Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Estudo da regulação da expressão do gene da proteína prion celular

Ana Lucia Beirão Cabral

Tese de Doutorado

Orientadora: Dra. Vilma Regina Martins

São Paulo
26/7/2001

"Estudo da Regulação da Expressão do Gene da Proteína Prion Celular"

ANA LUCIA BEIRÃO CABRAL

*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.*

Aprovada por:

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

Profa. Dra. MARI CLEIDE SOGAYAR
IQ - USP

Prof. Dr. ROBERT SCHUMACHER
IQ - USP

Prof. Dr. ROGER CHAMMAS
FM - USP

Profa. Dra. MARILIS DO VALLE MARQUES
ICB - USP

**SÃO PAULO
26 DE JULHO 2001.**

Ao meu pai, Nilton e minha mãe Julia, o começo de tudo.

A meu marido Luciano, minha filha Luiza e aos que ainda virão.

Agradecimentos

À Dra. Vilma Regina Martins, pela orientação científica e pela amizade com que sempre desempenhou esta orientação, tendo tomado parte de vários momentos importantes e decisivos de minha vida ao longo de todos estes anos...

Ao Dr. Ricardo Renzo Brentani pela oportunidade de poder participar de seu grupo no Instituto Ludwig e pelos ensinamentos de vida transmitidos através de suas hilariantes estórias.

À Dra. Luisa Lina Vila, pelo carinho, pela amizade e pelas sugestões sempre bem-vindas.

Ao Dr. Luis Fernando Lima Reis pela constante disponibilidade, pela amizade e pelas críticas e sugestões.

À Dra. Mari Cleide Sogayar, Dra Marilis do Valle Marques, Dr. Roger Chamas e Dr. Robert Schumacher pelas valiosas críticas e sugestões quando da participação da banca examinadora.

Às grandes amigas Dri, Regininha e Simone pelo carinho que resume a nossa relação de amizade.

Aos amigos da sala 306: Zanatóide, Freitas, Rosa, Mari, Gláucea, Fátima, Angelita, Priscila, Michele e Wanda pela amizade sincera.

À amiga Rosi pelos comentários e sugestões.

À Kil Sun Lee pela ajuda nos ensaios de Northern blot.

Ao Chamberlain, Isabel, Léia, e Sr. Eudes pela ajuda sempre disponível e apoio junto ao preparo de infra-estrutura do laboratório.

À Dona Conceição pela amizade, carinho e pelas conversas.

Ao Edgard e ao Orestes, que não fazem mais parte do nosso dia a dia, mas são inesquecíveis.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Índice

Abreviaturas	1
Resumo	2
Abstract	3
Introdução	4
Objetivos	20
Material e métodos	
1-Linhagens celulares	21
2-Síntese de iniciadores	21
3-Extração de DNA de cérebro de rato	21
4-Reação em cadeia da polimerase	22
5-Gel não desnaturante de poliacrilamida e coloração por prata	22
6-Clonagem intermediária em pUC18	23
6.1-Preparo do inserto	23
6.2-Ligação do inserto em pUC18	24
7-Clonagem no vetor "reporter" (pGL3 basic)	24
7.1-Preparo do inserto	24
7.2-Preparo do vetor pGL3 basic	25
7.3-Ligação do inserto em pGL3basic	25
7.4-Preparo e transformação de bactérias competentes	25
7.5-Análise do DNA proveniente da transformação com pLUCPrPcprom	26
8-Sequenciamento do promotor clonado, purificação e análise do produto	26
8.1-Isolamento do DNA plasmidial em pequena escala	26
8.2-Sequenciamento	27
8.3-Isolamento do DNA plasmidial em larga escala	27
9-Transfecção celular estável	28
10-Tratamentos das células e medida da atividade de luciferase	29
11-Normalização dos ensaios e análise estatística	29
12-Ensaio de "Northern blot"	30
12.1-Preparo de RNA total	30

12.2-Fracionamento do RNA em gel de agarose e transferência para membrana	30
12.3-Marcação de sonda de DNA	31
12.4-Pré-hibridização, hibridização e lavagens	31
13-Citometria de fluxo	32
14-Ensaio de "Western blot"	33
14.1-Preparo de extrato celular total	33
14.2-Gel de poliacrilamida desnaturante e transferência para membrana	33
14.3-Expressão da proteína PrPc avaliada em ensaio de "Western blot"	33
Resultados	35
Atividade basal	35
Atividade transcricional	37
Expressão do RNAm de PrPc	49
Expressão da proteína PrPc	52
Discussão	57
Conclusões	66
Bibliografia	67
Curriculum Vitae	91

Abreviaturas

ABS- absorbância

AIDS - síndrome da imunodeficiência adquirida

AMPc - adenosina monofosfato cíclica

BSE - "bovine spongiform encephalopathy"

CJD - Creutzfeldt Jakob disease

DEX - Dexametasona

DMEM - "Dulbecco's modified Eagle medium"

DNA - ácido desoxiribonucleico

FFI – "familial fatal insomnia"

GAPDH - "glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogenase"

GFAP – "glial fibrillary acidic protein"

GPI - "glycosil phosphatidil inositol"

GR - "glucocorticoid receptor"

GSS - Gerstmann Straussler Scheinker

LN - laminina

NGF - "nerve growth factor"

PCR - "polimerase chain reaction"

PKA - "protein kinase A"

PKC - "protein kinase C"

PMSF - fenilmetilsulfonil fluoreto

PrPc - proteína prion celular

PrPsc - proteína prion infecciosa

RA - "retinoic acid"

RNA - ácido ribonucleico

RNA_m - RNA mensageiro

SAF - "scrapie associated fibril"

SDS - dodecil sulfato de sódio

TPA - éster de forbol

TSA - Tricostatina A

TSE - "transmissible spongiform encephalopathy"

xg- aceleração da gravidade

Resumo

A conversão da proteína prion celular normal (PrPc), cuja função ainda está sob investigação, para a forma infecciosa (PrPsc) é a causa de algumas doenças neurodegenerativas em humanos e animais. Vários estudos têm sido realizados e mostram que PrPc pode participar de processos normais como memória, estresse oxidativo, neuritogênese e outros. Portanto, a elucidação dos processos de regulação de sua expressão é importante tanto para definir uma estratégia para controlar a infecção quanto para entender melhor a função fisiológica de PrPc. Este trabalho tem por objetivo avaliar a expressão do gene de PrPc, a partir da regulação da atividade de seu promotor frente a drogas que foram eleitas de acordo com a composição dos elementos de resposta a fatores de transcrição nele contidos. Para isto o promotor foi clonado em um vetor contendo o gene "reporter" de luciferase, células C6 e PC-12 foram transfectadas e clones com expressão estável de luciferase foram selecionados. Os resultados dos tratamentos dos clones celulares mostram que éster de forbol (TPA) e AMPc induzem a atividade do promotor de 1,5 a 3 vezes, ácido retinóico (RA) diminui esta atividade em cerca de 50% enquanto que NGF e Dexametasona não têm efeito. A dependência da conformação da cromatina na regulação deste gene também foi testada utilizando-se Tricostatina A (TSA), esta droga foi capaz de aumentar de 10 a 4.000 vezes a atividade do promotor, o que foi seguida tanto pela indução de expressão do RNAm quanto da proteína PrPc. Este efeito parece não ser generalizado a todos os promotores uma vez que esta droga não alterou expressão de GAPDH e de β -actina. Quando TPA e AMPc foram associados à TSA uma potencialização do efeito indutor destas drogas foi observada e a associação de RA e TSA mostrou que RA reduz a indução gerada por TSA. Estes novos dados indicam que a regulação de PrPc é extremamente dependente da conformação da cromatina.

Summary

Conversion of the cellular normal prion protein (PrPc), whose physiological function is still under investigation, to an infectious form called prion is the cause of some neurodegenerative diseases. Therefore, the elucidation of PrPc gene regulation is important both to define a strategy to control the infection and to better understand PrPc function. We cloned the rat PrPc gene promoter region into a luciferase reporter vector, transfected C6 and PC-12 cells and isolated clones with stable luciferase expression. The phorbol ester TPA and cAMP induced promoter activity by 1.5 to 3 times, retinoic acid decreased it by 50% while NGF and dexamethasone had no effect. We also tested the dependence of chromatin conformation for PrPc promoter activity using Trichostatin A (TSA), which was able to highly increase not only promoter activity but also PrPc mRNA and protein levels. Moreover, the TSA effect seems to be restricted since any alteration was observed regarding GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogenase) and β -actin expression. When cAMP, TPA or retinoic acid were associated with TSA a potentiation of their primary effects was observed. These new data indicate that PrPc gene regulation is highly dependent on disruption of chromatin fiber assembly what permits assess of trascription factors.

Introdução

Encefalopatia Espongiforme Bovina

Atualmente um grande espaço na mídia tem sido destinado à informação e debates a respeito da doença da “vacca louca” ou Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE). Esta doença faz parte de um grupo de encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSE) que acometem animais e o homem (revisado por Chesebro, 1999).

Os primeiros casos confirmados de BSE foram detectados em 1986 mas um diagnóstico retrospectivo mostra que um ano antes casos semelhantes já haviam ocorrido. Em 1994 mais de 137 mil cabeças de gado morreram da doença na Grã Bretanha e em 1999 cerca de 400 a 700 reses ainda eram diagnosticadas por semana com BSE (Fonte: United Kingdom Ministry of Agriculture, Fisheries and Food). Na mesma região e atualmente aliada à febre aftosa, esta doença animal poderá decretar o extermínio de todo gado inglês.

Após o reconhecimento de BSE, estudos epidemiológicos indicaram que os responsáveis pela infecção teriam sido a carne e os ossos de ovelhas utilizados no preparo da ração bovina concentrada (Wilesmith e col., 1988). No mesmo ano a proteína animal na ração do gado foi banida reduzindo, não totalmente, a incidência de novas infecções. O completo desaparecimento só não foi possível pois a ração de aves e porcos ainda continha proteína animal e sugere-se que tenha havido contaminação de vacas que se alimentaram destas rações (Pattison, 1998).

O gado acometido por BSE morre entre duas semanas a seis meses a partir da detecção dos primeiros sintomas que são ansiedade, nervosismo, comportamento apreensivo e agressivo (revisado por Narang, 1996). A idade média de manifestação de BSE é entre 4 a 5 anos (Stekel e col., 1996).

Aplicando métodos semelhantes aos utilizados para análise retrospectiva de casos de AIDS, Anderson e colaboradores (1996) calcularam que pelo menos 1 milhão de animais contaminados no Reino Unido foram mortos antes que pudessem desenvolver a doença. Os cálculos preditivos destes mesmos pesquisadores reportam

que poucos casos de novas contaminações iniciariam a nova década, de fato, isto poderia ser válido para o Reino Unido, mas a doença assusta o mercado consumidor mundial ao menor indício de sua existência em qualquer país, haja vista a suspeita recentemente levantada pelo Canadá da presença de BSE no Brasil.

Em recente artigo Wilesmith e colaboradores (2000) realizam um denso estudo epidemiológico e concluíram que a epidemia está sob controle mas em lugares onde as devidas providências foram tomadas mais tarde, o risco ainda existe. Todos os estudos epidemiológicos e preditivos foram realizados na tentativa de detectar a doença em estágios pré-clínicos, o que seria vital para o controle da infecção. Portanto, além de projeções estatísticas foram desenvolvidos métodos de exames histopatológicos com a detecção de fibrilas associadas a scrapie (SAF) e micrografia eletrônica de partículas em tubulofilamentos, ambos dependendo de biópsia (revisado por Narang, 1996).

