meio MEM acrescido de 10% de soro fetal bovino, 2mM de glutamina, 50µg/ml de streptomicina, 50UI/ml de penicilina).

Uma placa de poliestireno de 100mm de diâmetro (Costar) contendo células HEK293T com aproximadamente 60% de confluência, teve o seu meio de cultura retirado e a solução acima preparada adicionada. A placa foi então incubada por 5 horas em estufa úmida com 3% CO₂. Após este tempo o meio foi retirado da placa e esta lavada com 5 ml de solução PBS (10mM de Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 7,4), sendo novo meio MEM COMPLETO adicionado e a placa novamente incubada em estufa úmida, mas com 5% de CO₂, por 48-72 horas.

Após este período a placa era observada em microscópio invertido de fluorescência, sendo que as células que receberam os plasmídeos convenientemente, e expressavam a proteína de fusão GFP, apresentavam-se verdes.

Resultados

Participação do PrPc na neuritogênese induzida por laminina.

Com base nas semelhanças estruturais entre o PrPc e a proteína precursora de amiloide (APP) levantou-se a possibilidade de que o PrPc pudesse interagir com a Ln, de maneira semelhante a observada para o APP (Narindrasorasak et al., 1992).

De fato, utilizando-se PrPc recombinante (rPrPc), foi possível verificar sua ligação de maneira específica, saturável e com alta afinidade a Ln ($K_d=2 \times 10^{-8}$) (Mercadante, 2000, Graner et al., 2000a). A especificidade desta interação mostrou-se independente do tipo de etiqueta utilizada para expressão do rPrPc, visto que a interação GST-PrPc/Ln ($K_d=2 \times 10^{-8}$ M, Graner et al, 2000a) possui a mesma ordem de grandeza e propriedades que a interação His₆-PrPc/Ln ($K_d=5,8 \times 10^{-8}$ M, Mercadante, 2000). Uma validação adicional da interação PrPc-Ln foi buscada utilizando-se outras proteínas como controle. Desta forma foi possível mostrar que a Ln liga-se dez vezes mais ao PrPc do que a fibronectina, uma outra glicoproteína da ECM, também envolvida na adesão e crescimento de processos neuronais. Nenhuma ligação foi detectada quando colágeno tipo I ou BSA foram utilizados (Mercadante, 2000), contudo a possibilidade do PrPc interagir com outras moléculas da ECM não é descartada e vem sendo investigada por outros membros do laboratório.

A observação da interação PrPc-Ln levou-nos a pergunta de quais seriam as implicações biológicas de tal ligação. Levando-se em consideração as similaridades entre o PrPc e o APP (Han et al., 1995, Hsiao, 1997) e o envolvimento da interação APP-Ln (Narindrasorasak et al., 1992) na indução de neuritos (Koo et al., 1993), procurou-se investigar a possível participação do PrPc neste processo.

Desde que o envolvimento da Ln está bem caracterizado em diversos modelos de diferenciação celular (Tomaselli et al., 1988, Liesi et al., 1992, Liesi et al., 1995, Rivas et al., 1995), em particular na neuritogênese (Tomaselli et al.,

1987, Turner et al., 1989), procurou-se em um primeiro momento testar a hipótese do envolvimento do PrPc neste tipo de processo biológico utilizando células PC-12 (Tomaselli et al., 1990) derivada de um feocromocitoma de rato, que pode se diferenciar em células com propriedades neuronais (Greene e Tischler, 1976) quando tratadas com Ln e fator de crescimento derivado de nervos (NGF β) (Tomaselli et al., 1987, Turner et al., 1989). Na figura 1 pode ser observada uma inibição de 50-70% na formação de neuritos quando células, semeadas sobre Ln, foram incubadas na presença de anticorpos anti-GST-PrPc (ou R340). Por outro lado, a incubação com anti-GST ou soro irrelevante não afetou a neuritogênese induzida pela Ln (Fig 1).

Figura 1. Efeito de anticorpos anti-PrPc na neuritogênese de células PC-12 diferenciadas com NGF- β e Ln.

Neuritogênese dependente de Ln foi inibida quando o PrPc na superfície celular foi bloqueado com anticorpos anti-PrPc (anti-GST-PrPc e R340). Os sinais * e ** mostram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (teste Mann-Whitney para amostras não pareadas, $p < 0,05$).

Interessantemente, nosso grupo já havia mostrado, que o tratamento desta célula com NGF- β induz um aumento de 25% de PrPc expresso na superfície celular (Graner et al., 2000a, Cabral et al., 2001) sugerindo que o aumento na expressão desta proteína esteja relacionado ao processo de diferenciação celular.

Nessa mesma linha, a adesão celular, outro fenômeno de extrema importância em toda biologia celular e *sine qua non* ao fenômeno de neuritogênese, também foi desafiada por anticorpos anti-PrPc. Tratamento de células PC-12 com anticorpos anti-GST-PrPc, antes de sua semeadura sobre Ln, inibe a adesão celular em 30% (Figura 2, Graner et al., 2000b), enquanto anticorpos gerados contra a proteína de fusão GST não produzem efeito diferente ao observado quando nenhum anticorpo foi adicionado. Anticorpos anti cadeias $\alpha 1$, $\alpha 3$ e $\beta 1$ integrina, utilizados como controle positivo inibiram a adesão celular entre 30-35%, como já havia sido mostrado por outro grupo (Tomaselli et al., 1987). Estes resultados sugerem que o bloqueio do PrPc na superfície desta linhagem de alguma forma interfere tanto na adesão celular como na extensão de neuritos em células previamente aderidas ao substrato.

Figura 2. Bloqueio da adesão de células PC-12 sobre Ln com anticorpos anti-rPrPc e anti-integrinas cadeias $\alpha 1$, $\alpha 3$, e $\beta 1$.

O bloqueio de tais moléculas na superfície celular inibe significativamente a adesão quando comparada aos controles negativos, anti-GST e soro não imune de coelho (não mostrado). BSA foi utilizado como controle negativo para o substrato. O sinal * indica diferença estatisticamente significativa com relação ao controle (teste Mann-Whitney para amostras não pareadas, $p < 0,05$)

Paralelamente aos resultados acima descritos procurou-se estabelecer qual ou quais domínios da Ln seriam responsáveis pela interação com o PrPc. A Ln é uma molécula de alto peso molecular (ca. 800.000 Da) constituída de vários domínios responsáveis por sua atividade biológica diversificada (Luckenbill-Edds, 1997). Tal atividade foi intensamente investigada nas duas ultimas décadas e mapeada em domínios específicos da Ln com a ajuda ou de fragmentos proteolíticos desta (e.g. E1, E8, P1) ou peptídeos quimicamente sintetizados e que mimetizam os domínios presentes na molécula inteira. Levando-se em consideração a fenomenologia observada nos ensaios de neuritogênese e adesão procurou-se na literatura quais domínios da Ln haviam sido descritos como estando relacionados a estas atividades biológicas.

Já foi demonstrada a importância de três peptídeos derivados da Ln em mimetizar a função fisiológica da molécula inteira. Os peptídeos IKVAV e RNIAEIIKDI estão localizados respectivamente nas cadeias $\alpha 1$ e $\gamma 1$ e estão envolvidos com a formação de neuritos (Liesi et al., 1989, Tashiro et al., 1989). Interessantemente a neuritogênese mediada pelo APP parece ocorrer via o domínio IKVAV da Ln. Já o peptídeo YIGSR, da cadeia $\beta 1$, foi descrito como inibidor da adesão celular à Ln (Graf et al., 1987), mas não promotor de neuritogênese (Tashiro et al., 1989). Utilizando-se os três peptídeos acima descritos foi possível verificar (Mercadante, 2000, Graner et al., 2000a) em ensaios de competição da ligação rPrPc-Ln, que apenas o peptídeo RNIAEIIKDI atuou como inibidor desta interação. Os outros peptídeos da Ln empregados no ensaio não apresentaram qualquer interferência nesta interação, sugerindo que o domínio RNIAEIIKDI seja um dos domínios da Ln, ao qual o PrPc se liga.

Como a utilização de linhagens celulares imortalizadas em cultura sempre gera dúvidas com relação aos prováveis artefatos resultantes da imortalização destas células preparamos culturas primárias de células hipocâmpais obtidas tanto de ratos como camundongos para avaliar a relevância biológica de tal interação. Merece destaque o fato de que já foi detectada a presença deste domínio da Ln por microscopia confocal em hipocâmpos de rato (Hagger et al., 1998).

Inicialmente foram utilizadas células hipocâmpais oriundas de embriões de ratos E17-E18. Na figura 3 pode ser observado que aproximadamente 24% das células contadas apresentam neuritos, quando semeadas sobre Ln, e que a neuritogênese é inibida em mais de 58% quando as células são tratadas com anticorpos anti GST-PrPc. Contudo, anticorpos anti-GST (controle negativo) não tem atividade, possuindo valores semelhantes ao grupo não tratado.

Na mesma figura pode ser observado que o peptídeo RNIAEIIKDI estimula a formação de neuritos de uma maneira muito semelhante que a da própria Ln inteira (ca. 27%). Entretanto, anticorpos anti GST-PrPc inibem ca. 80% da neuritogênese induzida por este peptídeo, mostrando de modo inequívoco o envolvimento do PrPc na neuritogênese promovida por este domínio da cadeia γ_1 da Ln.

Figura 3 - Bloqueio da neuritogênese de células hipocâmpais de rato em cultura sobre Ln e o peptídeo RNIAEIIKDI com anticorpos anti-PrPc.

Tanto Ln como o decapeptídeo RNIAEIIKDI derivado da cadeia γ_1 promovem a mesma taxa de neuritogênese em neurônios hipocâmpais, a qual é inibida por anticorpos anti-GSTPrPc e não é afetada por anticorpos anti-GST. Os valores representam a média de três experimentos e as barras horizontais os desvios padrões. Os sinais * e ** mostram diferenças estatisticamente significativas com relação ao controle (teste Mann-Whitney para amostras não pareadas, $p < 0,05$)

Com a disponibilidade de camundongos que tiveram o gene do PrPc removido (gentilmente cedidos pelo Dr. Charles Weissmann, Institut für Molekular Biologie, Zurich) foi em seguida estudada a neuritogênese de células hipocâmpais destes animais frente aos mesmos substratos testados para células de rato.

Na figura 4, células provenientes de animais selvagens para o gene do PrPc (camundongo +/+) e de animais "knockout" para este gene (camundongo -/-) foram semeadas sobre Ln. Inicialmente, independente de qualquer tratamento, observou-se que as células provenientes do animal "knockout" fazem 50% menos neuritos sobre Ln quando comparadas com as células do animal selvagem. Como observado para as células hipocâmpais de rato, anticorpos anti GST-PrPc inibem em aproximadamente 50% a neuritogênese induzida pela Ln quando comparado as células tratadas com anti-GST (controle negativo) e sem nenhum tratamento. Além disso, anticorpos anti GST e anti GST-PrPc não possuem nenhum efeito sobre a neuritogênese das células dos animais "knockout".

Figura 4 - Células hipocâmpais de animais "knockout" (-/-) possuem neuritogênese reduzida sobre Ln quando comparada à produzida por células de animais selvagens (+/+).

Neuritogênese promovida pela Ln em neurônios de animais selvagens é inibida por anticorpos anti-GSTPrPc e não é afetada por anticorpos anti-GST. Células derivadas de animais "knockout" apresentam taxa de neuritogênese menor que a apresentada pelas células dos animais selvagens e esta não é afetada por anticorpos anti-GSTPrPc. Os sinais * e ** mostram diferenças estatisticamente significativas com relação ao controle (teste Mann-Whitney para amostras não pareadas, $p < 0,05$)

A figura 5 mostra a neuritogênese dos mesmos tipos celulares da figura 4, contudo semeados sobre o peptídeo RNIAEIIKDI, domínio da Ln envolvido neste processo (Liesi e cols., 1989) e no qual o PrPc se liga (Mercadante, 2000, Graner et al., 2000a). Fato marcante observado é a quase ausência de neuritos (< 5%) em neurônios de animais "knockout" quando semeados sobre o peptídeo RNIAEIIKDI. Os neurônios de animais selvagens produziram neuritos (mais de 30%) muito semelhantemente aos observados quando as células são cultivadas sobre Ln (aprox. 38%). Esta neuritogênese foi inibida (< 5%) pelo anticorpo anti GST-PrPc a valores idênticos aos observados inicialmente para as células de animais "knockout". A diferença observada para o grupo controle (sem tratamento) e o grupo tratado com anti GST nas células dos animais selvagens não é estatisticamente significativa (teste Mann-Whitney para amostras não pareadas, $p < 0,05$).

Figura 5 - O peptídeo carboxi-terminal derivado da cadeia γ_1 da laminina estimula neuritogênese em células hipocâmpais de animais selvagens (+/+) mas não possui atividade em células de animais "knockout"(-/-).

Neuritogênese promovida pelo peptídeo derivado da cadeia γ_1 da laminina em células de animais selvagens é totalmente bloqueada com anticorpos anti-GSTPrPc e não é afetada com anticorpos anti-GST. Células de animais "knockout" não possuem atividade neuritogênica quando semeadas sobre este substrato. Os sinais * e ** mostram diferenças estatisticamente significativas com relação ao controle (teste Mann-Whitney para amostras não pareadas, $p < 0,05$).

Estes resultados substancialmente confirmam nossa hipótese inicial de trabalho que o PrPc pode funcionar como um receptor funcional para a Ln e que a seqüência RNIAEIIKDI é o principal, se não o único, domínio de interação com o PrPc, contido na Ln.

Outro importante ponto levantado foi quanto o papel do PrPc não só na extensão, mas também na manutenção de neuritos previamente estabelecidos e maduros sobre Ln. No endereçamento desta questão foi empregada a técnica de CALI (Chromophore-assisted laser inactivation), a qual possibilita a inativação fotoquímica (por radicais livres hidroxila) de proteínas previamente selecionadas com anticorpos específicos conjugados ao cromóforo verde malaquita (Jay e Keshishian, 1990). Esta técnica tem sido empregada com sucesso em diferentes modelos biológicos (Liao et al., 1994, Chang et al., 1995, Takei et al., 1999) e foi executada por outros membros do grupo (Dr. E. Graner) em colaboração com o Dr. Daniel G. Jay (Tufts University, School of Medicine, Boston, USA).

Foi possível observar, com a técnica de micro-CALI, uma acentuada retração do cone de crescimento de neuritos já estabelecidos sobre Ln, após inativação fotoquímica com laser do PrPc expresso na superfície celular (Graner et al., 2000b), sugerindo um papel do PrPc não só na adesão neuronal e crescimento dos neuritos, mas também na manutenção da sua estabilidade.

Caracterização da proteína receptora/ligante de PrPc 66 kDa

Nosso grupo, utilizando a teoria da hidropaticidade complementar (Brentani, 1988, Brentani, 1990) caracterizou uma proteína de 66 kD, presente na superfície de células neuronais, que se liga ao PrPc e medeia a neurotoxicidade do peptídeo PrP₁₀₆₋₁₁₆ (Forloni et al., 1993) em cultura primária de neurônios (Martins et al., 1997).

Inicialmente foram estabelecidas condições para se obter reprodutibilidade, de gel para gel, na separação eletroforética em duas dimensões das proteínas contidas na fração de extrato de cérebro de camundongo precipitada com 55% de sulfato de amônio (fração 55%), a qual já havia sido mostrada como estando enriquecida no receptor de 66kDa (Martins e col., 1997, Mercadante, 2000, Fig 2, linha 6). Esta reprodutibilidade é essencial já que os mesmos "spots" detectados por reação de "Western blotting" em membrana de nitrocelulose deveriam ser coletados em um outro gel de poliacrilamida, executado paralelamente, e corado com azul de Coomassie.

Após vários géis bi-dimensionais terem sido obtidos e o padrão de distribuição de "spots" ter sido praticamente o mesmo entre eles, alguns destes géis tiveram as proteínas transferidas para membranas de nitrocelulose e ensaiadas frente a anticorpos anti-HVATKAPHHGPCRSSA (doravante anti-peptídeo complementar), o qual se liga especificamente à proteína receptora de PrPc (Martins e cols., 1997).

Na figura 6, proteínas da fração 55% separadas em gel bi-dimensional foram coradas no próprio gel com solução de azul de Coomassie (painel A) ou analisadas por reação de "Western blotting" com anticorpos anti-peptídeo complementar (painel B). Pode ser observado que dois "spots" possuindo pI's 6,2 e 6,4, são reconhecidos pelo soro anti-peptídeo complementar (indicados por setas). Este ensaio foi repetido com três diferentes soros policlonais gerados contra o peptídeo complementar, tendo a reação de "Western blotting" revelada tanto com anticorpos secundários acoplados à peroxidase como à fosfatase alcalina. Levando-se em consideração a boa qualidade da separação

eletroforética, isto é, a ausência de duplicação de "spots" como artefato das condições experimentais empregadas, pode-se concluir que os "spots" são isoformas de uma mesma proteína com diferentes pI's. Este resultado sugere, por exemplo, uma modificação pós-traducional (e.g. fosforilação) que mude apenas a carga da proteína, sem alterar o seu peso molecular (Dunbar, 1990).

Comparando-se as diversas membranas de nitrocelulose reagidas com o soro anti-peptídeo complementar com os géis de poliacrilamida corados com o azul de Coomassie foi possível isolar, separadamente, cada um dos "spots" dos géis. Estas amostras foram digeridas com tripsina e os fragmentos trípticos gerados separados por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Tais fragmentos foram então submetidos à análise por espectrometria de massa, sendo esta feita em colaboração com o Dr. Alma Burlingame (Department of Pharmaceutical Chemistry, USCF, CA, USA). A análise levada a cabo resultou na identificação de ambos os "spots" como sendo a proteína "Stress Inducible Protein 1" (STI-1) (Blatch et al., 1997; Lässle et al. 1997).

Figura 6. Anticorpos anti-HVATKAPHHGPCRSSA reconhecem especificamente dois "spots" em de extrato de cérebro de camundongo fracionado em 55% de sulfato de amônio.

Conjunto de "spots" apresentado no mapa bi-dimencional do extrato de cérebro precipitado a 55% e corado com azul de Coomassie(A)-; Membrana de nitrocelulose com a coleção de proteínas apresentada em (A) submetida a reação de "Western blotting" com o soro anti-HVATKAPHHGPCRSSA (B). As setas no gel A indicam os dois "spots" submetidos ao microseqüenciamento e reconhecidos pelo soro anti-HVATKAPHHGPCRSSA na membrana B.

Após o laboratório ter em mãos a identidade do receptor de 66 kDa, um esforço coletivo foi desempenhado por vários membros do grupo para a clonagem da STI-1, inserção da seqüência codificadora em plasmídeo adequado à

expressão recombinante protéica em sistema de *E. coli* e purificação da STI-1 recombinante (rSTI-1) por cromatografia de afinidade a metal imobilizado.

A primeira pergunta feita foi se anticorpos anti-peptídeo complementar seriam capazes de reagir contra a rSTI-1, já que esta proteína foi isolada com o auxílio deste reagente.

Como pode ser observado na figura 7, anticorpos anti-peptídeo complementar reconhecem a proteína rSTI-1 (linha 4), da mesma forma que reconhece uma banda de 66 kDa na fração 55% de cérebros de camundongo (linha 6, Martins et al., 1997). Além disso, anticorpos policlonais produzidos em coelhos contra rSTI-1 reagem contra o antígeno purificado (linha 2) em ensaios de "Western blotting" e contra uma proteína presente na fração 55% (linha 8) com mesmo padrão eletroforético de migração da proteína reconhecida pelo anti-peptídeo (linha 6). A especificidade de ambos os anticorpos pode ser avaliada pela inexistência de reação cruzada com outras proteínas nestas amostras bem como a ausência de qualquer banda quando soros não-imune de coelho (linhas 3 e 9) e de camundongo (linhas 5 e 7) são empregados como controle negativo. Pôde-se estabelecer com este resultado, de maneira inequívoca, a identidade do receptor de 66 kDa inicialmente descrito mas não identificado (Martins e col., 1997), como sendo a proteína STI-1.

Como havia sido mostrado antes pelo grupo (Martins e col., 1997), apenas uma fração do receptor de 66 kDa (aproximadamente 6%) estava presente na membrana plasmática das células. Este resultado foi confirmado com anticorpos anti-rSTI-1 reagido com preparações protéicas de membrana de cérebros de camundongo (Fig. 8, linha 1), enquanto nenhuma positividade foi observada utilizando-se soro não-imune de coelho como controle negativo (Fig 8, linha 2). Para provar que esta proteína estava presente na membrana plasmática e voltada para o lado extracelular da membrana levou-se a cabo a marcação das proteínas extracelulares da linhagem neuronal N2a com biotina. Na Fig 8, linha 3 (seta), uma banda fortemente corada e de 66 kDa pôde ser precipitada com o auxílio de anticorpos anti-STI-1 evidenciando a presença da rSTI-1 na face externa da membrana plasmática.

A utilização de células N2a e preparações de membrana de cérebro de camundongo nos experimentos aqui descritos legitima os resultados anteriormente descritos (Martins et al., 1997), levando-se em conta que foi com estas ferramentas que o receptor/ligante de PrPc de 66 kDa foi inicialmente identificado.

Paralelamente a estes experimentos, a aluna de doutorado Marilene H. Lopes, verificou que a rSTI-1 ligava-se de maneira específica e saturável a proteína prion celular recombinante (rPrPc) independente de esta última estar ou não associada a íons Cu^{2+} . Foi possível mostrar em ensaios de ligação *in vitro* que a interação rPrPc-rSTI-1 possui uma constante de dissociação no equilíbrio (Kd) de $0,8 \times 10^{-7}\text{M}$, enquanto que o Kd é de $1,2 \times 10^{-7}\text{M}$, quando o rPrPc é renaturado em presença de íons Cu^{2+} . A presença de íons Cu^{2+} ligados á molécula de rPrPc foi confirmada pela técnica de espectrometria de emissão atômica, feita em colaboração com a Profa. Dra. Elizabeth de Oliveira (Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, USP). Além disso, confirmando o sítio de interação predito pela teoria da hidropaticidade complementar e descrito por nós previamente (Martins e col., 1997), a ligação rPrPc-rSTI-1 foi inibida (mais de 90%) com a utilização de peptídeos que compreendem a região neurotóxica do PrPc (aa 106-126). Concomitantemente, uma redução drástica nesta interação (mais de 85%) foi verificada quando o mutante rPrPc $\Delta 105-128$ foi empregado em ensaios de ligação. Paralelamente, o peptídeo STI-1₂₃₀₋₂₄₅ (ELGNDAYKKKDFDKAL), presente na seqüência da STI-1 que apresentando perfil de hidropaticidade semelhante ao do peptídeo complementar, também foi capaz de inibir a interação rPrPc-rSTI-1 de maneira específica, enquanto outros peptídeos da mesma proteína, utilizados como controle, não tiveram qualquer efeito sobre a ligação.

Figura 7. A STI-1 é a proteína receptora de PrPc de 66 kDa reconhecida pelo soro anti-peptídeo complementar

Proteínas rSTI-1 (linhas 1-5) ou da fração 55% de cérebro de camundongos (linhas 6-9) foram separadas eletroforéticamente e submetidas a reação de "Western blotting" frente anticorpos anti-STI-1 (α STI-1, 1:10.000 linhas 2 e 8) e soro anti-peptídeo complementar (α -pep, 1:1000, linhas 4 e 10). Soros não imune de coelho (linhas 3 e 9) e camundongo (linhas 5 e 7) foram utilizados como controle negativo da reação.

Figura 8: A proteína STI-1 está localizada na superfície de células N2a e está presente em preparações de membrana plasmática de cérebros de camundongo.

Frações protéicas enriquecidas com proteínas da membrana plasmática de cérebros de camundongo (linhas 1 e 2) foram separadas por SDS-PAGE e submetidas a reação de "Western blotting" com anticorpos anti-STI-1 (α STI-1, 1:10.000 linha 1) e soro não imune de coelho (linha 2), seguida de reação com anticorpo secundário anti-Ig de coelho acoplado a peroxidase. Proteínas presentes na superfície de células N2a foram marcadas com biotina e os lisados celulares submetidos a reação de imunoprecipitação com anticorpos anti-STI-1 (α STI-1, 6 μ g, linha 3) e IgG irrelevante de coelho (NI, 6 μ g, linha 4). Imunocomplexos foram resolvidos por SDS-PAGE e reação de "Western blotting" levada a cabo com o complexo avidina-peroxidase.

Os ensaios de ligação são indicadores quantitativos razoáveis para a determinação de constantes de dissociação e das afinidades relativas entre proteínas que interagem entre si. Entretanto, levando-se em consideração a simplicidade reacional normalmente empregada neste tipo de ensaio, procurou-se outros modelos que estavam mais próximos da complexidade observada em sistemas biológicos. Além disso, os ensaios de ligação levados a cabo empregaram apenas proteínas expressas em sistema bacteriano, as quais podem estar destituídas de modificações pós-traducionais importantes para a função destas proteínas em eucariotos.