Além da possível presença de BSE em regiões não pertencentes ao Reino Unido, existe a possibilidade de outros animais desenvolvem TSEs como gato (Wyatt e col., 1991), marta, mula, cervos, animais selvagens criados em zoológicos (por terem consumido alimento de origem animal) e a ovelha (revisado por Prusiner, 1998).

Nas ovelhas é desenvolvida a forma de manifestação de TSE conhecida há mais tempo, denominada “scrapie” (raspado em inglês), nome atribuído ao fato da irritabilidade dos animais acometidos provocar coceira intensa e a conseqüente queda dos pêlos (Prusiner, 1995). Esta infecção endêmica de origem tida como natural está disseminada na Europa, América e Ásia (Narang, 1996). Sabe-se ainda que a doença é prontamente transmitida experimentalmente, entre ovelhas, por administração oral de tecido infectado com scrapie (Pattison e Milson, 1961b), mas este resultado de infecção oral não explica o fato de mães não infectadas transmitirem para seus filhotes (Dickinson, 1976), de fato, como será introduzido a seguir existem componentes hereditários nas TSEs.

Prion, o agente infeccioso

Em 1982 Prusiner propôs que o agente infeccioso de algumas doenças neurodegenerativas de humanos e de animais como o “scrapie” é constituído de

proteínas e nada mais (Prusiner e col., 1982). Seu trabalho se opôs ao dogma de que doenças transmissíveis requerem um material genético composto de ácido nucléico (Bendheim e col., 1985). Ele mesmo sugeriu que a partícula protéica se chamasse prion ("proteinaceous infectious particles") e se apoiava no fato de que quando Alper e colaboradores (1967) inativavam com UV o "DNA de scrapie", o extrato de cérebro ainda mantinha o poder de transmitir a doença. Neste mesmo ano Prusiner e colaboradores purificaram a partícula infecciosa a partir de cérebros de hamsters infectados com scrapie e mostraram fortes evidências da presença de proteínas e em contrapartida ausência de ácido nucléico associado, concluindo, então, que o agente é composto exclusivamente por proteínas.

Vários questionamentos surgiram então a respeito do gene que codificaria a proteína prion e em 1984, em colaboração com Leroy E. Hood, o grupo de Prusiner construiu sondas degeneradas, baseadas em 15 aminoácidos da extremidade N-terminal de prion e puderam localizar o gene (PrP) nas células de mamíferos não infectadas (Prusiner e col., 1984). Estas mesmas sondas permitiram que Oesch e colaboradores (1990) identificassem o gene PrP em células de hamster.

As partículas infecciosas purificadas foram utilizadas na produção de anticorpos e estes reconheceram uma proteína de 33-35 kDa, presente tanto no cérebro de animais normais como nos de animais infectados (Chesebro e col., 1985, Barry e col., 1986). Além disso o seqüenciamento dos resíduos da porção aminoterminal da proteína presente nas partículas infecciosas permitiu a síntese de peptídeos, os quais foram utilizados na imunização de coelhos e o soro então obtido foi capaz de reconhecer a mesma proteína 33-35 kDa, em extratos de cérebros de animais infectados (Barry e col., 1986).

Concluiu-se então que existe um gene celular que codifica prion e que este, assim como sua proteína correspondente, está presente tanto em células normais como infectadas. Surgiu então uma questão intrigante: como os animais produzem prion e não ficam doentes? Pan e colaboradores (1992) indicaram que a proteína existente em células não infectadas, chamada então de PrP celular (PrP_c) consistia primariamente de α -hélices (42%), enquanto que a infecciosa, denominada de PrP scrapie (PrP_{sc}) era rica em regiões β -pregueadas (43%). O mesmo grupo de Prusiner passou então a avaliar se as α -hélices poderiam ser convertidas em estruturas β -pregueadas. Gasset e col. (1992) conseguiram converter peptídeos sintéticos correspondentes às regiões de α -hélice em

β -pregueadas e três anos mais tarde Nguyen e colaboradores (1995) mostraram que na conformação β -pregueada, estes peptídeos impõe sua forma a peptídeos helicoidais.

Um trabalho simultâneo aos que vinham sendo realizados pelo grupo de Prusiner mostrou que PrPc pode ser convertido em PrPsc in vitro (Kocisko e col., 1994) e após a conversão a proteína rica em estruturas β -pregueadas é insolúvel o que explicaria a deposição tóxica nos tecidos cerebrais (revisado por Kakizuka, 1998). A doença de prion poderia então ser causada pela alteração da conformação da proteína celular gerando uma isoforma de diferente estrutura e bastante insolúvel.

Doenças neurodegenerativas humanas causadas por prions

As doenças priônicas humanas tradicionalmente relatadas são Kuru, CJD (Creutzfeldt - Jakob disease), GSS (Gerstmann - Straussler - Scheinker) e Insônia Familiar Fatal (FFI). Estas podem ser divididas em três categorias etiológicas: esporádicas (CJD), adquiridas (CJD iatrogênica e CJD variante e Kuru) e hereditárias (CJD, GSS e FFI). Estas últimas estão associadas à mutações do gene de PrPc (Prnp), sendo que mais de 20 mutações são conhecidas (revisado por Martins e col., 2000). Não há alterações genéticas descritas para as formas esporádicas ou adquiridas, mas um polimorfismo comum no resíduo 129 (metionina para valina) é determinante para susceptibilidade às formas adquiridas da doença (Collinge e col., 1991, Palmer e col., 1991, Windl e col., 1996).

Kuru é uma doença cerebral neurodegenerativa reportada em canibais da Papua-Nova Guiné que possuíam o hábito de comer cérebros e vísceras de antepassados. Atualmente considerado ilegal pelo governo estes rituais não têm sido praticados e, portanto, nenhum ou poucos casos têm sido evidenciados (revisado por Bedino, 1995).

O primeiro relato de CJD data de 1920 quando Dr. Creutzfeldt reportou na Alemanha um caso curioso de demência. Um ano depois Dr. Jakob reportou quatro casos de pacientes dementes de meia idade com sintomas muito parecidos que levavam à morte. Estes casos e outros mais vieram entre as décadas de 30 e 50, mas sem a identificação de um agente etiológico (revisado por Bedino, 1995).

Assim como Hadlow conectou Kuru a scrapie (Hadlow, 1959), Klatzo e colaboradores fizeram a mesma conexão entre Kuru e CJD (Klatzo e col., 1959). Segundo Hadlow estas doenças eram atribuídas a um vírus lento e mais tarde foram

subseqüentemente transmitidas para chimpanzés confirmando a teoria da infectividade (Gajdusek e col., 1966).

Hoje se sabe que há deposição de PrPsc em cérebros de pacientes afetados com CJD. Esta doença possui uma distribuição mundial e uma taxa de ocorrência de 1 em 1 milhão, acometendo tanto homens como mulheres entre 60 e 65 anos de idade. Aproximadamente 15% dos casos parecem ter sido herdados, sendo que a grande maioria é esporádica, ou seja, como dito anteriormente: não associadas a mutações no gene de PrP (revisado por Weissman, 1996).

Dentre as mutações observadas no gene de PrPc de pacientes portadores de CJD, a mais freqüente, correspondendo a 60% destas, ocorre no códon 200 (ácido glutâmico para lisina) e está associada à forma mais típica da doença (Brown, 1992, Brown e col., 1994), embora mutações nos códons 178 (ácido aspártico para asparagina) e 210 (valina para isoleucina) possam estar associadas a alterações semelhantes. As mutações nos códons 198 (fenilalanina para serina) e 217 (glutamina para arginina) estão presentes em uma forma variante de CJD semelhante a GSS, doença que será descrita a seguir, onde se observa deposição simultânea do material amilóide de prion e do β -amilóide característico da doença de Alzheimer (Richardson e Masters, 1995). Uma mutação no códon 105 (prolina para leucina) também foi descrita por Kitamoto e colaboradores (1993) em pacientes portadores desta forma de CJD semelhante a GSS. Além destas, outras mutações associadas a CJD foram descritas mais recentemente como a do códon 180 (valina para isoleucina), do códon 196 (ácido glutâmico para lisina), do códon 203 (valina para isoleucina), do códon 208 (arginina para histidina) e do códon 211 (ácido glutâmico para glutamina). Informações disponibilizadas na rede: <http://ca.expasy.org>.

Além de mutações vários polimorfismos foram relatados no gene de PrPc como associadas a CJD, como por exemplo o de Petersen e colaboradores (1994) que mostraram uma forma de CJD familiar com mutação no códon 178 (ácido aspártico para asparagina) associada ao polimorfismo no códon 129 (Metionina para Valina).

Ainda não é conhecido como prions podem causar doença esporádica, muito se especula pela possibilidade de ter ocorrido, mutação somática do gene de PrPc ou conversão espontânea de PrPc a PrPsc (revisado por Prusiner, 1998).

Existem ainda alguns casos de CJD adquiridos de forma iatrogênica por transplante de córnea, implantação de dura-máter ou de eletrodos no cérebro, uso de materiais cirúrgicos contaminados e uso de hormônio do crescimento extraído de

pituitária de cadáveres (Brown e col., 1992), antes do desenvolvimento do hormônio recombinante. O motivo do envolvimento destes veículos de contaminação seria o fato da proteína prion ser resistente a todos os métodos de esterilização convencionais dificultando a aplicação de protocolos de descontaminação em laboratórios e hospitais (Steelman, 1999).

GSS é uma doença do tipo CJD que foi primeiramente diagnosticada em 1928 por Dr. Gertsmann e seguida pela identificação de sete casos adicionais em 1936 relatados pelos três pesquisadores que dão nome à doença (revisado por Bedino, 1995). Difere de CJD por ser mais rara (um em dez milhões) e acometer pacientes mais jovens (40 anos em média). Esta sim é uma doença tipicamente hereditária, pois em 1989, Hsiao e colaboradores identificaram que a mutação pontual no gene de PrPc que alterou o códon 102, substituindo uma prolina por uma leucina, está associada ao desenvolvimento da doença. Esta mutação é a mais freqüente mas várias outras foram descritas como a do códon 105 de prolina para leucina, do códon 117 de alanina para valina, do códon 145 de tirosina para parada da tradução, do códon 187 de histidina para arginina, do códon 198 de fenilalanina para serina, do códon 202 de ácido aspártico para asparagina, do códon 212 de glutamina para prolina e do códon 217 de glutamina para arginina (revisado por Martins e cols., 2000).

Estudos realizados com camundongos transgênicos, que expressam PrPc humano, confirmaram que mutações no gene de PrPc podem causar neurodegeneração. Foram gerados camundongos transgênicos com o gene de PrPc humano mutado no códon 102 (GSS) e cinco linhagens que expressavam altas concentrações de PrPc mutado desenvolveram neurodegeneração espontânea com características semelhantes às presentes em células de pacientes com GSS (Hsiao e col., 1990, Hsiao e col., 1994, Telling e col., 1996a). Além disso, extratos de cérebro de pacientes com outras doenças priônicas hereditárias como a já descrita CJD e a FFI transmitem doença ao camundongo transgênico MHu2M, que é uma quimera e possui o gene de PrPc humano flanqueado por seqüências do gene de camundongo (Telling e col., 1996b).