Na tentativa de verificar se rPrPc era capaz de ligar-se a STI-1 no contexto celular foram utilizadas células que expressavam ectopicamente STI-1 fundida com GFP (green fluorescence protein). Inicialmente, células HEK 293T transfectadas ou não com vetores de expressão pEGFP ou pEGFP-STI-1 foram submetidas a incubação com rPrPc e analisadas por citometria de fluxo utilizando soros anti-rPrPc e não imune de camundongo.

Na figura 9 pode ser observado um o aumento na detecção de PrPc presente na superfície celular após incubação das células expressando GFP-STI-1 com rPrPc. Tal aumento é específico para células que expressam GFP-STI-1 já que as não transfectadas ou expressando GFP não apresentaram diferença na positividade para o PrPc após incubação com 20 ug de rPrPc. Outro fato observado é que as células não transfectadas expressam PrPc na sua superfície e que a expressão aumentada de GFP-STI-1 não altera a quantidade de PrPc presente na superfície destes tipos celulares (Fig 9, sem tratamento com rPrPc). Estes dados indicam que o PrPc residente pode competir com o rPrPc pela interação de ligantes na superfície celular

Este fato foi reforçado pela observação que rPrPc liga-se à superfície celular de fibroblastos primários de animais PrP^{-/-}. O rPrPc ligado foi detectado por ensaio de citometria de fluxo utilizando-se anticorpos anti-rPrPc (Fig 10, pico c), enquanto que células não incubadas com rPrPc ou que foram reveladas com soro não-imune de camundongo não apresentaram positividade (picos a e b, respectivamente). Deve ser salientado que tal interação se deve não só pela

presença da STI-1 na superfície da célula, mas pela provável presença de outros ligantes de rPrPc.

Na tentativa de mostrar que a STI-1 é um dos ligantes da superfície celular para o PrPc, realizamos ensaios de “pull-down” (Rohm et al, 2000b; Zanata et al., 2002). Esta abordagem consiste no isolamento de proteínas ligantes de rPrPc, o qual é imobilizado por cromatografia de afinidade a íon metálico. Desta forma, fibroblastos imortalizados de embriões PrP^{-/-} (Büeler et al., 1992) foram empregados como fonte de STI-1 eucariótica e rPrPc incubado com esta linhagem.

Figura 9. O rPrPc liga-se a GFP-STI-1 expressa ectopicamente na superfície de células HEK 293T

Células transfectadas com pEGFP-STI-1 (azul), pEGFP (amarelo) e não transfectadas (vermelho) foram incubadas (20µg/condição) ou não com His₆-PrPc por 2 horas a 4°C e depois de duas lavagens com PBS, incubadas com anti-rPrPc (1:100) ou soro não imune de camundongo (1:100), seguido de anti-Ig camundongo acoplado com R-Phycoerythrin (PE). A intensidade de fluorescência foi captada e analisada pelo citômetro FACScan (Becton Dickinson, San Diego, CA) sendo representada pela subtração da fluorescência obtida para o soro não imune de camundongo daquela obtida para o anti-rPrPc. Os valores representam a média de três experimentos e as barras verticais os desvios padrões. Os sinais * e ** mostram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Teste t para amostras pareadas, p<0,05)

Figura 10. O rPrPc associa-se a ligantes presentes na superfície celular

Cultura primária de fibroblastos de animais PrP^{-/-} foram incubados na ausência (b) e presença (c) de His₆-PrPc (20µg) por 2 horas a 4°C e depois de duas lavagens com PBS incubado com anti-rPrPc (1:100, picos b e c) ou soro não imune de camundongo (1:100, pico a), seguido de anti-Ig camundongo acoplado com FITC. A intensidade de fluorescência foi captada e analisada pelo citômetro FACScan (Becton Dickinson, San Diego, CA)

Na Fig 11, painel superior, pode ser observado que a STI-1 foi precipitada em associação tanto quando células inteiras (linha 2) como quando apenas extrato celular (linha 1) foram utilizados como fonte de STI-1 (linha 3). Nenhuma proteína é isolada quando extrato celular é incubado apenas com resina (controle negativo, linha 4), mostrando que a precipitação de STI-1 nestas condições experimentais depende da presença de rPrPc. A presença de rPrPc ligada a matriz Ni²⁺-NTA-Agarose foi confirmada com anticorpos anti-rPrPc (Fig 11, painel inferior).

Estes dados sugerem fortemente que rPrPc se liga a superfície celular e que parte desta ligação é mediada pela proteína STI-1 expressa também na superfície celular. Contudo a utilização de rPrPc não excluía a possibilidade das interações serem um artefato intrínseco da molécula de PrPc, pois esta não sofre os mesmos tipos de modificações pós-traducionais que o PrPc expresso em eucariotos esta sujeito (e.g. glicosilação).

Figura 11. A proteína STI-1 expressa em fibroblastos PrP^{-/-} é precipitada com rPrPc

Fibroblastos PrP^{-/-} intactos (linha 2) ou extratos celulares (linha 3) foram pré-incubados com His₆-PrPc por 2 horas. Células inteiras foram lavadas, lisadas e extratos celulares incubados com resina Ni-NTA-Agarose por 1 hora. Extratos (linha 1) de células que não receberam pré-incubação com His₆-PrPc foram incubados com resina Ni-NTA-Agarose e utilizados como controle negativo (linha 4). Após extensiva lavagem, proteínas presentes nos beads foram eluídas com tampão de amostras e analisadas por "Western blotting" com anti-STI-1 (α-STI-1, 1:10000 painel superior) ou anti-PrPc (α-PrPc, 1:1000, painel inferior).

Ensaio de co-imunoprecipitação foram assim levados a cabo utilizando-se células HEK 293T transfectadas e co-transfectadas com os vetores de expressão pEGFP-PrPc, pEGFP-STI-1.

Na figura 12 pode ser observada que a proteína STI-1 (66 kDa) expressa endogenamente e a GFP-STI-1 (96 kDa) expressa ectopicamente, são ambas reconhecidas pelo anticorpo anti-rSTI-1 (linhas 1 e 2), enquanto apenas GFP-PrPc (50-58 kDa) é reconhecido pelo anticorpo anti-rPrPc (linha 3). Já foi mostrado pelo nosso grupo (Cabral et al., 2001) e outros grupos (Scott et al., 1989) que a detecção direta de PrPc endógeno por técnica de "Western blotting" é baixa, sendo necessário muitas vezes o emprego da técnica de incorporação metabólica das proteínas celulares com metionina isotopicamente marcada com ³⁵S, seguida de imunoprecipitação, ou a utilização de citometria de fluxo (Cabral et al., 2001).

Quando células co-expressando GFP-PrPc e GFP-STI-1 tiveram proteínas da face externa da membrana plasmática marcadas com biotina e os extratos celulares submetidos a reação de imunoprecipitação utilizando anticorpos anti-rPrPc, algumas bandas foram observadas após revelação das membranas de nitrocelulose com conjugado avidina-peroxidase (linha 5). A banda de 55-58 kDa representa EGFP-PrPc expresso na superfície da célula enquanto a identidade da banda de 96 kDa é provavelmente EGFP-STI-1, levando-se em consideração dois pontos. O primeiro é quanto à especificidade do anticorpo anti-rSTI-1 no reconhecimento apenas da STI-1 e/ou GFP-STI-1 (linhas 1 e 2), e a completa ausência de qualquer banda de 96 kDa quando apenas GFP-PrPc é expresso nas células HEK 293T, e o extrato celular submetido a reação de imunoprecipitação utilizando anti-STI-1 (resultado não mostrado). O segundo ponto é que a mesma banda de 96 kDa é reconhecida pelo anticorpo anti-STI-1 quando esta membrana é submetida à reação de "Western blotting" (linha 6), indicando assim que GFP-STI-1 é expressa na superfície celular e co-imunoprecipitada com GFP-PrPc.

Nas condições experimentais empregadas não foi possível co-imunoprecipitar a STI-1 endógena, provavelmente pela baixa expressão desta molécula na superfície celular e a baixa sensibilidade do método empregado. A especificidade do anti-PrPc utilizado pode ser verificada pela ausência de bandas quando soro não-imune foi usado nas reações de imunoprecipitação (linha 4). Além disso, co-imunoprecipitação não foi um evento relacionado à expressão da proteína de fusão GFP com a STI-1, pois quando GFP-PrPc é co-expresso com GFP ancorado a membrana plasmática por âncora de GPI (Nichols et al., 2001), nenhuma proteína marcada com biotina e com migração eletroforética aparente de 26 kDa é imunoprecipitada com anti-rPrPc (resultado não mostrado).

Um controle adicional (não mostrado) da técnica de biotilação foi empregado para se garantir que moléculas intracelulares não estavam sendo marcadas com biotina. Moléculas de PrPc que não possuem o peptídeo sinal são mantidas seqüestradas dentro da células, como foi observado pelo nosso grupo (Lee et col., 2001a), e não são reconhecidas na reação de "Western blotting" com conjugado avidina-peroxidase, após reação de imunoprecipitação com anti-rPrPc.

Acreditamos desta forma que o PrPc interage com a STI-1 no contexto celular e que pelo menos parte da interação PrPc-STI-1 ocorre na superfície celular.

Figura 12: PrPc co-imunoprecipita com STI-1 presente na superfície celular

Extratos de células HEK 293T transfectadas com pEGFP-STI-1 (linha 2) e pEGFP-PrPc (linha 3) e não transfectadas (linha 1) foram separadas por SDS-PAGE e submetidas a reação de "Western blotting" com anticorpos anti-STI-1 (α STI-1, 1:10.000 linhas 1 e 2) e anti-rPrPc (1:1000, linha 3). Proteínas da superfície de células co-transfectadas com os plasmídeos pEGFP-STI-1 e pEGFP-PrPc foram marcadas com biotina e lisados celulares submetidos a reação de imunoprecipitação com anticorpos anti-rPrPc (6 μ L, linhas 5 e 6) e soro irrelevante de camundongo (NI, 6 μ L, linha 4). Imunocomplexos foram resolvidos por SDS-PAGE e reação de "Western blotting" levada a cabo com o complexo avidina-peroxidase (linhas 4 e 5) ou anti-STI-1/anti-Ig de coelho-peroxidase (linha 6).

Discussão

Relevância biológica da Interação PrPc-Ln

Um dos maiores desafios da ciência tem sido entender, sob o aspecto molecular, os caminhos que permitem o sistema nervoso modificar as conexões neuronais existentes (plasticidade neuronal). Estas modificações respondem, em última análise, a processos tão complexos quanto memória, aprendizado e cognição.

Uma vez estabelecido que o rPrPc ligava-se especificamente, com alta afinidade e de maneira saturável com a Ln, e que o sítio de interação com o PrPc está contido no domínio RNIAEIIKDI da cadeia $\gamma 1$ (Mercadante, 2000, Graner et al., 2000a), procurou-se investigar qual seria a função fisiológica de tal interação.

O fato de o PrPc possuir expressão ubíqua, sendo mais acentuada em tecidos pertencentes ao sistema nervoso (revisado por Prusiner, 1997) e levando-se em consideração o papel já bem estabelecido da Ln em diversos modelos de diferenciação celular (Tomaselli et al., 1988, Liesi et al., 1992, Liesi et al., 1995, Rivas et al., 1995), em particular com neuritogênese (Tomaselli et al., 1987, Turner et al., 1989), aventou-nos a possibilidade da interação PrPc-Ln estar envolvida no processo de crescimento de neuritos.

Enquanto trabalhos mais antigos apontam para a presença de Ln na parede de vasos do sistema vascular cerebral (Bignami et al., 1984), outros trabalhos utilizando anticorpos anti-Ln gerados a partir de outras fontes que não Ln-1 (oriunda do rabdomiosarcoma murino EHS), incluindo um painel de anticorpos monoclonais com reatividade bastante variada, mostraram intensa reatividade em estruturas hipocâmpais (Yamamoto et al., 1988, Hagg et al., 1989), em particular correspondendo à cadeia $\alpha 2$ (Hagg et al., 1997).

Concomitantemente, enquanto a cadeia $\alpha 2$ parece estar presente nos botões sinápticos e dendritos, ambas as cadeias $\beta 1$ e principalmente $\gamma 1$ estão distribuídas por todo o cérebro, contudo estando concentradas no corpo celular e extensões proximais. Desde que ambas cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ podem associar-se com as mesmas cadeias β e γ , o resultado aqui apresentado é consistente e correlaciona a

presença da Ln-2 ($\alpha 2\beta 1\gamma 1$) no hipocampo, e o efeito biológico *in vitro* observado tanto nas células PC-12 como nas culturas neuronais primárias frente à Ln-1. A distinta distribuição e concentração de cadeias individuais da Ln têm sido explicadas ou por diferentes taxas de “turnover” das cadeias ou a possibilidade da cadeia $\alpha 2$ associar-se no cérebro a outras cadeias ainda não identificadas (Hagg et al., 1997). De fato, nos últimos anos novas cadeias β e γ tem sido descobertas, aumentando a complexidade da família das Ln, contudo nenhum peptídeo homólogo ao do domínio $\gamma 1$ descrito neste trabalho foi encontrado nas cadeias $\gamma 2$ ou $\gamma 3$ (Koch et al., 1999).

Os resultados apresentados mostram que o bloqueio do PrPc, ancorado na superfície celular inibe a formação de neuritos.

A utilização da linhagem PC-12 como modelo de neuritogênese (Tomaselli et al., 1987, Turner et al., 1989) foi a ferramenta inicial para análise do envolvimento do PrPc neste processo. O bloqueio do crescimento dos neuritos com anticorpos anti-PrPc quando este crescimento era induzido pelo pré-tratamento das células com NGF- β (5 dias) e semeadura destas sobre Ln sugeria que a Ln estava envolvida no processo, contudo não conectava a interação PrPc-Ln diretamente com a neuritogênese. Interessantemente, a linhagem PC-12 pode produzir neuritos se diferenciada com FGF/cAMP (Ho e Raw, 1992) na ausência de Ln, sendo que anticorpos anti-PrPc são ineficazes em bloquear a neuritogênese induzida por estas moléculas (E.Graner, dados não publicados), sugerindo assim que o PrPc estaria envolvido apenas na diferenciação induzida pela via do NGF- β e Ln

Apesar de consistentes e informativos os resultados obtidos com a linhagem PC-12, a utilização de linhagens, além disso, tumorais implica em certas limitações. Já a utilização de neurônios em cultura primária dispensa o pré-tratamento das células com NGF- β , possuindo as células capacidade de estender neuritos apenas sob influência das moléculas empregadas como suporte adesivo e dos fatores intrínsecos secretados pelas próprias células.

A inibição obtida pelo anti-PrPc nas células semeadas sobre Ln foi parcial tendo em vista que outros receptores celulares também estão envolvidos neste

processo (Luckenbill-Edds, 1997; Tomaselli et al., 1990). Já a extensão de neuritos é quase que totalmente bloqueada quando o substrato utilizado é o peptídeo RNIAEIIKDI. Muito recentemente (Liesi et al., 2001), foi mostrado que apenas o tripeptídeo KDI é responsável pela atividade biológica do decapeptídeo RNIAEIIKDI (Liesi et al., 1989).

Até a obtenção dos nossos resultados nenhum receptor celular para o domínio neuritogênico RNIAEIIKDI da Ln havia sido descrito. Quando este domínio foi descrito como possuidor de atividade neuritogênica supôs-se que talvez alguma integrina se ligasse a ele, promovendo assim a diferenciação celular (Liesi e cols., 1989), contudo, até o momento, o papel das integrinas neste fenômeno não está ainda elucidado. Os resultados aqui mostrados sugerem fortemente que o PrPc é o receptor celular deste domínio da Ln, e que os sinais desencadeados a partir do meio extracelular por esta via dependam exclusivamente desta interação.

Os resultados aqui apresentados indicam que o PrPc participa na formação de neuritos em conjunto com outros ligantes de Ln, desde que anticorpos anti-PrPc bloqueiam parcialmente este fenômeno em neurônios de animais normais. Por outro lado, tais ligantes não substituem completamente o PrPc, visto que a neuritogênese induzida pela Ln em neurônios PrP^{-/-} é 50% menor da que observada para células PrP^{+/+}. O PrPc, entretanto, parece compensar os sinais desencadeados pelos outros ligantes de Ln levando-se em consideração que a neuritogênese de células de rato e camundongo selvagens são muito semelhantes quando cultivadas tanto sobre Ln como o peptídeo RNIAEIIKDI. A hipótese de que outros ligantes do domínio RNIAEIIKDI ainda não caracterizados poderiam estar atuando nestes neurônios fica severamente enfraquecida quando se observa quase que a completa ausência de neuritogênese das células PrP^{-/-} sobre este peptídeo. Entretanto a atuação destes ligantes hipotéticos do domínio $\gamma 1$, em conjunto com o PrPc, nas células selvagens não pode ser completamente descartada.

Fica evidente que o número de possibilidades testadas para os possíveis domínios na Ln nos quais o PrPc podia interagir foi extremamente limitado

(apenas 3 peptídeos testados). De fato, havia outras quatro seqüências dentro da cadeia $\gamma 1$ passíveis de serem testadas, contudo tais domínios estavam relacionados apenas com adesão celular e não possuíam atividade neuritogênica. (Nomizo et al., 1997).

É sabido que o processo de formação de neuritos é vital para o desenvolvimento neuronal na embriogênese e está intimamente ligado ao fenômeno de plasticidade sináptica no animal adulto.

Os resultados aqui apresentados talvez pareçam um pouco contraditórios a luz da viabilidade dos animais PrP^{-/-} durante o desenvolvimento e sobrevivência pós-natal (Büeller et al., 1992). Contudo, a falta de alterações fenotípicas óbvias tem sido observada em outros modelos (Nagase et al., 1979, Goebel e Petes, 1986, Ferguson et al., 1989, Elkins et al., 1990) e pode ser explicada facilmente pela substituição da proteína ausente por uma outra que preencha seu lugar funcional ou pela redundância de vias que levariam ao mesmo fenótipo (Routtenberg, 1995).

Além das vias clássicas de neuritogênese induzidas pelo sistema Ln/integrina e outros receptores do tipo não integrínicos (Lukenbill-Edds, 1997) propomos a existência de uma nova via, a qual envolve o PrPc. Não sabemos ainda se esta via de alguma maneira cruza as vias já descritas; contudo a existência de vias independentes para processo tão importante seria mais do que razoável e necessário, explicando a aparente normalidade dos animais PrP^{-/-} (Büeler e cols., 1992), apesar destes possuírem alterações descritas por vários grupos (Collinge et al., 1994; Sakagushi et al., 1996; Kuwahara et al., 1999), incluindo o nosso (Roesler et al., 1999; Walz et al., 1999).

Esta etapa do trabalho permite concluir que o PrPc é um receptor para a Ln e este receptor tem como função mediar parte da diferenciação celular estimulada por esta molécula da matriz extracelular.

Caracterização da proteína receptora/ligante de PrPc 66 kDa

Desde a caracterização inicial da proteína receptora de PrPc (Martins et al., 1997), nosso grupo vem tentando buscar a real identidade desta proteína. Várias tentativas foram feitas nesta busca, sendo que durante muito tempo optou-se pela varredura de bibliotecas de expressão com a utilização de anticorpos anti-peptídeo complementar ou clonagem direta do receptor utilizando-se oligonucleotídeos com seqüência degenerada e baseada na fita anti-senso do PrPc. Ambas as abordagens haviam sido frutíferas para outros exemplos de pares protéicos que interagiam entre si do modo previsto pela teoria da hidropaticidade complementar (Ruiz-Opazo et al., 1995). Contudo no nosso caso tais métodos mostraram-se ineficientes seja pela limitada disponibilidade de anticorpos policlonais anti-peptídeo e a necessidade de grandes quantidades deste reagente para a varredura das bibliotecas, seja pela qualidade e baixa especificidade dos clones detectados com a técnica utilizando oligos degenerados. Foi empregada também a técnica de separação eletroforética em duas dimensões (gel bi-dimensional) utilizando o sistema descrito por O'Farrell (1975). Apesar de engenhoso, o método mostrou-se ineficiente devida à baixa reprodutibilidade dos mapas protéicos obtidos.

Entretanto, após aquisição pelo laboratório de sistema bi-dimensional de melhor eficiência (Multiphor II, Amersham-Pharmacia), foi possível a utilização desta técnica cromatográfica que emprega dois parâmetros discretos de separação, - focalização isoeétrica e separação protéica por peso molecular - para o isolamento da proteína de 66 kDa a partir de uma mistura complexa de proteínas.

A alta reprodutibilidade obtida, permitiu um posicionamento exato da proteína receptora de PrPc nos mapas protéicos de duas dimensões. O sistema Multiphor II utilizada gradientes de pH imobilizados (IPG dry strip) em malha de acrilamida (Görg et al., 1995) ao contrário do método utilizado por O'Farrell (1975) no qual um gradiente com anfólitos é formado apenas no momento da eletroforese.

Mostramos (Fig. 6) que o anticorpo anti-peptídeo complementar é capaz de reagir com apenas dois "spots" dentre uma vasta coleção de proteínas separadas e imobilizadas na mesma membrana. Levando-se em conta o número de vezes que tal ensaio foi levado a cabo (n=5), o número de diferentes anticorpos anti-peptídeo testados e que apresentaram o mesmo perfil de positividade (n=4), e a especificidade da reação (Figura 7, linhas 6 e 7), pode-se concluir que os "spots" sistematicamente reconhecidos pelo anti-peptídeo são de fato o receptor de 66 kDa e poderiam representar isoformas da mesma proteína. Como consequência desta reprodutibilidade tanto na separação eletroforética como na análise por "Western blotting" dos extratos protéicos foi possível o isolamento dos "spots" apresentados no gel A (Fig 6), e a caracterização química da seqüência primária dos aminoácidos formadores dos "spots".

O seqüenciamento de cada um dos "spots" separadamente resultou na mesma proteína: "Stress Inducible. Protein-1" (STI-1) (Blatch et al., 1997; Lässle et al. 1997). De fato nossa hipótese, de que os "spots" representavam diferentes graus de fosforilação, foi confirmada na literatura (Lässle et al. 1997).

Na análise da seqüência da STI-1 há uma região com perfil de hidropaticidade muito semelhante ao do peptídeo complementar (Fig 13) o qual compreende o domínio STI-1₂₃₀₋₂₄₅. Esta foi realizada utilizando o programa HYDROPAT (S. Jacchieri et al., manuscrito em preparação) o qual leva em consideração a semelhança hidropática (Kyte e Doolittle, 1982) do conjunto de aminoácidos presentes em uma proteína quando comparada a outra seqüência polipeptídica. A utilização de programas de alinhamento do tipo BLAST, o qual avalia a identidade (e.g. glicina=glicina) ou semelhança de carga (e.g. valina=leucina), mostra-se inadequado para esta abordagem. Segundo a teoria da hidropaticidade complementar (THC) (ou reconhecimento molecular) o parâmetro que realmente importa na evolução das estruturas polipeptídicas é o perfil hidropático e não a identidade/homologia das cadeias polipeptídicas (Brentani, 1988, 1990)

O domínio de interação entre o colágeno e a collagenase, previsto THC, pode ser um bom exemplo da afirmação acima (de Souza e Brentani, 1992). As

seqüências TKKTLRT e SSNTLRS foram geradas a partir da fita complementar de DNA das cadeias alfa2(I) e alfa1(I) do colágeno. Pela THC, perfil hidropático semelhante deveria estar presente na seqüência de aminoácidos do ligante proposto, no caso colagenase. A hipótese foi confirmada, pois na colagenase de fibroblasto está presente a seqüência SQNPVQP, no qual o colágeno se liga, e possuindo perfil hidropático praticamente igual ao dos peptídeos acima, mas com praticamente nenhuma identidade de aminoácidos (comparar SQNPVQP com TKKTLRT e SSNTLRS) (de Souza e Brentani, 1992).

Figura 13. Perfil hidropático do peptídeo STI-1₂₃₀₋₂₄₅ (ELGNDAYKKKDFDKAL, ●-● STI-1 pep.1) e do peptídeo HVATKAPHHGPCRSSA predito pela THC (□-□, predicted pep)

Já o conjunto de dados quantitativos obtidos para a interação rPrPc-rSTI-1 (Marilene H. Lopes, tese de doutorado, Zanata et al., submetido) incluindo as inibições desta ligação com peptídeos quimicamente sintetizados ou proteínas mutantes, mostra claramente que os sítios de interação entre estas proteínas eram PrPc₁₁₃₋₁₂₈ e STI-1₂₃₀₋₂₄₅. e que esta interação não é afetada pela presença de íons Cu²⁺ ligados ao rPrPc. Deve ser salientado que tais sítios de interação

havia sido preditos pela THC, de modo que reforçam o conceito da THC e sua aplicabilidade em diversas situações biológicas.

De fato, esta teoria tem recebido muitas críticas na literatura. Enquanto os opositores não medem esforços em desmerecê-la (revisado por Houen, 1999), grupos que a utilizam sem preconceito ou fanatismo, podem desfrutar do poder de predição deste conceito (revisado por Baranyi et al., 1995).

A próxima etapa deste trabalho foi a avaliação da possibilidade de interação da STI-1 com o PrPc em modelos biológicos mais palpáveis. Tinha-se em conta que apesar de informativos, os ensaios de ligação apresentavam certas limitações frente a sistemas biológicos mais complexos.