FFI, outro caso de doença humana priônica hereditária, foi descoberta por Medori e colaboradores (1992). Genotipicamente há uma alteração no códon 178 do gene de PrPc (ácido aspártico para asparagina) e fenotipicamente esta doença caracteriza-se por demência, atrofia talâmica seletiva, distúrbios do sono e motores. Conforme foi anteriormente descrito esta mutação também está associada a CJD

entretanto o determinante do fenótipo resultante será na verdade o polimorfismo associado ao códon 129. Desta forma, a mutação do códon 178 associada à presença de metionina no códon 129 produz FFI e com valina produzirá CJD (Petersen e col., 1994).

A mais nova forma descrita de manifestação humana é a variante de CJD (Will e col., 1996, Bateman e col., 1995, Britton e col., 1995). Esta doença difere da clássica CJD por acometer indivíduos mais jovens, mas em contrapartida arrasta-se por 14 meses, enquanto que a primeira, após os primeiros sintomas até a morte tem um período de evolução de 4 a 5 meses (revisado por Pattison, 1998).

Em 1996 Collinge e colaboradores mostraram que o padrão de glicosilação da proteína prion que causa vCJD (variante de CJD) é diferente daquele que causa CJD esporádica ou hereditária mas assemelha-se ao de BSE. Um ano depois Bruce e colaboradores (1997) determinaram que em termos de período de incubação e perfil de lesão a vCJD é idêntica a BSE que foi transmitida para camundongos quiméricos que possuem o gene de PrPc humano. Desta forma, acredita-se que a vCJD seja a forma de doença adquirida por ingestão de carne de gado bovino contaminado.

Barreiras entre espécies e cepas de prion

Parece impossível conceber que uma partícula essencialmente protéica possa por si só adquirir várias conformações, mas hoje se sabe que prions podem adotar múltiplas formas e dependendo daquela que adquirem podem converter a proteína normal à infecciosa mais eficientemente, necessitando de tempos menores de "incubação". Além disto, uma determinada cepa poderia preferencialmente se ligar a neurônios enquanto que outras não (Prusiner, 1995).

É provável que as diferentes cepas de prion decorram da conformação da estrutura terciária, este fato baseia-se na observação anteriormente citada de que pelo menos duas conformações são aceitas para a mesma molécula (α -hélice e β -pregueada). Estas cepas podem ter sido geradas pela passagem por diferentes organismos, adquirindo conformações peculiares a cada espécie hospedeira, promovidas provavelmente por chaperonas específicas (Prusiner, 1998).

Esta especificidade de prion leva ao aparecimento de barreiras de infecção entre espécies o que dificulta as transmissões, fato este confirmado por Pattison e Milson (1961a) que mostraram a dificuldade de transmissão do “scrapie” de ovelhas para roedores, sugerindo que a quebra da barreira entre espécies é uma condição a ser transposta para a propagação das doenças priônicas.

O aparecimento de uma nova doença priônica humana, vCJD, após a explosão de BSE, ambas na mesma região do Reino Unido, levou a questionamentos interessantes a respeito de contaminação por ingestão de carne contaminada e à conseqüente quebra de barreiras entre espécies.

O experimento mais clássico que demonstra a existência de barreiras entre espécies no desenvolvimento das doenças priônicas é o realizado por Scott e colaboradores (1989) que geraram um camundongo transgênico, expressando PrPc de hamster e que quando infectado com scrapie de hamster desenvolvia a doença, enquanto que o camundongo normal, quando infectado com o mesmo tipo de scrapie raramente ficava doente.

Baseado neste conceito Prusiner propôs que a barreira entre espécies envolveria uma proteína, denominada por ele de proteína X, que funcionaria como uma chaperona espécie específica e participaria dos processos de transição estruturais durante a propagação do prion scrapie (Telling e col., 1995).

Tratamentos: hipóteses

O entendimento da estrutura tridimensional de PrPc poderia gerar protocolos de terapias, como por exemplo uma droga que pudesse se ligar a um sítio central da molécula de PrPc e estabilizar as quatro hélices de forma que o prion scrapie não pudesse convertê-las em estruturas β -pregueadas (Prusiner, 1995).

Os estudos do grupo de Prusiner a respeito da proteína X trouxeram à tona o conceito de que proteínas que participariam do processo de conversão ou ainda que se ligassem a PrPc (revisado por Martins e col., 2001) poderiam ser alvo de drogas no tratamento das doenças priônicas.

Foi demonstrado que o tratamento de hamsters infectados com scrapie com anfotericina B, prolonga o tempo de acumulação de PrPsc no cérebro destes animais (Xi e col., 1992) e mais recentemente foi demonstrado que este fungicida inibe a produção de PrPsc em células N2A, um neuroblastoma murino (Mange e col., 2000).

Supattapone e colaboradores vêm demonstrando que as poliaminas ramificadas são capazes de eliminar a infectividade de células N2A cronicamente infectadas com prion. Este estudo mostra portanto, pela primeira vez, que um composto é capaz de "curar" uma infecção pré-existente, sendo que até então só haviam sido descritas drogas que, como a anfotericina B, prolongavam o tempo de "incubação" (Supattapone e col., 2001).

Outra idéia para terapia é inspirada pela pesquisa de animais nocaute (deficientes na expressão de PrPc). Como os primeiros camundongos gerados eram normais (Büler e col., 1992) sugeriu-se que as terapias baseadas na técnica do DNA antisense ou antígeno pudessem ser empregadas (Prusiner, 1995).

Nocautes e função normal de PrPc

A geração de um animal onde o gene que codifica uma proteína de interesse está deletado pode ser um método elegante de se estudar a função desta proteína. As prováveis funções de PrPc vêm sendo esclarecidas por diferentes grupos, incluindo o nosso, uma vez que a forma celular de prion não deve existir apenas para causar doença, mas também deva possuir, obviamente, uma função fisiológica normal.

O primeiro camundongo nocaute de PrPc foi gerado pelo grupo do Dr. Charles Weissmann em 1992 (Büler e col., 1992) e os testes realizados com este animal revelaram que o seu comportamento e desenvolvimento eram normais. Além disto, um ano mais tarde o mesmo grupo observou que estes animais eram completamente resistentes à infecção por prions (Büler e col., 1993). Assim como este animal, um nocaute gerado posteriormente por outro grupo (Manson e col., 1994) era absolutamente normal e ambos não revelaram portanto qual seria a função fisiológica da proteína. Apenas poucos anos mais tarde é que alguns grupos mostraram que estes animais possuíam anormalidades como: alteração do ritmo circadiano (Tobler e col., 1996),

diminuição de potencial de longa duração (Collinge e col., 1994), maior susceptibilidade a drogas epileptogênicas (Walz e col., 1999) e aumento de atividade locomotora (Roesler e col., 1999).

Em 1996 Sakagushi e colaboradores desenvolveram o terceiro animal nocaute e observaram que este se desenvolvia normalmente mas possuía uma perda das células de Purkinje no cerebelo, o que por volta de 70 semanas de idade provocava ataxia.

Mais tarde Moore e colaboradores (1999) estabeleceram outra linhagem de nocautes que também desenvolvia ataxia tardia, neste trabalho ficou provado que a estratégia utilizada para a produção dos diferentes nocautes é que era determinante do fenótipo resultante. Nestes animais, ao contrário dos de Büeler e de Manson havia uma inserção do cassete de neomicina no íntron1, enquanto que nos anteriores a inserção só incluía a região do éxon 2 onde está toda a fase aberta de leitura. Ainda neste trabalho foi identificado um gene correlato a PrP, que foi chamado Doppel, localizado a 3' do gene de PrPc que estaria superexpresso nos novos animais provocando ataxia. A inserção no íntron rompeu o sítio de "splicing" e propiciou que o promotor de PrPc, que é mais forte que o de Doppel regulasse esta última. Desta forma foi sugerido que o fenótipo destes animais não seria devido só à falta de PrPc mas sim, gerado também pela superexpressão de Doppel, o gene correlato. Esta descoberta é intrigante, mas ainda assim não desvendou qual seria a função normal de PrPc.

PrPc é uma glicoproteína expressa na superfície de diferentes tipos celulares, sendo que de forma mais abundante em neurônios (Moser e col., 1995, Brown e col., 1998a, Brown e col., 1998b, Diomedea e col., 1996). Esta localização sugere que seu papel pode estar relacionado à captação de ligantes, adesão ou sinalização celulares (revisado por Martins e col., 2001).

A região N-terminal de PrPc liga íons cobre com afinidade da ordem de micromolar através de 4 histidinas contidas em 5 ou 6 regiões repetidas, de 8 aminoácidos cada (Hornshaw e col., 1995, Brown e col., 1997a, Viles e col., 1999).

Brown e colaboradores (1997a) reportaram que o conteúdo de cobre de extrato de membrana de cérebros de camundongos nocaute é de 10-15 vezes menor comparado a camundongos normais. Além disso, camundongos transgênicos com expressão aumentada de PrPc têm resistência ao estresse oxidativo também aumentada (Brown e col., 1997b, Brown e Besinger, 1998). Ou seja, a habilidade de PrPc ligar cobre pode modular a atividade da maior enzima antioxidante, a Cu/Zn superóxido dismutase

(SOD-1). Além disso PrPc possui uma localização concentrada nas membranas sinápticas (Salès e col., 1998) sugerindo que exerça aí um papel protetor destas contra o dano oxidativo (Brown, 2001).

Outra abordagem de estudo que cerca a função de PrPc é a identificação de proteínas ligantes de PrPc. Vários trabalhos mostram que PrPc liga proteínas como chaperonas (Edenhofer e col., 1996; Jin e col., 2000), GFAP (Oesch e col., 1990), Apolipoproteína 1 (Yehiely e col., 1997), BCL-2 (Kurschner e Morgan, 1996) e o receptor de laminina de 37 kDa (Rieger e col., 1997).

Em 1997 nosso grupo (Martins e col., 1997) identificou que uma proteína de membrana de 66 kDa liga PrPc *in vitro* e *in vivo* e que o soro que reconhece esta proteína inibe a toxicidade do peptídeo correspondente a região 106-126 da molécula de PrPc, comprovadamente tóxico para neurônios em cultura (Forloni e col., 1993).

Em recentes trabalhos nosso grupo identificou mais um ligante de PrPc: a proteína de matriz extracelular laminina (Graner e col., 2000a, Graner e col., 2000b). Esta observação é consistente com a possível função de PrPc em adesão e reconhecimento. Nestes trabalhos mostramos que PrPc é um receptor para laminina altamente específico e saturável, além de possuir sítio de ligação no decapeptídeo RNIAEIIKDI localizado na extremidade carboxi da cadeia γ -1 da laminina. Além disto foram realizados ensaios de neuritogênese de células PC-12 ou cultura primária de neurônios hipocámpais plaqueadas sobre laminina, mostrando que as células do camundongo nocaute (Büeler e col., 1992) fazem menos neuritos sobre LN quando comparadas com o camundongo normal. Anticorpos anti-PrPc diminuem a neuritogênese sobre laminina de células PC-12 ou de hipocampo de animais normais não tendo atividade sobre células de camundongos nocautes. Estas abordagens foram as primeiras relatadas até hoje que atribuem um papel fisiológico para a associação de PrPc com outra proteína.