O ensaio de “pull-down” empregado neste trabalho foi uma modificação do utilizado para avaliar a interação do domínio citoplasmático da Plexina A1 com as GTPases Rnd1 e RhoD (Rohm et al., 2000a, Zanata et al., 2002) e para a avaliação da estequiometria de formação de receptores de glicina (Nicke et al., 1998) em oócitos de *Xenopus*. Esta técnica mostrou-se satisfatória em mostrar que o rPrPc podia-se ligar ao STI-1 produzido pela célula.

Já a utilização do sistema de expressão ectópica de proteínas empregando células HEK 293T foi baseada em resultados obtidos tanto na co-precipitação do complexo Plexina A1/Neuropilina-1, os quais são co-receptores de Semaforina 3A (Rohm et al., 2000a), como na caracterização do heterotrímero DCC/netrina/receptor de adenosina A₂, também responsável por navegação neuronal. (Corset et al., 2000). Com esta metodologia também foi possível mostrar a interação PrPc e STI-1, reforçando tanto os ensaios de “pull down” como os de ligação *in vitro*.

O conjunto destes resultados mostra que modificações pós-traducionais ausentes em procariotos (no caso *E. coli*) não apresentam papel fundamental na interação PrPc-STI-1 *per se*, contudo não pode ser descartada que tais modificações sejam importantes na fina regulação da ligação entre outros parceiros protéicos com PrPc-STI-1, bem como na formação de estruturas macromoleculares diretamente relacionadas com o desempenho funcional destas proteínas nas células.

Em 1997, o grupo de S. Weiss (Rieger et al., 1997) descreveu a interação do PrPc com o receptor de Ln de 37/66 kDa. Mais recentemente, o mesmo grupo publicou dois artigos melhor caracterizando a natureza desta interação bem como o mapeamento dos sítios de interação tanto no PrPc, como no receptor de Ln (Hundt et al., 2001, Gauczynski et al., 2001). O trabalho inicial deste grupo foi publicado no mesmo volume do periódico onde o nosso grupo publicou a caracterização de um receptor de PrPc através da THC (Martins et al., 1997), como ambas as proteínas possuíam 66 kDa, foi levantada a hipótese de terem a mesma identidade (Mitchell, 1997). Antes mesmo da identificação do receptor de PrPc 66 kDa como sendo a STI-1 tínhamos evidências de que tanto o nosso receptor como o de Ln se comportavam de maneira distinta. Além do receptor de Ln de 37/66 kDa possuir *pl* diferente ao observado para o receptor de PrPc (*pl*'s 6,2 e 6,4), não foi possível detectar os "spots" característicos do receptor de PrPc utilizando anticorpos anti-receptor de Ln (gentilmente fornecido pela Dra. Sylvie Mènard, Instituto de Patologia, Universidade de Milão, Itália) (S. Zanata, dados não publicados).

A forma madura de 66 kDa do receptor de Ln é formada pela dimerização e extensiva acetilação do precursor de 37 kDa. O tratamento da forma madura de 66kDa com hidróxilamina converte esta proteína no seu precursor de 37 kDa (Buto et al., 1998). Foi possível verificar que anticorpos anti-peptídeo complementar não reconheciam uma proteína 37 kDa após tratamento de extrato protéico com hidróxilamina, enquanto o anticorpo anti-receptor de Ln de 37/66 kDa reconhecia (S. Zanata e A.L.B.Cabral, dados não publicados). Finalmente este mesmo anticorpo não foi capaz de reagir com a STI-1 purificada (S. Zanata, dados não publicados), o que de maneira inequívoca invalidou a hipótese de que a proteína identificada pelo grupo alemão era a mesma identificada por nós.

A localização celular da STI-1 foi descrita como sendo predominantemente citoplasmática (Lässle et al., 1997). Estes dados confirmam os previamente publicados por este grupo os quais mostravam que apenas uma fração do receptor/ligante de PrPc (ca. 6%) estavam presentes na superfície celular.

(Martins et al., 1997), permanecendo o restante em outros compartimentos celulares.

De fato, causa certa estranheza que uma proteína desprovida de domínio transmembrânico e de peptídeo signal que a transporte para fora (Lässle et al., 1997) tenha sido detectada por nós na face externa da membrana plasmática. Isso explicaria por que apenas 6 % da proteína total estariam presentes na face externa da membrana, sugerindo que sua transladação para este domínio da célula não deve seguir rotas clássicas de transporte.

Há exemplos na literatura que muitas proteínas intracelulares, tais como actina, anexina, nucleolina, citoqueratina 1 e 18, as quais espera-se estarem confinadas no ambiente citoplasmático, mas que também são encontradas na superfície celular onde possuem funções específicas, como receptores de proteínas plasmáticas (Semenkovich et al., 1990; Moroianu et al., 1993; Hajjar et al., 1994, Schmaier, 1997; Wells et al., 1997) e parasita (Magdesian et al., 2001). Assim especula-se que tais proteínas estão projetadas na membrana plasmática como parte de complexos macromoleculares ou secretadas por vias claramente distintas das rotas que empregam o retículo endoplasmático ou o complexo de Golgi (Muesch et al., 1990).

Poderia-se propor então que a STI-1 é secretada para o meio extracelular e a proteína detectada na superfície está lá apenas momentaneamente, esperando por sinais celulares que promovam sua liberação da superfície. Os resultados que o laboratório possui no momento são muito preliminares para uma resposta definitiva.

Secretada ou não, a STI-1 poderia ser transportada para a membrana celular em associação com outras proteínas, hipótese esta reforçada pela detecção desta proteína no complexo de Golgi e em pequenas vesículas (Honoré et al., 1992).

Acreditamos que apenas um domínio da STI-1(aa.230-245), o qual se liga ao PrPc, deva estar exposto na superfície celular. Esta hipótese foi levantada levando-se em conta que anticorpos gerados contra o peptídeo complementar, o qual mimetiza este domínio da STI-1, liga-se à superfície de diversos tipos celulares, entre os quais a linhagem N2a (Martins et al., 1997) em ensaios de

citometria de fluxo. Entretanto, anticorpos policlonais anti-STI-1 não foram capazes de se ligar às células N2a no mesmo tipo de ensaio. Isso pode ser então explicado pela baixa representatividade de imunoglobulinas contra o domínio específico da STI-1 exposto na superfície celular. Por sua vez o anticorpo policlonal anti-peptídeo complementar teria uma coleção mais representativa de imunoglobulinas contra este domínio da STI-1, sendo mais eficiente no seu reconhecimento. Além disso, não pode ser descartada a possibilidade de simplesmente o anti-STI-1 não ser eficaz no reconhecimento do antígeno nas condições do experimento de citometria de fluxo, enquanto o é em outros ensaios, tais como “Western blotting” e imunoprecipitação.

Foi descrito na literatura que a STI-1 é fosforilada por cinases, em particular pela caseína cinase II (CK-II), sendo a função deste evento sobre a distribuição celular desconhecido (Longshaw et al., 2000). Levando-se em conta que a CK-II é uma das poucas proteínas cinases presentes na face extracelular da membrana plasmática (Walter et al., 1996) e que o PrPc pode também ser fosforilado por esta proteína (Negro et al., 2000) e regular sua atividade enzimática (Meggio et al., 2000), especulamos que o grau de fosforilação tanto da STI-1 como do PrPc pode ajustar o grau de associação entre estas moléculas e as eventuais cascatas de sinalização desencadeadas a partir desta associação/dissociação.

Além da membrana plasmática, o PrPc pode ser encontrado em organelas celulares tais como complexo de Golgi (Lee et al., 2001a) e endossomos de reciclagem (Lee et al., 2001b). Entretanto, o PrPc está sujeito a ubiquitinação e degradação por sistema de proteassomo (Yedidia et al., 2001) podendo ser encontrado inclusive no compartimento citoplasmático devido ao sistema de controle de qualidade do processamento de proteínas durante sua síntese (Ma & Lindquist, 2001). Normalmente o PrPc não pode ser detectado no citoplasma ao menos que um inibidor de proteassomo seja utilizado. Em outras palavras o PrPc selvagem, sintetizado pela célula, não deveria encontrar a forma citoplasmática da STI-1. Contudo, uma molécula mutante de PrPc (D117N), a qual está associada a uma forma hereditária e transmissível de encefalopatia espongiforme, acumula-se no citoplasma e co-localiza-se com HSP70 (Ma & Lindquist, 2001). Deve ser

lembrado que a HSP70 forma normalmente um complexo multiprotéico com a STI-1 e a HSP90 (Lässle et al., 1997). Devido ao fato que a exposição do PrPc ao ambiente citoplasmático favorece a formação de moléculas com conformação PrPsc (Ma & Lindquist, 1999) e que este mesmo ambiente favorece a atividade de chaperonina da STI-1 associada as proteínas HSP70 e HSP90 (Lässle et al., 1997), poderíamos propor que a forma citoplasmática da STI-1 possuiria algum papel no mecanismo de conversão do PrPc em PrPsc.

Se a interação PrPc-STI-1 ocorre em outros domínios celulares sob outros contextos, não só durante a homeostase da célula, mas também em processos patológicos, esta merece atenção cuidadosa e está sendo objeto de estudo pelo nosso grupo

Fato interessante é que recentemente foi mostrado que o PrPc localizado na membrana o faz em microdomínios denominados “rafts” (Keshet et al., 2000), além da localização e funcionalidade pré-sináptica desta molécula em cérebros de camundongo ter sido estabelecida há algum tempo (Herms et al., 1999). Utilizando anticorpos anti-STI-1 em preparações de sinaptossomas e “rafts” semelhantes às descritas na literatura (Herms et al., 1999, Keshet et al., 2000) foi possível verificar que a STI-1 também está presente nestas preparações (S. Zanata, resultados não publicados) reforçando assim a idéia de que a co-localização destas moléculas em tais domínios sugeriria a participação da STI-1 como coadjuvante na biologia celular do PrPc.

Outra hipótese que surgiu após a análise dos nossos resultados é que baseando na variabilidade da sequência de aminoácidos entre espécies, especialmente no domínio de ligação do PrPc à STI-1(aa 230-245) (Lässle et al., 1997; Honoré et al., 1992), poderíamos especular que a STI-1 é a própria Proteína X, proposta por Stanley Prusiner, como sendo a responsável pela conversão do PrPc em PrPsc. Tal proteína não teve sua natureza identificada até o momento não passando também de hipótese especulativa (Telling et al., 1995).

Nos últimos anos esforços vem sendo empregados numa melhor compreensão da função fisiológica do PrPc. Uma das abordagens mais empregadas neste sentido foi quanto a caracterização de moléculas que se

ligavam com o PrPc e que possuíam uma função biológica já estabelecida, abrindo assim possibilidades para o entendimento da própria relevância biológica do PrPc.

É curioso constatar que uma grande quantidade de moléculas pode se associar pelo menos *in vitro*, com o PrPc, tais como heparina, chaperoninas HSP 60 e BiP, proteína acídica fibrilar glial (GFAP), apolipoproteína-1 e o receptor de 37/66 kDa de laminina (revisado por Martins et al., 2001). Recentemente foi observado que distroglicana (Keshet et al., 2000) e algumas N-CAM's (neural cell adhesion molecules) (Schmitt-Ulms et al., 2001) são ligantes de PrPc. Contudo os argumentos para a relevância biológica para tais interações são pobres de consistência

Contudo como é possível observar pelos trabalhos do nosso grupo (Graner et al., 2000a,b) e parcialmente descritos nesta tese, PrPc liga-se a Ln e tal ligação está envolvida nos processo de adesão neuronal, formação e manutenção de neuritos.

Coincidentemente outra molécula que recebeu especial atenção como sendo um receptor para o PrPc é o receptor de Ln de 37/66 kDa (Rieger et al., 1997; Gauczynski et al., 2001; Hundt et al., 2001), o qual em associação com heparan sulfato proteoglicano pode participar da internalização de 20-50% do PrPc ligado à membrana (Hundt et al., 2001). Estes resultados sugerem a existência de outras moléculas que medeiam a internalização do PrPc. É interessante notar que o sítio direto de interação do receptor de Ln no PrPc foi mapeado como sendo os aminoácidos 161-179 (Gauczynski et al., 2001), sendo este domínio diferente ao de ligação a STI-1 (aa. 114-128) apresentado nesta tese.