Conforme citado anteriormente, devido à sua localização, PrPc pode funcionar como uma molécula sinalizadora (Martins e col., 2001). Vários estudos foram realizados com a porção neurotóxica da molécula (Forloni e col., 1993) e mostraram seu envolvimento de canais de cálcio e na mobilização do cálcio intracelular (Lin e col., 1997). Os dois ligantes de PrPc que caracterizamos, o receptor de 66 kDa (Martins e col., 1997) e a laminina (Graner e col., 2000a) transduzem sinais via AMPc e cálcio (Martins e col., 2001). Recentemente foi demonstrado também que PrPc aumenta a

fosforilação de Fyn, uma tirosina quinase sendo que caveolina-1 foi caracterizada como fator intermediário entre PrPc e Fyn intracelular. Entretanto, o ligante de PrPc que transduziria este sinal não foi demonstrado (Mouillet-Richard e col., 2000).

O gene de PrPc e seu promotor

O gene humano de PrPc (Puckett e col., 1991), assim como o de hamster (Basler e col., 1986), possui dois éxons, sendo que a fase aberta de leitura está no segundo éxon. O gene de rato (Saeki e col., 1996a) que possui uma estrutura genômica similar ao de camundongo (Westaway e col., 1994) tem 16 Kb e três éxons sendo que o codificador é o terceiro. Não foi identificada sequência TATA na região 5' que flanqueia o sítio de início da transcrição (Westaway e col., 1994).

Em 1996 Saeki e colaboradores identificaram a região promotora do gene de PrPc de rato (Saeki e col. 1996b), sendo que as de camundongo e de hamster já haviam sido previamente descritas (Basler e col., 1986, Westaway e col., 1994), um ano depois foi identificada a sequência bovina (Inoue e col., 1997) e recentemente foi identificada a mesma região do gene humano (Mahal e col., 2001). Apesar da caracterização tanto do gene como do promotor de PrPc sua regulação ainda é desconhecida. A identificação dos determinantes do balanço da regulação de PrPc é importante para avaliar como a expressão deste gene está relacionada ao desenvolvimento das doenças priônicas, bem como aos processos fisiológicos que ainda demandam elucidação.

Alguns autores acreditam que este gene seja do tipo “housekeeping” porque seu RNA mensageiro (RNAm), apesar de ser altamente regulado durante o desenvolvimento (Manson e col., 1992), é constitutivamente expresso em cérebros de animais adultos (Basler e col., 1986, Chesebro e col., 1985, Oesch e col., 1985). Entretanto, já foi demonstrado que NGF regula positivamente a expressão do RNAm de PrPc (Mobley e col., 1988, Wion e col., 1988). De fato, recentemente observamos que esta neurotrofina também regula positivamente a expressão da proteína PrPc em células PC-12 (Graner e col., 2000a).

Baseado na sequência do promotor (ilustração 1) clonado por Saeki e colaboradores (1996b), que possui sítios de ligação AP-1, AP-2, SP-1 e CCAAT este

trabalho teve por objetivo identificar possíveis reguladores da atividade transcricional deste promotor. Para isso foram estabelecidos clones de células PC-12 (feocromocitoma) e C6 (glioma) estavelmente transfectadas com um vetor contendo o promotor do gene de PrPc controlando o gene “reporter” de luciferase.

Além da neurotrofina NGF, que como citado anteriormente, pode regular as concentrações de RNAm e de proteína PrPc, foram escolhidas drogas que poderiam ter atividade sobre fatores de transcrição que possuem elementos específicos no promotor do gene de PrPc.

A presença de um elemento AP-1 no promotor do gene de PrPc sugere que homodímeros Jun/Jun ou heterodímeros Jun/Fos podem regular sua atividade (Angel e col. 1987). Além disto foi demonstrado que Jun pode ligar e regular a atividade do fator de transcrição SP-1 (Kardassis e col., 1999), cujo elemento de resposta está representado em três regiões do promotor de PrPc. Desta forma, TPA (éster de forbol) que é sabidamente um indutor de proteína quinase C (PKC) e conseqüentemente da atividade dos membros da família de fatores de transcrição AP-1, Jun e Fos (Angel e col., 1987), foi empregado na avaliação da regulação da atividade do gene de PrPc.

O tratamento de células com Dexametasona, um hormônio glicocorticóide sintético, ativa o receptor citoplasmático específico (GR) que migra para o núcleo onde funcionará como um fator de transcrição (Tienrungrøj e col., 1987). Os promotores que possuem o elemento de resposta a glicocorticóides (GRE) são comumente o alvo de GR ativado (Tsai e col., 1989). Apesar do promotor de PrPc não possuir um GRE consenso, o receptor de glicocorticóide ativado também pode interagir com os fatores de transcrição da família AP-1 e regular a transcrição gênica (Pfahl, 1993).

Outro composto, empregado para avaliar a regulação da atividade do promotor de PrPc foi o ácido retinóico (RA). O uso deste composto foi sugerido devido à presença do elemento de resposta AP-2 no promotor de PrPc. Sabe-se que a expressão do fator de transcrição AP-2 é estimulada pela diferenciação celular com ácido retinóico (Williams e Tjian, 1991), além disto foi demonstrado que há diminuição da expressão do RNAm de PrPc em células HL-60 tratadas com RA (Dodelet e Cashman, 1998).

Ilustração 1: Esquema da localização dos elementos de resposta do promotor de PrPc e da relação das drogas utilizadas na ativação de fatores de transcrição correspondentes aos respectivos sítios de ligação.

O AMPc é um segundo mensageiro que induz a proteína quinase A (PKA) e conseqüentemente a fosforilação do fator de transcrição CREB (Gonzalez e col., 1991). Apesar do promotor de PrPc não possuir um elemento de resposta para este fator de transcrição (CRE), é sabido que CREB em alguns sistemas interage com elementos AP-1 (Masquillier e Sassone-Corsi, 1992) e em outros sistemas com AP-2 (Walton e Rehfuess, 1990). Portanto, foi utilizado o 8-Bromo AMPc, um análogo deste segundo mensageiro, ao qual a membrana é permeável, para avaliação da regulação do promotor de PrPc.

O acesso de fatores de transcrição à região do promotor é extremamente dependente da conformação da cromatina, sendo que a ligação do DNA às histonas funciona como repressor da transcrição (Kornberg e Lorch, 1999). Esta ligação é dependente do balanço acetilação/deacetilação das histonas, ou seja histonas acetiladas desligam do DNA e permitem que a transcrição seja iniciada, enquanto que a deacetilação tem o efeito oposto (Grunstein, 1997).

Os fatores de transcrição, ou proteínas associadas a estes, têm atividade acetiladora de histonas (HAT), regulando desta forma a conformação da cromatina e permitindo o início da transcrição, sendo exemplos de complexos coativadores aqueles formados por P/CAF, TRAP, DRIP, CBP/p300 e SWI/SNF e suas proteínas associadas (Xu e col., 1999). Outros fatores, como N-CoR ou SMRT por exemplo, possuem atividade de deacetiladores de histonas (HDAC) levando à inibição da transcrição (Xu e col., 1999).

Neste trabalho empregamos a Tricostatina A (TSA), um antibiótico fungistático com uma potente ação inibidora da histona deacetilase (Yoshida e col., 1990), para romper a estrutura compacta da cromatina e avaliar se a regulação do promotor de PrPc seria determinada pela maior ou menor exposição dos elementos de resposta aos fatores de transcrição.

A atividade do promotor foi medida nos clones de células PC-12 e C6 frente aos tratamentos com as drogas descritas e com associações destas com Tricostatina A, para se avaliar não só a regulação gerada pelos fatores de transcrição endógenos na cromatina desenovelada, mas também de fatores de transcrição especificamente induzidos pelas drogas usadas. Os resultados aqui apresentados mostram que a regulação do promotor de PrPc é extremamente dependente da conformação da cromatina, uma vez que TSA induziu a atividade do promotor nos clones analisados de

10 a 4000 vezes, isto foi seguido por um aumento tanto nas concentrações do RNAm como da proteína PrPc.

TPA e AMPc também foram capazes de aumentar a atividade do promotor de PrPc e também de potencializar o efeito indutor de TSA quando estas drogas foram associadas. Já o ácido retinóico reduziu a atividade deste promotor e também o efeito indutor de TSA, enquanto que DEX e NGF não apresentaram efeito à nível transcricional.

Este trabalho é a primeira evidência de que o promotor de PrPc pode ser regulado, além disto incrementa dados a respeito de promotores regulados por conformação da cromatina.

Objetivos

1-Avaliar a regulação do promotor de PrPc com base na composição dos elementos de resposta presentes na região promotora do gene de PrPc.

2-Verificar a interferência da conformação da cromatina na regulação da expressão do gene de PrPc.

3-Analisar as expressões do RNAm e proteína PrPc e correlacioná-las com a atividade transcricional do promotor do gene de PrPc.

Material e Métodos

1-Linhagens celulares

Células PC-12 foram estabelecidas após clonagem por diluição limitante a partir de um feocromocitoma (adrenal) de rato. Estas células apresentam diferenciação reversível após tratamento com NGF (Greene e Tischler, 1976).

Células C6 foram estabelecidas em cultura por diluição limitante a partir de um glioma de rato induzido quimicamente por N-nitrosometiluréia (Benda e col., 1968).

2-Síntese de iniciadores (primers).

Os iniciadores que flanqueiam a região de -2831 a +47 do promotor do gene de PrPc de rato foram sintetizados no Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre o Câncer-SP com base nos dados da literatura (Saeki e col., 1996b).

As seqüências são:

"Forward": 5'-TTAAGTAAGCTTTTAAAGCCACTTCCTG-3'

"Reverse": 5'-TGCCAAGCTTCTGCCACCGACGCGACGCTCAG-3'

Para a reação em cadeia da polimerase foram utilizados estes iniciadores e como "molde" foi utilizado DNA proveniente de tecidos cerebrais normais de rato.

3-Extração de DNA de cérebro de rato (Sambrook e col., 1989; Ausubel e col., 1998).

O cérebro foi retirado, pesado e congelado a -70 °C até o dia do uso. No dia da preparação o tecido ainda congelado foi pulverizado em um Termovac com gelo seco e nitrogênio líquido. A cada 100mg de tecido foram adicionados 1ml de tampão TES (TrisHCl 10mM pH 8,0; EDTA 10mM e SDS 0,6%) e proteinase K (GibcoBRL - Gaithersburg, M.D. USA). A mistura foi incubada por 16 horas a 37°C.

Após a incubação o DNA foi extraído com igual volume de fenol saturado com 1M de TrisHCl pH8,0, agitado por 5 minutos e centrifugado por 10 minutos a 22.000xg a 4°C. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e extraída com clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 24:1, centrifugado por 10 minutos a 22.000xg e a fase aquosa

novamente transferida para outro tubo. O DNA foi então precipitado com 0,3M de acetato de sódio e 2,5 volumes de etanol absoluto por 16 horas a -20°C. O material foi centrifugado por 20 minutos a 22.000xg e o DNA precipitado e seco foi ressuspensionado em água deionizada e autoclavada. Este pôde ser então dosado por leitura da absorbância no comprimento de onda de 260nm (1DO=50µg/ml), sendo que sua pureza foi determinada pela razão 260/280nm que foi sempre superior a 1,8.

4-Reação em cadeia da polimerase (PCR).

Aproximadamente 0,7µg de DNA extraído de cérebro de rato foram utilizados para amplificação da região promotora do gene de PrPc. Cada reação foi realizada em 50µl, sendo que ao DNA foi acrescentado tampão da enzima Tth (*Thermus aquaticus*) DNA polimerase (3,3x buffer) para concentração final de 1,1x, 1,25mM de acetato de magnésio, dNTPs para concentração final de 200µM e iniciadores para concentração final de 0,6µM. A mistura foi completada com água deionizada e autoclavada. Todos os componentes pertencem ao kit “Gene Amp XL PCR” (Perkin Elmer, Cetus USA) e a reação foi realizada em tubos “Hot Start” (GibcoBRL - Gaithersburg, M.D. USA). Segundo as determinações do fabricante foi preparada uma mistura inicial de apenas 25 µl com todos os componentes anteriormente descritos, incluindo o DNA. A parafina do tubo foi derretida e após a solidificação desta sobre a primeira mistura de reação, foi então acrescentada ao tubo a mistura superior de 25 µl que continha apenas água, tampão 3,3x (final 1,1x) e a enzima Tth (final 2U/µl).

As condições da reação foram: 1 ciclo inicial a 93°C por 1 minuto, 35 ciclos intermediários a 93°C por 30 segundos, 68°C por 10 minutos (com aumentos de 10 segundos por ciclo), 72 °C por 10 minutos e 1 ciclo final a 72°C por 10 minutos. A reação foi processada em um equipamento Hybaid Omnigel da Incibrás.

Os produtos da reação foram separados em gel não denaturante de poliacrilamida para confirmação da amplificação.

5-Gel não denaturante de poliacrilamida e coloração por prata.

Foi preparada uma solução 8% de poliacrilamida em TBE 1X (0,1M TrisHCl pH 8,0; 0,7M Ácido bórico; 3,5M EDTA) contendo acrilamida e bis-acrilamida na proporção 29:1 e água deionizada e autoclavada. O gel foi preparado utilizando esta solução acrescida de persulfato de amônio 10% na proporção 1:100 e TEMED (N’N’N’N’ tetrametiletilenodiamina) na proporção 1:1000.

Após a separação dos produtos à 20mA em tampão de corrida TBE 1X, o gel foi corado por prata segundo o método de Sanguinetti e colaboradores (1994).

O procedimento de coloração consistiu em uma fixação, sob agitação constante, em uma solução contendo 10% de etanol absoluto e 0,5% de ácido acético em água. Após 5 minutos foi acrescentada uma solução de 0,2% de nitrato de prata em água que permaneceu por mais 7 minutos, após o que foi rapidamente lavada com água deionizada e o gel pôde então ser incubado com uma solução contendo 2,25% de NaOH e 0,5% de formaldeído 37% em água até o aparecimento das bandas.

6-Clonagem intermediária em pUC18.

6.1-Preparo do inserto.

Com o produto da PCR obtido no item 3 procedeu-se uma reação de “blunt ended” utilizando a atividade 3’- 5’ éxonuclease do fragmento Klenow da DNA polimerase I para remover uma base desapareada na extremidade 3’ e o fragmento foi concomitantemente fosforilado pela T4 polinucleotídeo quinase (T4 PNK).

Aproximadamente 16µl do DNA amplificado foram incubados a 37°C por 1 hora com 6U de Klenow, 6U de T4 PNK e tampão blunting/kinase 1X em um volume final de 20 µl, completado com água deionizada. A reação foi extraída com igual volume de fenol/clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e centrifugada a 22.000xg por 1 minuto. A fase aquosa foi recuperada e o DNA purificado em uma micro-coluna de Sephacryl S 200HR (resina em 100mM NaCl, 10mM TrisHCl, pH7,6 e 1mM EDTA). Este procedimento permitiu tornar as extremidades do produto de PCR abruptas para a ligação em pUC18, este vetor já possui as extremidades não coesivas e defosforiladas devido à prévia digestão com Sma I e tratamento com CIP (“calf intestinal phosphatase”) respectivamente. Todos os materiais utilizados no preparo do inserto

pertencem ao kit “Sure Clone” da Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, Buckinghamshire, England).

6.2- Ligação do inserto em pUC18.

O fragmento do promotor foi inserido em pUC18 (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, England) inicialmente, para que pudéssemos seqüenciá-lo em um seqüenciador automático Alf da Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, Buckinghamshire, England).

A ligação do inserto contendo a região promotora do gene de prion celular de rato (RaPrPc prom) em pUC18 foi procedida utilizando-se 13µl do material eluído da micro coluna, que contém o inserto (item 5.1), 50ng do vetor defosforiado (pUC18), 10mM DTT e tampão da enzima T4 DNA ligase 1X para um volume final de 20 µl. Estes componentes foram misturados e só então foram adicionadas 400U da enzima T4 DNA ligase (1µl) da Biolabs e a reação foi incubada por 16 horas a 16°C.

7- Clonagem no vetor “reporter”.

7.1- Preparo do inserto.

A região amplificada, como descrito no item 3 possui nas extremidades sítios para a enzima de restrição Hind III (sítios nos iniciadores), estes foram mantidos, já que esta foi clonada em pUC18 com as extremidades abruptas para seqüenciamento, como descrito no item 5. Esta clonagem intermediária serviu também como fonte de inserto pois este plasmídeo foi inserido em bactérias DH5α (procedimento descrito posteriormente), que foram crescidas e o plasmídeo purificado em maior escala. Procedeu-se então uma digestão deste com a enzima de restrição Hind III (GibcoBRL - Gaithersburg, M.D. USA) e os produtos obtidos foram separados em gel de agarose 8% em 1 X TBE na presença de 0,5 µg/ml de brometo de etídeo. A banda correspondente ao inserto foi eletroeluída em TE e o material foi precipitado com acetato de sódio 0,3M e 2,5 volumes de etanol a -20 °C por 1 hora.

Após a precipitação o DNA foi ressuspendido em água, quantificado em gel analítico 0,8% de agarose e o inserto estava então pronto para ser ligado ao vetor.

7.2-Preparo do vetor pGL3 basic (Promega - Madison, W.I. USA).

O vetor foi digerido com a enzima Hind III, para a qual possui sítio único localizado na região de policlonagem a 5' do gene reporter da luciferase. Para evitar o processo de religação este foi ainda defosforilado em uma reação com 10 unidades da enzima CIP (Biolabs) em tampão apropriado (NEB 4) para um volume final de 10 µl por 1 hora a 37°C. A reação foi inativada com 5mM EDTA, o produto foi extraído com volumes iguais de fenol/clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e eluído conforme as determinações do kit Sure Clone (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, England).

7.3-Ligação do inserto em pGL3 basic.

A ligação do inserto eletroeluído ao vetor pGL3 basic foi procedida da mesma forma que a de pUC18, vale ressaltar que a proporção utilizada de inserto para vetor foi de 5:1 (em ng) em um volume final de 20 µl.

7.4-Preparo e transformação de bactérias competentes (Mandel e Higa, 1970; Cohen e col, 1972; Oishi e Cosloy, 1972).

Bactérias *E. coli* cepas DH5α ou HB101 (GibcoBRL, Gaithersburg, M.D. USA) foram crescidas em 100 ml de meio LB (5g/l extrato de levedura, 10g/l triptona e 5g/l de NaCl pH 7,2). Triptona e extrato de levedura foram adquiridos da MERCK (Darmstadt, Alemanha). Ao atingir a fase exponencial de crescimento ($Abs = 0,3$ a 600 nm ou 10^8 células/ml) foram tornadas competentes a partir do tratamento com $CaCl_2$. A cultura foi centrifugada, o precipitado foi lavado com 10 ml de solução A (10mM MOPS pH 6,5; 10mM $RbCl_2$) e ressuspendido em 10 ml de solução B ($CaCl_2$ 50mM, 10mM MOPS pH 6,5; 10mM $RbCl_2$), foi procedida uma incubação à 4°C por 1 hora e 30 minutos. Estas

bactérias foram ditas competentes e então ressuspensas em 8 ml de solução B mais 10% de glicerol (MERCK Darmstadt, Alemanha), aliquotadas e estocadas à -70°C.

Alíquotas de 100 µl de bactérias competentes foram incubadas a 4°C por 2 horas com 10 µl do produto da reação de ligação (DH5α para pUC18 e HB101 para pGL3) obtidos como descritos nos itens 5.2 e 6.3. A isto se seguiu um choque térmico à 42°C por 2 minutos. As bactérias receberam então 1ml de meio LB e permaneceram por 1 hora à 37°C. Estas foram plaqueadas em LB contendo 15 g/l de bacto ágar (INTERLAB SP, Brasil) e o antibiótico selecionador: ampicilina 100 µg/ml. As bactérias resistentes sofreram mais uma passagem por novo meio sólido com antibiótico e só então foram crescidas em meio líquido para testes posteriores ou seqüenciamento.

7.5- Análise do DNA proveniente da transformação com pLUCPrPcprom.

O material proveniente da ligação em pGL3 basic (item 6.3) foi digerido segundo um padrão de enzimas de restrição conhecido para se verificar a inserção e orientação da região promotora de PrPc. A enzima Bgl II (GibcoBRL - Gaithersburg, M.D. USA) foi utilizada para o diagnóstico dos clones pLUCPrPcprom. Esta possui no vetor um sítio na posição 36, enquanto que Hind III está na posição 52 deste. No inserto, Bgl II está na posição 1998. Após a digestão são esperadas, para a clonagem no sentido “sense” de leitura, duas bandas: de 2,0Kb e de 5,8Kb aproximadamente. Para o sentido inverso, são esperadas duas bandas: de 1,0Kb e outra de 6,8Kb. Se o vetor estiver vazio, deverá, após a digestão enzimática, ser linearizado e apresentar um tamanho de 4,8Kb.

8-Seqüenciamento do promotor de PrPc clonado em pUC18, purificação dos vetores em larga escala e análise do produto purificado.

8.1- Isolamento do DNA plasmidial em pequena escala.

Este procedimento foi realizado conforme as determinações do kit Wizard Minipreps (Promega, Madison, W.I. USA).

As bactérias transformadas com pUC18PrPcprom (inserto clonado em pUC18) ou pLUCPrPcprom (inserto clonado em pGL3 basic) foram inoculadas em 5 ml de LB

com 100µg/ml de ampicilina e crescidas por 16 horas a 37°C sob agitação constante. Estas foram recuperadas, ressuspensas com 150 µl da solução de suspensão (50mM Tris HCl pH 7,5; 10mMEDTA, 100mg/ml RNase A). Após o que foram acrescentados 150 µl da solução de lise (0,2M NaOH; 1% SDS) e agitadas gentilmente. Após isto foram adicionados 150 µl de solução de neutralização (1,32M acetato de potássio) e o lisado foi centrifugado a 22000xg por 10 minutos. O sobrenadante foi recuperado e incubado com 500µl da resina do kit por 30 minutos, sob agitação constante, à temperatura ambiente, após o que foi transferido para uma micro coluna para separar a resina da solução. À resina seca foram adicionados 25µl de água a 70°C e esta centrifugada por 1 minuto para eluir o DNA da mesma. Este procedimento foi repetido com mais 25 µl de água e o DNA pôde ser dosado e estocado para sua utilização nos ensaios.

8.2- Seqüenciamento.