Levando-se em consideração a hipótese inicial do grupo que a STI-1 poderia participar na internalização do PrPc (Martins et al., 1997), é possível que a associação de cada uma destas moléculas com o PrPc tenha um efeito aditivo sobre sua internalização. Além disso, é possível que a interação receptor de Ln de 37/66 kDa-PrPc seja aumentada por íons Cu^{2+} , uma vez que heparan sulfato proteoglicano associado a tal receptor de Ln liga-se ao domínio do PrPc que é responsável por ligação a Cu^{2+} (Brown et al., 1997a). Tal domínio é necessário

para a internalização do PrPc mediada por este íon divalente (Lee et al., 2001a, Pauly and Harris, 1998).

No momento não está claro qual é o papel desempenhado pela STI-1 na internalização do PrPc, de modo que esta participação está sobre intensa investigação e debate. Por outro lado, é possível que a STI-1 participe em uma via de sinalização mediada por PrPc e que o processo de internalização poderia funcionar como um mecanismo de desligamento de sinais previamente desencadeados.

Nosso grupo descreveu (Chiarini et al., submetido) que o PrPc transmite sinais neuroprotetores (via cAMP/PKA), induzidos pela associação do peptídeo complementar com o PrPc (Martins et al., 1997), resgatando neurônios da retina da apoptose induzida por inibidores de síntese protéica. Estes resultados foram totalmente confirmados utilizando o peptídeo STI-1₂₃₀₋₂₄₅, o qual mimetiza o peptídeo complementar e a molécula inteira STI-1. Como esperado, o peptídeo STI-1₂₃₀₋₂₄₅ age de maneira mais eficiente que o peptídeo complementar, ou seja, doses 10 vezes menores do primeiro induzem resposta semelhante a do segundo (Zanata et al., submetido). Além disso, como foi mostrado (Chiarini et al., submetido) os efeitos mediados pelo tratamento das células com rSTI-1 ou o peptídeo STI-1₂₃₀₋₂₄₅ não são devido ao desligamento da interação PrPc-STI-1 mas mimetizando a função desta última.

Deve ser salientado que o sinal desencadeado pela STI-1 é totalmente dependente da expressão de PrPc. Contudo, desde que os sinais parecem fluir através do PrPc (Chiarini et al., submetido), poderíamos argumentar que STI-1 solúvel ou outros ligantes de PrPc poderiam desencadear sinais semelhantes. Por outro lado, a associação do PrPc com a STI-1 não exclui sua interação com Ln (resultados não publicados), sugerindo que o PrPc poderia fazer parte de um complexo macromolecular formado entre a superfície celular e proteínas extracelulares, o qual seria composto ao menos por Ln, PrPc e STI-1 (Martins et al., 2002), complexo este responsável pela transdução de sinais citoprotetores e de diferenciação celular.

Posfácio

Levando-se em conta o objetivo de uma tese, propõem-se aqui algumas idéias, puramente especulativas, mas que poderiam gerar alguma contribuição para as próximas etapas do trabalho, as quais serão muito provavelmente conduzidas por outros membros do laboratório.

As semelhanças do PrPc com o APP foi o ponto de partida para caracterização da interação PrPc-Ln, e o envolvimento desta interação em neuritogênese. Visto que os bem mais estudados receptores para a Ln são os heterodímeros transmembrânicos chamados integrinas (Hynes, 1992; Cheresch & Mecham, 1994), supôs-se que estes receptores poderiam, de alguma forma, estarem envolvidos na neuritogênese pelo par PrPc/Ln. No caso do APP vários pontos de inter cruzamento entre integrinas e esta proteína foram observados, podendo ser destacado a co-localização destas duas proteínas em pontos de adesão de células nervosas ao substrato (Yamazaki et al., 1997), a interação do peptídeo β -amilóide com a integrina $\alpha 5 \beta 1$ em uma linhagem neuronal (Sabo et al., 1995) e a utilização desta mesma integrina em mecanismo de clareamento do peptídeo β -amilóide do meio extracelular, evitando assim sua deposição (Matter et al., 1998)

De fato, nosso laboratório possui alguns resultados não publicados de co-localização da cadeia $\beta 1$ -integrina com o PrPc, nos neuritos de células PC-12 diferenciadas com NGF- β e Ln, sendo esta co-localização particularmente intensa nos cones de crescimento. A própria inibição da adesão de células PC-12 com anticorpos anti-PrPc e anti-cadeias de integrinas (Fig 2), somada a co-localização destas moléculas, colocou-nos frente a possibilidade de o PrPc estar atuando conjuntamente com as integrinas no fenômeno de neuritogênese. No início desta tese buscou-se avaliar se tal hipótese estava correta, contudo outras prioridades levaram-nos a outras buscas e resultados, e este objetivo acabou sendo colocado em segundo plano. Não é descartada a idéia da existência de um complexo macromolecular envolvendo o PrPc com integrinas e outros ligantes de PrPc, tais

como a STI-1 e o receptor de Ln de 37/66 kDa. Espera-se que tal hipótese seja retomada oportunamente por outros estudantes.

Já o mecanismo e a sinalização celular envolvidos na neuritogênese induzida pela interação PrPc-Ln, ainda precisam ser estudados. A própria integrina poderia estar envolvida como molécula propagadora de sinal intracelular, enquanto o PrPc funcionaria como co-receptor de Ln. Como a própria integrina liga Ln, o PrPc poderia estar atuando como um modulador da afinidade da integrina pela Ln, ou vice-versa.

As vias sinalizadoras poderiam conter cascatas clássicas envolvendo domínios citoplasmáticos de integrinas (Ginsberg et al., 1992) como reguladores de mensageiros secundários intracelulares (Howe et al., 1998; Clark & Brugge, 1995; Schwartz, 1994; Ginsberg et al., 1992; Damsky e Werb, 1992), podendo também empregar GTPases, as quais estão associadas a plasticidade do citoesqueleto (Hall, 1998)

Além da função citoprotetora da STI-1 sugerida pelos nossos resultados (Chiarini et al., submetido, Zanata et al., submetido), crê-se também no envolvimento desta proteína em neuritogênese, visto que tanto anticorpos anti-STI-1 como os peptídeos complementar e STI-1₂₃₀₋₂₄₅ interferem consistentemente na neuritogênese de células PC-12 e neurônios oriundos de gânglios da raiz dorsal (S.Zanata e E. Graner, dados não publicados)

As semelhanças existentes entre o PrPc e o APP levou-nos a pensar que uma proteína poderia estar substituindo a outra no caso dos animais “knockout”, tendo em vista que ambos os animais gerados (Büeler et al., 1992) são praticamente normais, não apresentando deficiências marcantes que levassem a uma conclusão definitiva quanto a função biológica de tais proteínas. Contudo, animais duplamente “knockout” para APP e PrPc continuam apresentando um fenótipo normal (U. Müller, comunicação pessoal durante cafezinho no Instituto Max-Planck) sugerindo que as proteínas poderiam agir em vias redundantes mas não insubstituíveis.

Aparentemente os dados apresentados trazem mais questões do que respostas, mas o fato é que o nosso grupo pode ser considerado um dos pioneiros

na busca da função fisiológica do PrPc, e que as respostas dadas até agora por este grupo estão contribuindo de modo significativo em redimir o PrPc do papel de vilão em uma série de doenças neurodegenerativas, para um papel mais fisiológico e fundamental que é o da cognição, memória e plasticidade neuronal.

Conclusões

1. O PrPc atua como um receptor de laminina (Ln), sendo que parte da neuritogênese induzida pela Ln é mediada pela interação PrPc-Ln
2. Animais que tiveram o gene do PrPc removido (PrP^{-/-}) possuem atividade neuritogênica diminuída frente a Ln, quando comparados com animais selvagens.
3. A atividade neuritogênica de animais PrP^{-/-} é abolida frente ao domínio neuritogênico RNIAEIIKDI, o qual é o sítio na Ln no qual o PrPc se liga.
4. Este trabalho identifica de maneira inequívoca a proteína STI-1 como sendo o receptor/ligante de PrPc de 66 kDa inicialmente caracterizado por este grupo (Martins et al., 1997).
5. A proteína STI-1, presente na superfície celular, liga-se ao PrPc em diversas condições experimentais reforçando sua existência no contexto celular.

Referências Bibliográficas

- Aguzzi, A. (1996) Between cows and monkeys. *Nature* 381:734-735.
- Anderson, R.G.W. (1993) Plasmalemmal caveolae and GPI-anchored membrane proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:647-652.
- Anderson, R.M.; Donnelly, C.A.; Ferguson, N.M.; Woolhouse, M.E.J.; Watt, C.J.; Udy, H.J.; MaWhinney, S.; Dunstan, S.P.; Southwood, T.R.E.; Wilesmith, J.W.; Ryan, J.B.M.; Hoinville, L.J.; Hillerton, J.E.; Austin, A.R. & Wells, G.A.H. (1996) Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature* 382:779-788.
- Aplin, J.D. and Hughes R.C. (1981) Protein-derivatised glass coverslips for the study of cell-to-substratum adhesion. *Anal. Biochem.*, 113:144-148.
- Arvan, P, Cameron, RS, Castle, JD. (1983) Secretory membranes of rat parotid gland: preparation and comparative characteriazation. *Meth. Enzimol.* 98: 75-87.
- Baranyi, L, Campbell, W., Ohshima, K, Fujimoto, S., boros, M., Okada, H. (1995) The antisense homology box: a new motif within proteins that encodes biologically active peptides. *Nature Medicine* 1: 894-901.
- Barry, RA, Oesch, B, Scott, M, westaway, D, walchli,M, Groth, DF, McKinley, MP, Prusiner, SB, Weissmann, C. (1986) Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46: 417-428.
- Bateman, D.; Hilton, D.; Love, S.; Zeidler, M.; Beck, J. & Collinge, J. (1995) Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in 18-year-old in the UK. *Lancet* 346:1155-1156.
- Beck K, Hunter I, Engel J. (1990) Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J* 4:148-160.
- Bignami, A., Chi, N.H. and Dahl, D. (1984) First appearance of laminin in peripheral nerve, central blood vessels and skeletal muscle of the rat embryo, *J. Dev. Neurosci.*, 2: 367-376.

Blatch GL, Lassel M, Zetter BR, Kundra V. (1997) Nucleotide isolation of a mouse cDNA encoding mSTI1, a stress-inducible protein containing the TPR motif. *Gene*. 194:277-82,

Bolton, DC, McKinley, MP, Prusiner, SB. (1984) Molecular characteristics of the major scrapie prion protein. *Biochemistry* 23: 5898-5906.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Brentani RR. (1988) Biological implications of complementary hydropathy of amino acids. *J Theor Biol.* 135: 495-499

Brentani, R.R. (1990) Complementary hydropathy and the evolution of interacting polypeptides. *J Mol Evol.* 31,239-243.

Britton, T.C.; Al-Sarraj, S.; Shaw, C.; Campbell, T. & Collinge, J. (1995) Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in 16-year-old in the UK. *Lancet* **346**:1155.

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

Brown, DR, Qin, K., Herms, J.W., Madlung, A., Manson, J., Strome R., Fraser, P.E., Kruck, T., Bohlen, A. von, Schulz-Schaeffer, W., Giese A., Westaway, D. and Kretzschmar, H (1997a). The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 390, 684-687.

Brown DR, Schulz-Schaeffer WJ, Schmidt B, Kretzschmar HA. (1997b) Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol.* 146: 104-111

Büeler, H, Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M. and Weissmann, C. (1993) Mice devoided of PrP are resistant to scrapie *Cell* 73 :1339-47.

Büeler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356 : 577-582.

Butler, D. (1996) BSE maternal transmission results may be released soon. *Nature* 381:724.

Buto, S., Tagliabue, E., Ardini, E., Magnifico, A., Ghirelli, C., van den Brule, F., Castronovo, V., Colnaghi, M.I., Sobel, M.E., Menard, S. (1998) Formation of the 67-kda laminin receptor by acylation of the precursor. *J Cell Biochem* 69: 244-251.

Cabral AL, Lee KS, Martins VR. (2001) Regulation of PrPc gene expression depends on chromatin conformation *J Biol Chem*. no prelo.

Chang HY, Takei K, Sydor AM, Born T, Rusnak F, Jay DG (1995) Asymmetric retraction of growth cone filopodia following focal inactivation of calcineurin. *Nature* 376: 686-690.

Cheresh, D.A. & Mecham, R.P.(eds.) (1994) Integrins : molecular and biological responses to the extracellular matrix. Academic Press, Califórnia, USA.

Chiarini, L.B., Freitas, A.R.O., Zanata, S.M., Brentani, R.R., Martins, V.R., Linden, R. (2002). Cellular prion protein transduces neuroprotective signals, submetido.

Clark, E.A. & Brugge, J.S. (1995) Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268:233-239.

Collinge, J., Whittington, M.A., Sidle, K.C.L., Smith, C.J., Palmer, M.S., Clarke, A.R. & Jefferys, J.G.R. (1994) Prion protein is necessary for normal synaptic function *Nature* 370:295-297.