O DNA plasmidial obtido, no caso da ligação em pUC 18, para o qual possuíamos iniciadores fluoresceinados, foi seqüenciado em um aparelho Alf Express da Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, Buckinghamshire, England) segundo o método de Sanger e colaboradores (1977) e a análise desta permitiu a avaliação da integridade e continuidade da região amplificada a partir do DNA de cérebro de rato. Os iniciadores utilizados foram os fornecidos pela Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, Buckinghamshire, England): universal (5'-C G A C G T T G T A A A C G A C G G C C A G T -3') e reverso (5'-C A G G A A A C A G C T A T G A C-3').

A corrida eletroforética foi conduzida por 11 horas a 1500V, 60mA, 25W, 55°C. A leitura ocorre no próprio aparelho através do feixe de raio laser que é sensibilizado com a passagem dos fragmentos marcados pela fluorescência emitida Cy-5 presente nos iniciadores. A detecção é feita por sensores que emitem seus sinais para um computador que os processa convertendo-os na seqüência nucleotídica.

8.3- Isolamento do DNA plasmidial em larga escala.

Este procedimento foi realizado conforme as determinações do kit Wizard Megapreps (Promega, Madison, W.I. USA).

As bactérias transformadas com pSV2neo (Southern e Berg, 1982) ou pLUCPrPc prom sense, foram inoculadas em 250 ml de LB com 100µg/ml de ampicilina e crescidas a 37°C sob agitação constante por 16 horas. As bactérias foram recuperadas, lavadas com STE (10mM Tris HCl pH8; 1mM EDTA; 100mM NaCl) e ressuspensas em 10 ml de solução de suspensão (50mM TrisHCl pH7,5, 10mM EDTA, 100µg/ml RNase A). Após o que foram acrescentados 10 ml de solução de lise (0,2 M NaOH, 1%SDS), agitados gentilmente e, por fim, foram adicionados 10 ml de solução de neutralização (1,32 M acetato de potássio pH 4,8). O sobrenadante foi recuperado após centrifugação a 22.000 xg por 15 minutos e precipitado com 0,3M de acetato de amônio e 2 volumes de etanol absoluto. O DNA foi recuperado após nova centrifugação, ressuspensado em TE (10mM Tris HCl pH 8; 1mM EDTA) e incubado por 1 hora, a temperatura ambiente, com 10 ml da resina do kit. Após o que foi transferido para uma coluna, esta foi lavada duas vezes com 15 ml de "wash buffer" e com 10 ml de etanol 80%. A resina foi seca a vácuo e à ela foram adicionados 3 ml de água a 65°C e deixado por 2 minutos para eluir o DNA. O material pôde então ser dosado e estocado para sua utilização nos ensaios posteriores.

9- Transfecção celular estável.

O método descrito por Chen e Okayama (1988) permite que o DNA seja introduzido nas células por precipitação com fosfato de cálcio. As células PC-12 ou C6 foram plaqueadas um dia antes da transfecção de forma que, no dia da transfecção, sua confluência atingiu 60%. Quatro horas antes da transfecção as células receberam DMEM fresco suplementado com 10% de FBS.

Foram transfectados os plasmídeos pSV2neo (resistência a neomicina) e PrPcpromLUC respectivamente na proporção 1:10, sendo que no total 30 µg de DNA foram precipitados previamente com etanol e ressuspensos em 450 µl de água estéril mais 50 µl de 2,5M de CaCl₂. Um volume de 500µl de tampão 2x HeBs (0,28M NaCl, 50 mM Hepes, 1,48mM Na₂HPO₄ pH 7,05) foi gotejado sob esta solução e agitado

lentamente. Após 20 minutos à temperatura ambiente, a suspensão foi adicionada às placas de forma que seu volume fosse 1/10 do meio de cultura. Procedeu-se uma incubação por 16 horas à 37°C. Após este período o meio foi desprezado e as células foram submetidas a um choque de glicerol (10% glicerol em DMEM) por 60 segundos. A seguir, as células foram re-alimentadas com meio DMEM (Sigma, St. Louis, M.O. USA) fresco, acrescido de 10% de FBS (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil).

Dois dias após a transfecção as células foram repicadas em uma diluição de 1:15 e selecionadas com neomicina (G418 da GibcoBRL, Gaithersburg, M.D. USA) durante 12 dias: 0,4 µg/ml para células PC-12 e 0,8 µg/ml para células C6. Colônias independentes foram recolhidas das placas com o uso de anéis de clonagem e plaqueadas isoladamente. Parte das células de cada clone foi congelada para manutenção do estoque e a outra parte foi utilizada nos experimentos.

10- Tratamentos das células e medida da atividade de luciferase.

As células dos clones e dos controles (C6 e PC-12) foram plaqueadas, em duplicata, em placas de 24 poços (10 mm de diâmetro) em DMEM acrescido de 10% de FBS. Estas foram tratadas com 50ng/ml de NGFβ (Sigma, St. Louis, M.O. USA), 10⁻⁶M de Dexametasona (Sigma, St. Louis, M.O. USA), 1µg/ml de TPA (Sigma, St. Louis, M.O. USA), 0,5mM de ciclo 8-bromoadenosina 3':5' - monofosfato de sódio (Sigma, St. Louis, M.O. USA), 10⁻⁶ M de ácido retinóico all-trans (Sigma, St. Louis, M.O. USA) ou 80ng/ml de TSA (Calbiochem, LaJolla, C.A. USA) por diferentes tempos de acordo com cada ensaio, de forma que ao final do tratamento estavam próximas da confluência. Após o que foram lavadas em PBS e lisadas com 100 µl de tampão apropriado (25mM Tris pH 7,5; 10mM EDTA; 15% sucrose; 2mg/ml lisozima).

Os extratos puderam ser estocados a -20°C e no dia do ensaio 10 µl destes foram incubados com 50 µl do substrato proveniente do kit Luciferase Assay (Promega, Madison, W.I. USA) e imediatamente a reação (emissão de luz) foi medida em um iluminômetro Monolight 3010 (Analytical Luminescence Laboratory).

11- Normalização dos ensaios e análise estatística.

Foi dosada a proteína total dos extratos pelo método de Bradford (1976) para normalização dos ensaios de luciferase utilizando-se o reagente “Dye concentrate” (Biorad, Hercules, C.A. USA). A determinação da atividade basal dos clones foi realizada uma única vez em sextuplicata, normalizada pela proteína total e expressa em valores relativos às respectivas células parentais. Os resultados dos tratamentos, realizados em duplicata, representam a média aritmética de pelo menos quatro ensaios independentes, normalizados pela proteína total e expressos em valores relativos às respectivas células dos clones não tratadas.

Para a análise estatística dos ensaios onde só uma droga foi utilizada aplicou-se o teste T-Student de média única e para ensaios onde as drogas foram associadas à TSA foi empregado o teste não paramétrico de Mann Withney, para amostras não pareadas sendo que foi considerado estatisticamente significativo para ambas o valor de p inferior a 0,05 (Dawson-Saunders e Trapp, 1994).

12- Ensaio de Northern blot

12.1-Preparo de RNA total

Placas de 10 cm de diâmetro contendo células C6 ou PC-12 na confluência de aproximadamente 90% foram tratadas conforme indicado nos resultados. As células foram lavadas com PBS gelado e o RNA total foi preparado com a utilização de Trizol conforme instruções do fabricante (GibcoBRL, Grand Island, N.Y. USA): 2 ml de Trizol foram acrescentados a cada placa e as células lisadas foram removidas com o auxílio de um raspador de borracha. O lisado foi transferido para um tubo e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente, após os quais foi acrescentado 400 µl de clorofórmio, agitado e centrifugado a 22000 xg a 4°C por 15 minutos. A fase aquosa foi então recuperada e RNA precipitado com álcool isopropílico foi recuperado por centrifugação a 22000 xg por 10 minutos e ressuspensionado em água previamente tratada com DEPC (0,2% de dietilpirocarbonato) e autoclavada.

12.2- Fracionamento do RNA em gel de agarose e transferência para membrana de nylon.

Após quantificação por leitura da absorbância a 260 nm, 10 µg de cada RNA obtido foram fracionados em gel de agarose 1% contendo 7% de formaldeído e tampão borato (1M ácido bórico pH 8,3). A eletroforese seguiu-se em tampão apropriado (2% formaldeído, 2% de tampão borato e 0,1% de EDTA em água), após o que o gel foi lavado com solução de SSC (NaCl 3M e Citrato de sódio 0,3M) diluída cinco vezes por 15 minutos e diluída duas vezes por 20 minutos. O RNA foi transferido para uma membrana de nylon por capilaridade durante 18 horas, à temperatura ambiente em SSC diluída 2 vezes. Os RNAs foram fixados a membrana utilizando-se UV Crosslinker® da Fisher Biotech.

12.3- Marcação de sonda de DNA.

Fragmentos de DNA correspondentes a PrPc de camundongo (700pb) e GAPDH de rato (Fort e col., 1985) foram marcados utilizando o kit “Ready-to-go labeling beads” e [α -³²P]dCTP (ambos da Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, England).

Fazem parte do kit “beads” compostos de dATP, dTTP, dGTP, 4-8 unidades do fragmento klenow da DNA polimerase e oligonucleotídeos randômicos de 9 mer. Estes “beads” foram reconstituídos com 20 µl de água deionizada, tratada com DEPC e autoclavada e deixados no gelo de 5 a 60 minutos. Após o que foram adicionados 25 µl do DNA sonda (25 a 50 ng) previamente desnaturado (100°C 5' e gelo) e 5 µl de [α -³²P] dCTP (10mCi/ml). Misturou-se gentilmente e incubou-se a reação por 30 minutos a 37°C. Após a incubação foram eliminados os nucleotídeos livres, passando-se a solução de reação por coluna de Sephacryl S-200 (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, England).

12.4- Pré-hibridização, hibridização e lavagens.

As membranas foram pré-hibridizadas em solução contendo 0,25M de Na₂HPO₄ pH 7,2, SDS 7% (m/v), BSA 1% (m/v) e 1mM de EDTA por 1 hora à 65°C em forno giratório. Após a pré-hibridização, as sondas marcadas, previamente desnaturadas (100°C 5' e gelo) foram adicionadas e a hibridização foi realizada por 12 a 16 horas à

65°C com as sondas de PrPc e GAPDH (700 e 1200pb respectivamente). Esta última serviu como controle interno da quantidade de RNA aplicado no gel. As membranas foram então lavadas com a solução apropriada (0,25M de Na₂HPO₄ pH 7,2, SDS 1% e 1mM de EDTA) por 30 minutos à 65°C, após o que filmes de raios-X foram expostos à estas. Os filmes foram revelados em câmara escura, utilizando-se soluções reveladora e fixadora conforme as especificações do fabricante (Kodak).

13- Citometria de fluxo.

Células PC-12 e C6 foram distribuídas em placas de 60 mm² de área em DMEM acrescido de 10% de FBS e tratadas com 50ng/ml de NGFβ (Sigma, St. Louis, M.O. USA) por 120 horas, 10⁻⁶M de Dexametasona (Sigma, St. Louis, M.O. USA), 1μg/ml de TPA (Sigma, St. Louis, M.O. USA), 0,5mM de ciclo 8-bromoadenosina 3':5'-monofosfato de sódio (Sigma, St. Louis, M.O. USA), 10⁻⁶ M de ácido retinóico all-trans (Sigma, St. Louis, M.O. USA) todos por 24 horas ou 80ng/ml de TSA (Calbiochem, LaJolla, C.A. USA) por 24 e 48 horas. Após o que as células PC-12 foram retiradas das placas na confluência, contadas em câmara de Neubauer, lavadas com PBS e 10⁶ células foram incubadas com o anticorpo policlonal anti-PrPc de camundongo obtido em nosso laboratório (Graner e col. 2000a) na diluição 1:200 por 1 hora a 4°C. Após o que foram lavadas duas vezes com PBS e então incubadas com o anticorpo conjugado anti-IgG de camundongo fluoresceinado (FITC) na diluição 1:80 por 1 hora a 4 °C. As células foram lavadas mais duas vezes e a contagem de 10.000 células foi realizada em um citômetro FACSCAN Consort 32 System com Software Lysis II da Becton Dickson. A reação inespecífica foi avaliada pela incubação das células com soro não imune (soro normal) de camundongo seguido do mesmo anticorpo secundário descrito acima.

Para as células C6 a retirada das células teve que ser realizada com o uso de tripsina, após o que as células foram ressuspensas e deixadas em DMEM acrescido de 10% de FBS por 1 hora na estufa a 37°C. Após este período a suspensão celular foi centrifugada e as células recuperadas para a realização do ensaio da mesma forma que descrito anteriormente para as células PC-12. Este procedimento garantiu uma integridade maior das células observada quando da leitura no citômetro de fluxo.

14- Ensaio de "Western blot".

14.1-Preparo de extrato celular total.

Células PC-12 e C6 parentais crescidas até a confluência foram tratadas com TSA por 18 horas, após o que foram lavadas com PBS e incubadas com tampão de lise (50mM Tris pH 7.4, 1mM EDTA, 1% deoxicolato de sódio, 1% Triton X100) acrescido de inibidores de proteases (1mM PMSF, 1mM Benzamidina, 2mM Leupeptina, 2mM Aprotinina todos da Sigma, St. Louis, M.O. USA) a 4°C por 15 minutos. Os extratos celulares foram clarificados a 22.000xg e os sobrenedantes recuperados. A concentração de proteína foi dosada pelo método de Bradford (1976).

14.2-Gel de poliacrilamida desnaturante e transferência para membrana de nitrocelulose.

Um miligrama de proteína total do extrato obtido como descrito no item 13.1 foi resolvido em gel desnaturante 10% de poliacrilamida (Laemmli, 1970). Utilizou-se tampão de corrida (2,5mM TrisHCl pH7,4, 19mM Glicina, 0,1% SDS) e esta foi procedida em um aparato vertical modelo V16-2 (GibcoBRL, Gaithersburg, M.D. USA) a 30mA. O padrão de peso molecular "high molecular weight" (Sigma, St. Louis, M.O. USA) foi utilizado para monitorar a migração. As proteínas foram então transferidas para membrana de nitrocelulose (Schleicher & Schuell, Keene, NH USA) em tampão apropriado (25mM TrisHCl pH 7,4, 192mM glicina, 20% metanol) por 16 horas a 25mA e esta corada com Ponceau (0,2% em água).

14.3-Expressão da proteína PrPc avaliada em ensaio de "Western blot".

A incubação da membrana procedeu-se sempre a temperatura ambiente, sob agitação e iniciou-se com o bloqueio com 5% de leite em pó desnatado (Molico) em TBST (20mM TrisHCl pH 7,4, 150mM NaCl, 0,05% Tween 20) por 2 horas, após o que esta foi rapidamente lavada com TBST e em seguida incubada por 1 hora com o anticorpo primário (anticorpo monoclonal contra o peptídeo 142 a 152 de PrPc humano

da Prionics, Zurich, Suíça) ou IgG irrelevante de camundongo, ambos diluídos em TBST para a concentração final de 0,1 µg/ml ou ainda anti β-tubulina (IgG1 de camundongo da Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, England) na diluição 1:2.000 em TBST. Procederam-se então três lavagens de 10 minutos cada com TBST e imediatamente foi incubado o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com peroxidase (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, England) na diluição de 1:2.000 em TBST por 1 hora. Seguiram-se mais três lavagens como descritas anteriormente e a revelação do ensaio foi realizada conforme as determinações do kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, England). Filmes de raios X foram expostos às membranas até a obtenção de um sinal adequado (1 a 5 minutos).

Resultados

Atividade basal

Apesar de alguns resultados da literatura mostrarem a regulação do RNAm de PrPc durante o desenvolvimento (Manson e col., 1992) pouco se sabe sobre a regulação da atividade transcricional do promotor do gene de PrPc. Desta forma, para caracterizar a regulação da expressão do gene de PrPc este estudo avaliou a atividade de seu promotor, inicialmente identificado por Saeki e cols (1996b). Este corresponde a uma região de 2,8 Kb localizada a 5' do gene de PrPc de rato e utilizando-se dos iniciadores, também descritos pelo mesmo grupo, esta região foi amplificada e inserida em um plasmídeo contendo o gene “reporter” de luciferase. Este vetor foi transfectado em células PC-12 (feocromocitoma) e C6 (glioma), ambas linhagens de rato, no intuito de verificar uma possível regulação tipo-celular específica. A partir desta transfecção foram estabelecidos clones com expressão estável de luciferase. Esta abordagem, em contrapartida da transfecção transitória, facilitou a execução de ensaios, em grande número, para a avaliação da ação de várias drogas sozinhas ou associadas, além de vários tempos de tratamento

A tabela 1 mostra o valor basal de atividade de luciferase dos clones obtidos relativo às respectivas células parentais, as quais foi atribuído o valor 1. Os clones escolhidos para efetuar os tratamentos com as drogas de interesse (marcados na tabela) foram: PC-12.6, PC-12.8, PC-12.9, PC-12.11, C6.1, C6.2 e C6.4. Esta escolha teve como objetivo avaliar os tratamentos em clones com atividades basais variadas na tentativa de provar que o efeito eventualmente observado seria devido a droga em si e não dado pelo limite de detecção do método ou ainda à capacidade saturável de produção de luciferase pela maquinaria da célula transfectada. Vale ressaltar que os clones PC-12.2 e PC-12.3 seriam interessantes para o desenvolvimento do trabalho mas estas células diferenciavam após 15 dias em cultura, aproximadamente, e portanto foram descartadas.

Tabela 1: Concentrações relativas da atividade basal de luciferase em clones de células PC-12 e C6. Os valores relativos representam a razão entre a atividade de luciferase de cada clone transfectado e a respectiva célula parental. Os clones selecionados para o estudo estão marcados (†).

CLONES PC-12	VALORES RELATIVOS
1	1
2	130
3	81
4	1
5	6
6	36 [†]
7	1
8	41 [†]
9	19 [†]
10	1
11	4 [†]
12	5

CLONES C6	VALORES RELATIVOS
1	49 [†]
2	162.727 [†]
3	1
4	1.165 [†]
5	1
6	1

Atividade Transcricional

NGF foi testada primeiramente, uma vez que dados da literatura mostram sua atividade no aumento da concentração do RNAm de PrPc (Mobley e col., 1988, Wion e col., 1988). A atividade do promotor frente ao tratamento com esta neurotrofina não mostrou variação significativa consistente após 18, 24, 48, 72 ou 120 horas de tratamento (figura 1), sugerindo que esta neurotrofina não atua na atividade do promotor de PrPc, mas possivelmente, alterando a estabilidade do RNAm.

Figura 1: Avaliação da atividade do promotor de PrPc através da medida da expressão do gene "reporter" de luciferase nos clones de células PC-12 e C6 tratados por 18, 24, 48, 72 e 120 horas com 50ng/ml de NGF- β . Não existem valores significativamente diferentes do grupo sem tratamento, segundo o teste T-Student de média única.

A composição dos elementos de resposta do promotor de PrPc com sítios AP-1 e SP-1 sugeria ainda que algum membro da família de receptores para hormônios esteróidicos, em particular o receptor de glicocorticóide, pudesse regular a transcrição do gene de PrPc, a despeito da ausência de elementos de resposta específicos, como GRE. Sabe-se que GR pode interagir com c-Jun e modular a ligação deste ao sítio AP-1 (Miner e Yamamoto, 1991).

A figura 2 mostra que a Dexametasona, um hormônio glicocorticóide sintético, não foi capaz de regular a atividade do promotor após 18, 24, 48, 72 ou 120 horas de tratamento. Variações significativas como por exemplo as observadas para os clones PC-12.8 (regulação negativa entre 18 e 48 horas) e PC-12.9 ($4,3 \pm 2,1$) após 72 horas de tratamento parecem ser produto de variação clonal.

Figura 2: Avaliação da atividade do promotor de PrPc através da medida da expressão do gene "reporter" de luciferase nos clones de células PC-12 e C6 tratados por 18, 24, 48, 72 e 120 horas com 10^{-6} M de DEX. O símbolo * indica os valores significativamente diferentes do grupo sem tratamento, segundo o teste T-Student de média única.

Ácido retinóico foi utilizado para o tratamento dos clones (figura 3), pois sabe-se que este regula a expressão do fator de transcrição AP-2 (Xie e col., 1998). Este composto evidenciou uma regulação negativa significativa de cerca de 50% na atividade do promotor de PrPc, após 24 e 72 horas de tratamento, para todos os clones, à exceção do clone C6.4. Sugerindo, portanto, que ácido retinóico pode inibir a expressão de PrPc e que a ausência da atividade da droga sobre o clone C6.4 parece ser um evento clonal.

Figura 3: Avaliação da atividade do promotor de PrPc através da medida da expressão do gene "reporter" de luciferase nos clones de células PC-12 e C6 tratados por 24 e 72 horas com 10^{-6} M de RA. O símbolo * indica os valores significativamente diferentes do grupo sem tratamento, segundo o teste T-Student de média única.

Devido à presença de um elemento AP-1 no promotor de PrPc (Saeki e cols, 1996b), utilizamos TPA, uma droga sabidamente reguladora da atividade de membros da família AP-1 (Angel e col., 1987). A figura 4 mostra o tratamento dos clones escolhidos com esta droga durante 2, 8, 18 e 24 horas. Todos os clones, à exceção do clone C6.4 exibem um aumento significativo da atividade do promotor de PrPc entre 2 e 8 horas. Dos clones PC-12, para os períodos de 18 e 24 horas, dois retornam aos valores relativos basais de regulação da atividade do promotor (PC-12.6 e PC-12.11) enquanto que os outros dois mantêm, ainda em 24 horas, uma regulação positiva da atividade do promotor. Os clones C6.1 e C6.2, por sua vez, mostram uma regulação negativa do promotor de aproximadamente 50% nos períodos de 18 e 24 horas, acompanhada mais cedo pelo clone C6.4 (8 horas) e não observada para os clones de células PC-12. Estes resultados apontam para uma regulação tipo-celular específica em resposta ao tratamento com TPA.

Figura 4: Avaliação da atividade do promotor de PrPc através da medida da expressão do gene "reporter" de luciferase nos clones de células PC-12 e C6 tratados por 2, 8, 18 e 24 horas com 1µg/ml de TPA. O símbolo * indica os valores significativamente diferentes do grupo sem tratamento, segundo o teste T-Student de média única.

Outra droga citada na introdução do trabalho como possível regulador da atividade do promotor de PrPc é AMPc. Este pode ativar os fatores de transcrição da família CREB que além de CRE (elemento de resposta a AMPc) podem interagir com elementos AP-1 (Masquillier e Sassone-Corsi, 1992) ou AP-2 (Walton e Rehfuss, 1990). A figura 5 mostra o tratamento dos clones C6 e PC-12 com um análogo do AMPc (8-bromo AMPc) por 30 minutos, 1, 3, 8, 24 e 48 horas.