Corset, V., Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Forcet, C., Moyse, E., Chédotal, A. & Mehlen, P. (2000) Netrin-1-mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosine A2b receptor. *Nature*.407:747-750.

Damsky, C.H. & Werb, Z. (1992) Signal transduction by integrin receptors for extracellular matrix: cooperative processing of extracellular information. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:772-781.

de Souza S. J. & Brentani R. (1992) Collagen binding site in collagenase can be determined using the concept of sense-antisense peptide interactions. *J Biol Chem*. 267:13763-7.

Dunbar, B. S. (1990) Two-dimensional electrophoresis and immunological techniques. Plenum Press, New York, USA.

Elkins, T., Zinn, K., McAllister, L., Hoffmann, F.M. and Goodman, C.S. (1990) Genetic analysis of a *Drosophila* neural cell adhesion molecule: interaction of fasciclin I and Abelson tyrosine kinase mutations. *Cell* 60: 565-575.

Ferguson, E.L. and Horvitz, H.L. (1989) The multivulva phenotype of certain *Caenorhabditis elegans* mutants results from defects in two functionally redundant pathways, *Genetics*, 123: 109-121.

Forloni G, Angeretti N, Chiesa R, Monzani E, Salmona M, Bugiani O, Tagliavini F. (1993) Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 362(6420):543-546.

Freshney, R.I. (1992) *Animal cell culture: a practical approach*. Oxford Press.

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

Gajdusek, D.C. (1977) Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science*. **197**:943-960.

Gasset, M., Baldwin, M.A., Lloyd, D.H., Gabriel, J.M., Holtzman, F.C., Cohen, F., Fletterick, R. & Prusiner, S.B. (1992) Predicted alfa-helical regions of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid. *Proc Natl Acad Sci USA*.89:10940-10944.

Gauczynski, S., Peyrin, J.M., Haik, S., Leucht, C., Hundt, C., Rieger, R., Krasemann, S., Deslys, J.P., Dormont, D., Lasmezas, C.I. and Weiss, S. (2001) The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *EMBO J*. 20, 5863-5875.

Ginsberg, M.H.; Du, X. & Plow, E.F. (1992) Inside-out integrin signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.*4:766-771.

Goebel, M.G. and Petes, T.D. (1986) Most of the yeast genomic sequences are not essential for cell growth and division. *Cell*: 46 983-992.

Görg, A., Boguth, G., Obermaier, C., Posch, A. & Weiss, W. (1995) Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): The state of art and the controversy of vertical *versus* horizontal systems. *Electrophoresis* 16: 1079-1086.

Graf, F., Iwamoto, Y., Sakaki, M., Martin, G.R., Kleinman, H.K., Robey, F.A. and Yamada, Y. (1987) Identification of an amino acid sequence in laminin mediating cell attachment, chemotaxis, and receptor binding. *Cell* 48: 989-996.

Graner E., Mercadante, A. F., Zanata, S. M., Orestes, V. F., Cabral, A. L. B., Veiga, S. S., Juliano, M. A., Roesler, R., Walz, R., Minetti, A., Izquierdo, I., Martins, V. R. and Brentani, R. R. (2000a) Cellular prion protein binds laminin and mediates neuriteogenesis. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 76: 85-92.

Graner, E., Mercadante, A. F., Zanata, S. M., Martins, V. R., Jay, D. G. and Brentani, R. R. (2000b) Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. *FEBS Lett* 482: 257-60.

Greene, L. and Tischler, A.S. (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which responds to nerve growth factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 2424-2428.

Hagg, T., Muir, D., Engvall, E., Varon, S. and Manthorpe, M. (1989) Laminin-like antigen in rats CNS neurons: distribution and changes upon brain injury and nerve growth factor treatment. *Neuron* 3: 721-732.

Hagg, T., Portera-Cailliau, C., Jucker, M. and Engvall, E. (1997) Laminins of the adult mammalian CNS; laminin alpha-2 (merosin M) chain immunoreactivity is associated with neuronal processes. *Brain Res.* 764: 17-27.

Hagger, G., Pawelzik, H., Kreutzberg, G.W. and Zieglgänsberger, W. (1998) A peptide derived from a neurite outgrowth-promoting domain on the γ -1 chain of laminin modulates the electrical properties of neocortical neurons. *Neuroscience*, 86: 1145-1154.

Hajjar, K. A., Jacovina, A. T., and Chacko, J. (1994). An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *J. Biol. Chem.* 269: 21191–21197.

Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279: 509-514.

Han, H., Whinreb, P.H. and Lansbury, P.T.J. (1995) The core Alzheimer's peptide NAC forms amyloid fibrils which seed and are seeded by amyloid: is NAC

a common trigger or target in neurodegenerative disease? *Chem. & Biol.*, 2: 163-169.

Harlow, E. & Lane, D. (1988) *Antibodies, a laboratory manual*, CSH Press, USA.

Hegde, R.S., Mastrianni, J.A., Scott, M.R., DeFea, K.A., Tremblay, P., Torchia, M., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. & Lingappa, V.R. (1998) A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* 279: 827-834.

Herms J, Tings T, Gall S, Madlung A, Giese A, Siebert H, Schurmann P, Windl O, Brose N, Kretzschmar H. (1999) Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J Neurosci.* 19:8866-75.

Ho, P.L., Raw, I. (1992) Cyclic AMP potentiates bFGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J Cell Physiol.* 150(3):647-56.

Honoré, B., Leffers, M., Rasmussen, H.H., Vandekerckhove, J. & Celis, J.E. (1992) Molecular cloning and expression of a transformation-sensitive human protein containing the TPR motif and sharing identity to the stress-inducible yeast protein STI1. *J. Biol. Chem.* 267:8485- 91.

Hornshaw MP, McDermott, JR, Candy, JM, Lakey, JH. (1995) Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: structural studies using synthetic peptides. *Biochem Biophys res Commun.* 214: 993-9.

Houen, G. (1999). Evolution of the genetic code: the nonsense, antisense, and antinonsense code make non sense. *BioSystems* 55, 39-46

Howe, A.; Aplin, A.E.; Alahari, S.K. & Juliano, R.L. (1998) Integrin signaling and cell growth control. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10:220-231.

Hsiao, K.K. (1997) From prion diseases to Alzheimer's disease, *J. Neural. Transm.* 49: 135-144.

Hundt, C., Peyrin, J.M., Haik, S., Gauczynski, S., Leucht, C., Rieger, R., Riley, M.L., Deslys, J.P., Dormont, D., Lasmezas, C.I. and Weiss, S. (2001). Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor *EMBO J.* 20, 5876-5886

Hynes, R.O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25.

Jay DG, Keshishian H (1990) Laser inactivation of fasciclin I disrupts axon adhesion of grasshopper pioneer neurons. *Nature* 348: 548-550.

Kakizuka, A. (1998) protein precipitation: a common etiology in neurodegenerative disorders? *Trends Genet.* 14: 396-402.

Keshet GI, Bar-Peled O, Yaffe D, Nudel U, Gabizon R (2000) The cellular prion protein colocalizes with the dystroglycan complex in the brain. *J Neurochem* 2000;75(5):1889-1897.

Keyes, ME (1999a) The prion challenge to the “central dogma” of molecular biology, 1965-1991, Part I: Prelude to prions. *Stud Hist Phil Biol & Biomed Sci.* 30: 1-19.

Keyes, ME (1999b) The prion challenge to the “central dogma” of molecular biology, 1965-1991, Part II: The problem with prions. *Stud Hist Phil Biol & Biomed Sci.* 30: 181-218.

Koch, M., Olson, P.F., Albus, A., Jin, W., Hunter, D.D., Brunken, W.J., Burgeson, R.E., Champlaud, M-F. (1999) Characterization and expression of the laminin $\gamma 3$ chain: a novel non-basement membrane-associated, laminin chain, *J. Cell Biol.* 145: 605-617.

Kocisko DA, Come, JH, Priola, SA, Chesebro, B, Raymond, GJ, Lansbury, PT, Caughey, B. (1994) Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature.* 370: 471-474.

Koo, E.H., Park, L. and Selkoe, D.J. (1993) Amyloid β -protein as a substrate interacts with extracellular matrix to promote neurite outgrowth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 190: 4748-4752.

Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T, Haraguchi K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Saeki K, Matsumoto Y, Yokoyama T, Itohara S & Onodera T (1999) Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature*, 400: 225-226.

Kyte J, Doolittle RF. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol.* 157 :105-32.

Lassle, M., Blatch, G.L., Kundra, V., Takatori, T., Zetter, B.R. (1997) Stress-inducible murine protein mSTI-1. Characterization of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different kinases. *J Biol Chem* 272: 1876-1884.

Lee KS, Magalhaes AC, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Prado MA (2001a). Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. *J Neurochem*; 79(1):79-87.

Lee, K.S., Martins, V.R., Zanata, S.M., Brentani, R.R. and Prado, M.A.M. (2001b) Internalization of mammalian fluorescent prion protein involves classical endocytic organelles. *J. Neurochem.* 78 suppl, 19.

Liao JC, Roider J, Jay DG. (1994) Chromophore-assisted laser inactivation of proteins is mediated by the photogeneration of free radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 2659-63.

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

Liesi, P., Hager, G., Dodt, H.U., Seppälä, I. and Ziegglänsberger, W. (1995) Domain-specific antibodies against the B2 chain of laminin inhibit neuronal migration in the neonatal rat cerebellum. *J. Neurosci. Res.* 40: 199-206.

Liesi, P., Närvänem, A., Soos, J., Sariola, H. and Snounou, G. (1989) Identification of a neurite outgrowth-promoting domain of laminin using synthetic peptides, *FEBS Letters*, 224: 141-148.

Liesi, P., Seppälä, I. and Trenkner, E. (1992) Neuronal migration in cerebellar microcultures is inhibited by antibodies against a neurite outgrowth domain of laminin, *J. Neurosci. Res.*, 33: 170-176.

Longshaw VM, Dirr HW, Blatch GL, Lassle M. (2000) The in vitro phosphorylation of the co-chaperone mSTI1 by cell cycle kinases substantiates a predicted casein kinase II-p34cdc2-NLS (CcN) motif. *Biol Chem* 381: 1133-1138.

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

Ma J, Lindquist S. (1999). De novo generation of a PrP^{Sc}-like conformation in living cells. *Nat Cell Biol* 1(6): 358-361.

Ma J, Lindquist S. (2001) Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(26): 14955-14960.

Magdesian MH, Giordano R, Ulrich H, Juliano MA, Juliano L, Schumacher RI, Colli W, Alves MJ (2001) Infection by *Trypanosoma cruzi*. Identification of a parasite ligand and its host cell receptor *J Biol Chem* 276: 19382-19389.

Manson, J., West, J.D., Thomson, V., McBride, P., Kaufman, M.H. & Hope, J. (1992) The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development* 115: 117-122.

Martins VR, Mercadante AF, Cabral AL, Freitas AR, Castro RM (2001) Insights into the physiological function of cellular prion protein. *Braz J Med Biol Res* 34 (5): 585-595

Martins, V.R., Graner, E., Garcia-Abreu, J., Souza, S.J., Mercadante, A.F., Veiga, S.S., Zanata, S.M., Neto, V.M. and Brentani, R.R. (1997) Complementary hydropathy identifies a cellular prion protein receptor *Nature Med.* 3, 1376-1382.

Martins, V.R., Linden, R., Prado, M.A.M., Walz R., Sakamoto, A.C., Izquierdo, I., Brentani, R.R. (2002) Cellular prion protein: on the road for functions. *FEBS Lett. no prelo*

Matter ML, Zhang Z, Nordstedt C, Ruoslahti E. (1998) The $\alpha 5 \beta 1$ integrin mediates elimination of amyloid-beta peptide and protects against apoptosis. *J Cell Biol.* 141:1019-30.

McKinley, M.P., Bolton D.C. & Prusiner, S.B. (1983) A protease-resistant protein in a structural component of the scrapie prion. *Cell.* 35:57-62.

McKinley, MP, Braunfeld, MB, bellinger, CG, Prusiner, SB. (1986) molecular characterization of prion rods purified from scrapie-infected hamster brains. *J. Infect. Dis.* 154: 110-120.

Medori R, Montagna P, Tritschler HJ, LeBlanc A, Cortelli P, Tinuper P, Lugaresi E, Gambetti P. (1992) Fatal familial insomnia: a second kindred with mutation of prion protein gene at codon 178 *Neurology* 42: 669-670.

Meggio F, Negro A, Samo S, Ruzzene M, Bertoli A, Sorgato MC, Pinna LA. (2000) Bovine prion protein as a modulator of protein kinase CK2. *Biochem J* 2000, 352: 191-1966

Mercadante, A. (2000) Caracterização e implicações fisiológicas das interações da proteína prion celular com o seu receptor de 60-66 kDa e com a laminina. Tese de doutoramento. Instituto de Química. Universidade de São Paulo.

Mitchell A. (1997) Puzzling over prion partners. *Nature Med.* 3, 1322

Moroianu, J. W., Fett, J. W., Riordan, J. F., and Vallee, B. L. (1993) Actin is a surface component of calf pulmonary artery endothelial cells in culture. *Proc. Natl.Acad. Sci. U. S. A.* 90: 3815–3819.

Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Chebassier, C., Laplanche, J.L., Lehmann, S., Launay, J.M., Kellermann, O. (2000) Signal transduction through prion protein. *Science* 289: 1925-1928.

Muesch A, Hartmann E, Rohde K, Rubartelli A, Sitia R, Rapoport TA (1990) A novel pathway for secretory proteins? *Trends Biochem Sci* 15(3): 86-8.

Nagase, S., Shimamune, K. and Shumiya, S. (1979) Albumin-deficient rat mutant. *Science.* 205: 590-591

Narindrosarasak, S, Altman, RA, Kisilevsky, R. (1992) Characterization of high affinity binding between laminin and Alzheimer's disease amyloid precursor proteins. *Lab. Invest.* 67:643-652.

Negro A, Meggio F, Bertoli A, Battistutta R, Sorgato MC, Pinna LA (2000) Susceptibility of the prion protein to enzymic phosphorylation *Biochem Biophys Res Commun* 271(2): 337-341.

Nguyen, J, Baldwin, MA, Cohen, FE, Prusiner, SB. (1995) Prion protein peptides induce alpha-helix to beta-sheet conformation transitions. *Biochemistry.* 34: 4186-92.

Nichols B.J., Kenworthy A.K., Polishchuk R.S., Lodge R., Roberts T.H., Hirschberg K., Phair R.D. and Lippincott-Schwartz J. (2001) Rapid Cycling of Lipid Raft Markers between the Cell Surface and Golgi Complex. *J. Cell. Biol.* 153: 529-542.

Nicke, A, Bäumer, HG, Rettinger, J, Eichele, A, Lambrecht, G, Mutschler, E, Schmalzing, G. (1998) P2X₁ and P2X₃ receptors from stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J.* 17: 3016-3028.

Nomizu, M., Kuratomi, Y., Song, S.Y., Ponce, M.L., Hoffman, M.P., Powell, S.K., Miyoshi, K., Otaka, A., Kleinman, H.K. and Yamada, Y., Identification of cell binding sequences in mouse laminin gamma 1 chain by systematic peptide screening, *J. Biol. Chem.*, 272 (1997) 32198-32205.

O'Farrell, PH. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 250: 4007-4021.

Oesch, B, Teplow, DB, Stahl, N, Serban, D, Hood, LE, Prusiner, SB (1990) Identification of cellular proteins binding to scrapie prion protein. *Biochemistry.* 29: 5848-5855.

Oesch, B., Westaway, D. & Wälchli, M. (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell.*40:735-746.

Pan, KM, Stahl, N, Prusiner, SB (1992) Purification and properties of cellular prion protein from Syrian hamster brain. *Protein Sci.* 1: 1343-52.

Paulsson, M., Aumailley, M., Deutzmann, R., Timpl, R. & Beck, R. (1987) Laminin-nidogen complex: extraction with chelating agents and structural characterization. *Eur. J. Biochem.* 166: 11-19.

Pauly, P.C. and Harris, D.A. (1998) Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J. Biol. Chem.* 273: 33107-33110.

Prusiner, SB (1982) Prions. *Scientific American.* 51.

Prusiner, SB. (1997) Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 13363-13383.

Prusiner, SB, Bolton, DC, Groth, DF, Bowman, KA, Cochran, SP, McKinley, MP. (1982) Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry.* 21: 6942-6950.

Prusiner, S.B. Genetic and infectious prion diseases. *Arch. Neurol.* 50:1129-1153, 1993.

Prusiner, SB, McKinley, MP, Bowman, KA, Bolton, DC, Bendheim, PE, Groth, DF, Glenner, GG. (1983) Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell.* 35: 349-358.

Prusiner, S.B., Scott, M.R., DeArmond, S.J. & Cohen, F.E. (1998) Prion protein biology. *Cell* 93, 337-348.

Püschel AW, Adams RH, Betz H. (1995) Murine semaphorin D/collapsin is a member of a diverse gene family and creates domains inhibitory for axonal extension. *Neuron* 14(5): 941-948.

Rieger R, Edenhofer F, Lasmezas C I, Weiss S (1997) The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukariotic cells. *Nature Medicine*, 3: 1383-1388.

Rivas, R.J., and Hatten, M.E. (1995) Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. *J.Neurosci.* 15: 981-989.

Robinson, M. R. (1991) The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. *Curr Opin Cell Biol.* 3:634-641.

Roesler, R., Walz, R., Quevedo, J., De Paris, F., Zanata, S.M., Graner, E., Izquierdo, I., Martins, V.R. & Brentani, R.R. (1999) Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrPc. *Mol. Brain Res.* 71:349-53.

Rogers, M., Taraboulos,A., Scott, M., Groth, D. & Prusiner, S.B. (1990) Intracellular accumulation of the cellular prion protein after mutagenesis of its Asn-linked glycosilation sites. *Glycobiology.* 1:101-109.

Rohm B, Ottemeyer A, Lohrum M, Püschel AW. (2000a) Plexin/neuropilin complexes mediate repulsion by the axonal guidance signal semaphorin 3A *Mech Dev* 93(1-2): 95-104.

Rohm, B., Rahim, B., Kleiber, B., Hovatta, I., Puschel, A.W. (2000b) The semaphorin 3A receptor may directly regulate the activity of small GTPases. *FEBS Letters* 486: 68-72.

Routtenberg A. (1995) Knockout mouse fault lines. *Nature*, 374 314-315.

Ruiz-Opazo, N, Akimoto, K, Herrera, VL. (1995) Identification of a novel dual angiotensin II/vasopressin receptor on the basis of molecular recognition theory. *Nat Med.*1:1074-81.

Sabo, S., Lambert, M.P., Kessey, K., Krafft, G. & Klein, W.L. (1995) Interaction of beta-amyloid peptides with integrins in a human nerve cell line. *Neurosci. Lett.* 184: 25-28.

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

Schmaier, A. H. (1997) Contact activation: a revision. *Thromb. Haemostasis* 78, 101–107

Schmitt-Ulms G, Legname G, Baldwin MA, Ball HL, Bradon N, Bosque PJ, Crossin KL, Edelman GM, DeArmond SJ, Cohen FE, Prusiner SB. (2001). Binding of Neural Cell Adhesion Molecules (N-CAMs) to the Cellular Prion Protein. *J Mol Biol.* 314: 1209-1225.

Schwartz, M.A. Integrins as signal transduction receptors. in Cheresch, D.A. & Mecham, R.P.(eds.) (1994) Integrins : molecular and biological responses to the extracellular matrix. Academic Press, California, USA.

Scott, M., Foster, D., Mirenda, C., Serban, D., Coufal, F., Walchli, M., Torchia, M., Groth, D., Carlson, G., and Dearmond, SJ, Westaway, D, Prusiner, SB. Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. (1989) *Cell* 59: 847-57.

Semenkovich, C. F., Ostlund, R. E., Olson, M. O. J., and Yang, J. W. (1990) A protein partially expressed on the surface of HepG2 cells that binds lipoproteins specifically is nucleolin. *Biochemistry* 29, 9708–9713

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

Shyng, S.-L., Heuser, J.E. & Harris, D.A. (1994) A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J Cell Biol.* 125: 1239-1250.

Shyng, S.-L., Moulder, K.J., Laesko, A. & Harris, D.A. (1995) The N-terminal domain of a glycolipid-anchored prion protein is essential for its endocytosis via clathrin-coated pits *J Biol Chem.* 270: 14793-14800.

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

Takei K, Chan TA, Wang FS, Deng H, Rutishauser U, Jay DG (1999) The neural cell adhesion molecules L1 and NCAM-180 act in different steps of neurite outgrowth. *J Neurosci* 19: 9469-9479.

Taraboulos, A., Raeber, A.J., Borchelt, D.R., Serban, D. & Prusiner, S.B. (1992) Synthesis and trafficking of prion proteins in culture cells. *Mol Biol Cell.* 3:851-863.

Tashiro, K I., Sephel, G.C., Weeks, B., Sasaki, M., Martin, G.R. and Kleinman, H.K.L. (1989) A synthetic peptide containing the IKVAV sequence from the A chain of laminin mediates cell attachment, migration, and neurite outgrowth, *J. Biol. Chem.* 264: 16174-16182.

Telling, G.C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F.E., DeArmond, S.J. and Prusiner, S.B. (1995) Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 6; 83(1):79-90.

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

Tomaselli, K.J. and Reichardt, L.F. (1988) Peripheral motoneuron interactions with laminin and Schwann cell-derived neurite-promoting molecules: developmental regulation of laminin receptor function, *J. Neurosci. Res.* 21: 275-285.

Tomaselli, K.J., Damsky, C.H. and Reichardt L.F. (1987) Interactions of neuronal cell line (PC-12) with LN, collagen IV and fibronectin: Identification of integrin-related glycoproteins involved in attachment and process outgrowth, *J. Cell. Biol.* 105: 2358.

Tomaselli, K.J., Hall, D.E., Flier, L.A., Gehlsen, K.R., Turner, D.C., Carbonetto, S. & Reichardt, L.F. (1990) A neuronal cell line (PC12) expresses two

_class integrins- _ alfa_1 and _alfa 3 that recognize different neurite outgrowth-promoting domains in laminin. *Neuron* 5: 651-662.

Turner, D.C., Flier, L.A. and Carbonetto, S. (1989) Identification of a cell-surface protein involved in PC-12 cell-substratum adhesion and neurite outgrowth on LN and collagen, *J. Neurosci.* 9: 3287-3296.

Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H., Nixon, R., DeArmond, S.J., Smart, E.J., Anderson, R.G.W., Taraboulos, A. & Prusiner, S.B. (1996) Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14945-14949.

Viles, JH, Cohen, FE, Prusiner, SB, Goodin, DB, Wright, PE, Dyson, HJ. (1999) Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 2042-2047.

Walter J, Schnolzer M, Pyerin W, Kinzel V, Kubler D. *J Biol Chem* (1996) Induced release of cell surface protein kinase yields CK1- and CK2-like enzymes in tandem 271: 111-119.

Walz, R., Amaral, O.B., Rockenbach, I.C., Roesler, R., Izquierdo, I., Cavaleiro, E.A., Martins, V.R. & Brentani, R.R. (1999) Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. *Epilepsia* 40: 1679-82,

Wells MJ, Hatton MW, Hewlett B, Podor TJ, Sheffield WP, Blajchman MA. (1997). Cytokeratin 18 is expressed on the hepatocyte plasma membrane surface and interacts with thrombin-antithrombin complexes. *J Biol Chem.* 272: 28574-28581.

Wong BS, Venien-Bryan C, Williamson RA, Burton DR, Gambetti P, Sy MS, Brown DR, Jones IM (2000). Copper refolding of prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 276: 1217-1224.

Yamamoto, T., Iwasaki, Y., Yamamoto, H., Konno, H. and Isemura M. (1988) Intraneuronal laminin-like molecule in the central nervous system: demonstration of its unique differential distribution. *J. Neurol. Sci.*, 84: 1-13.

Yedidia Y, Horonchik L, Tzaban S, Yanai A, Taraboulos A. (2001). Proteasomes and ubiquitin are involved in the turnover of the wild-type prion protein. *EMBO J* 20: 5383-9191.

Zahn R, von Schroetter C, Wuthrich K. (1997) Human prion proteins expressed in Escherichia coli and purified by high-affinity column refolding. FEBS Lett 417: 400-404.

Zanata SM, Hovatta I, Rohm B, Puschel AW. (2002) Antagonistic effects of Rnd1 and RhoD GTPases regulate receptor activity in Semaphorin 3A induced cytoskeletal collapse. J Neurosci 22:471-7.

Zanata SM, Lopes, MH, Mercadante, AF, Hajj, G, Freitas, ARO, Chiarini, LB, Cabral, ALB, Nomizo, R, Lee, KS, Juliano, MA, Jachieri, SG, Burlingame, A, Huang, L, Linden, R, Brentani, RR, Martins, VR. (2002) The stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion protein that triggers neuroprotection. Submetido

Anexos

OBSERVAÇÃO

NÃO FOI AUTORIZADA A INCLUSÃO DO(S)
ARTIGO(S) NESTE ARQUIVO