Os tempos mais curtos de tratamento (30 minutos a 3 horas) foram realizados pois AMPc poderia induzir rapidamente CREB e este atuar em sítios AP-1 e/ou AP-2 presentes no promotor pois não há, como dito anteriormente, elementos CRE nesta região. Entretanto, não há uma indução significativa do promotor de PrPc em qualquer um dos clones analisados após estes períodos de tratamento. De fato, o que ocorre é um aumento da atividade do promotor após 8 horas para os clones PC-12.6, PC-12.11 e C6.2 que perdura após 24 horas para os dois últimos, para os clones PC-12.8 e PC-12.9 este aumento só é observado após 24 horas de tratamento. Os clones C6.1 e C6.4 não sofrem alteração da expressão do promotor.

A indução da atividade do promotor de PrPc gerada por AMPc não tem a magnitude da indução gerada por TPA. Este fato, aliado a resposta mais tardia ao AMPc, sugere que sua atuação não é realmente direta do CREB no promotor e sim deve depender da indução de outra proteína, como c-Fos por exemplo (Sassone-Corsi e col., 1988), que por sua vez atuaria no respectivo sítio AP-1 (Rauscher e col., 1988), este sim presente no promotor de PrPc.

Figura 5: Avaliação da atividade do promotor de PrPc através da medida da expressão do gene "reporter" de luciferase nos clones de células PC-12 e C6 tratados por 30 minutos, 1, 3, 8, 24 e 48 horas com 0,5mM de AMPc. O símbolo * indica os valores significativamente diferentes do grupo sem tratamento, segundo o teste T-Student de média única.

O nível de organização da cromatina também é um fator regulador da expressão gênica (Rice e Allis, 2001). Na tentativa de observar o efeito desta organização na regulação do promotor de PrPc, os clones de células PC-12 ou C6 foram tratados com TSA, um inibidor da histona deacetilase (Yoshida e col., 1990), por 8, 24 e 48 horas e os resultados estão mostrados na figura 6.

Todos os clones apresentaram uma grande indução da atividade do promotor quando comparados com o controle, indicando que o rompimento da estrutura da cromatina permitiu acesso dos fatores de transcrição endógenos aos respectivos elementos de resposta contidos no promotor de PrPc (Saeki e col., 1996b). Vale ressaltar que tempos mais curtos de tratamento com TSA (entre 30 minutos e 3 horas) foram realizados e nenhum efeito foi observado.

Figura 6: Avaliação da atividade do promotor de PrPc através da medida da expressão do gene "reporter" de luciferase nos clones de células PC-12 e C6 tratados por 8, 24 e 48 horas com 80ng/ml de TSA. Todos os valores são significativamente diferentes do grupo sem tratamento, segundo o teste T de média única.

Após a verificação de que este promotor é regulado de forma dependente da conformação da cromatina, passou a ser importante avaliar a interação das drogas de interesse anteriormente testadas sozinhas, agora em presença da Tricostatina A.

A tabela 2 mostra os valores relativos da atividade de luciferase produzidos pela associação de NGF e TSA por 24 e 48 horas. É interessante notar que esta neurotrofina, que não possuía efeito a nível transcricional (figura 1) foi capaz de potencializar o efeito indutor da tricostatina após 24 horas para os clones C6.2 e C6.4 e após 48 horas de tratamento em todos os clones PC-12. Apenas o clone C6.1 apresentou uma diminuição da indução de TSA o que diverge dos demais, podendo indicar uma variação clonal.

Tabela 2: Efeito da associação de NGF com TSA na atividade do promotor de PrPc.

Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão da atividade relativa de luciferase (comparado ao respectivo clone sem tratamento) de pelo menos três experimentos independentes.

CLONE	24h			48h		
	NGF	TSA	NGF + TSA	NGF	TSA	NGF + TSA
PC-12.6	1,3 $\pm$ 0,4	184,7 $\pm$ 97,7	187,1 $\pm$ 94,4	1,1 $\pm$ 0,2	48,6 $\pm$ 24,9	318 $\pm$ 157,1*
PC-12.8	1,1 $\pm$ 0,6	260,7 $\pm$ 106	274,2 $\pm$ 182,2	1,2 $\pm$ 0,3	701,9 $\pm$ 96,6	2.539 $\pm$ 938,2*
PC-12.9	1,2 $\pm$ 0,3	246,8 $\pm$ 85,5	361,9 $\pm$ 232	1,5 $\pm$ 0,5	274,6 $\pm$ 93,7	1.994,4 $\pm$ 768,5*
PC-12.11	1,1 $\pm$ 0,3	134,2 $\pm$ 66,6	414,5 $\pm$ 185*	1,4 $\pm$ 0,2	64,9 $\pm$ 29,1	1.659,8 $\pm$ 906,2*
C6.1	0,8 $\pm$ 0,2	3.000,4 $\pm$ 855,7	3.350,5 $\pm$ 1.997,4	1,5 $\pm$ 0,1	1.362,7 $\pm$ 516,2	676,2 $\pm$ 262,2*
C6.2	1,5 $\pm$ 0,4	2,4 $\pm$ 0,8	3,3 $\pm$ 1*	1,2 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,7	2,4 $\pm$ 1,5
C6.4	0,5 $\pm$ 0,1	7 $\pm$ 4,2	25,8 $\pm$ 10*	0,8 $\pm$ 0,3	2,5 $\pm$ 0,8	1,9 $\pm$ 0,7

* $p < 0,05$ NGF+TSA vs TSA no tempo de tratamento equivalente.

Apesar de não ter apresentado efeito sobre a regulação do promotor quando utilizada sozinha (figura 2) a Dexametasona foi associada com TSA (tabela 3) para avaliar se sua ação também seria dependente da conformação da cromatina. O único clone a apresentar uma diferença estatisticamente significativa na comparação entre o tratamento de TSA e DEX + TSA foi o clone PC-12.11, parecendo então estar ligada a um evento clonal.

Tabela 3: Efeito da associação de Dexametasona com TSA na atividade do promotor de PrPc. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão da atividade relativa de luciferase (comparado ao respectivo clone sem tratamento) de pelo menos três experimentos independentes.

CLONE	24h		
	DEX	TSA	DEX + TSA
PC-12.6	0,9 $\pm$ 0,3	184,7 $\pm$ 97,7	210,1 $\pm$ 49,2
PC-12.8	0,5 $\pm$ 0,2	260,7 $\pm$ 106	383,8 $\pm$ 138,7
PC-12.9	1,1 $\pm$ 0,5	246,8 $\pm$ 85,5	337,5 $\pm$ 159,8
PC-12.11	0,8 $\pm$ 0,1	134,2 $\pm$ 66,6	207,1 $\pm$ 47,5*
C6.1	1,5 $\pm$ 0,2	3.000,4 $\pm$ 855,7	2.796,8 $\pm$ 1.728,6
C6.2	0,8 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,8	2 $\pm$ 0,8
C6.4	0,9 $\pm$ 0,2	7 $\pm$ 4,2	4,8 $\pm$ 2,6

* $p < 0,05$ DEX+TSA vs TSA no tempo de tratamento equivalente.

O tratamento com ácido retinóico que por sua vez regulou negativamente a atividade do promotor quando utilizado sozinho (figura 3), foi capaz também de reduzir o efeito indutor da Tricostatina após o co-tratamento por 24 horas (tabela 4). Apenas os clones PC-12.11, C6.2 e C6.4 não apresentam diferença estatisticamente significativa mas a tendência à diminuição é clara para estes dois clones de C6.

Tabela 4: Efeito da associação de ácido retinóico com TSA na atividade do promotor de PrPc. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão da atividade relativa de luciferase (comparado ao respectivo clone sem tratamento) de pelo menos três experimentos independentes.

CLONE	24h		
	RA	TSA	RA + TSA
PC-12.6	0,6 $\pm$ 0,1	184,7 $\pm$ 97,7	50,3 $\pm$ 15,6*
PC-12.8	0,7 $\pm$ 0,2	260,7 $\pm$ 106	131,9 $\pm$ 30,7*
PC-12.9	0,6 $\pm$ 0,1	246,8 $\pm$ 85,5	159,8 $\pm$ 67,6*
PC-12.11	0,7 $\pm$ 0,3	134,2 $\pm$ 66,6	221,1 $\pm$ 71,4
C6.1	0,6 $\pm$ 0,3	3.000,4 $\pm$ 855,7	1.715,1 $\pm$ 937,5*
C6.2	0,6 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,8	1,9 $\pm$ 0,4
C6.4	1,2 $\pm$ 0,5	7 $\pm$ 4,2	3,3 $\pm$ 1,8

* $p < 0,05$ RA+TSA vs TSA no tempo de tratamento equivalente.

A tabela 5 mostra a associação de TPA com TSA por 8 horas. Um efeito potencializador da indução gerada pela tricostatina é observado para todos os clones PC-12 após o co-tratamento. Os clones C6 não apresentam nenhum efeito somatório ou potencializador após o tratamento conjunto, evidenciando mais uma vez uma resposta tipocelular específica no que concerne ao éster de forbol.

Tabela 5: Efeito da associação de éster de forbol com TSA na atividade do promotor de PrPc. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão da atividade relativa de luciferase (comparado ao respectivo clone sem tratamento) de pelo menos três experimentos independentes.

CLONE	8h		
	TPA	TSA	TPA + TSA
PC12.6	2,5 $\pm$ 1,1	6,5 $\pm$ 5,8	87,8 $\pm$ 65,3*
PC12.8	2,4 $\pm$ 0,9	25,3 $\pm$ 17,5	108,1 $\pm$ 27,1*
PC12.9	3,3 $\pm$ 0,8	15,6 $\pm$ 10,6	84,9 $\pm$ 44,4*
PC12.11	1,8 $\pm$ 1,0	7,4 $\pm$ 4,4	28 $\pm$ 7,1*
C6.1	1,3 $\pm$ 0,9	209,2 $\pm$ 87,4	270,7 $\pm$ 112,4
C6.2	2,1 $\pm$ 1,5	2 $\pm$ 0,9	1,9 $\pm$ 0,8
C6.4	0,7 $\pm$ 0,3	2,5 $\pm$ 0,8	2,5 $\pm$ 0,8

* $p < 0,05$ TPA+TSA vs TSA no tempo de tratamento equivalente.

Por fim, a tabela 6 mostra os valores relativos da associação de AMPc e TSA por 8 e 24 horas. Após 8 horas somente o clone PC12.6 apresentou uma potencialização do efeito indutor da Triscostatina A mas que não perdurou de forma significativa até 24 horas, resposta semelhante àquela obtida para AMPc sozinho (Figura 5). Após 24 horas os clones PC-12.8, PC-12.11, C6.2 e C6.4 apresentaram potencialização do efeito da TSA enquanto que os clones PC-12.9 e C6.1 apresentaram uma surpreendente diminuição do efeito de TSA. Como este efeito não é geral podemos admitir que novamente estamos lidando com uma variação clonal.

Tabela 6: Efeito da associação de AMPc com TSA na atividade do promotor de PrPc.

Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão da atividade relativa de luciferase (comparado ao respectivo clone sem tratamento) de pelo menos três experimentos independentes.

CLONE	8h			24h		
	AMPc	TSA	AMPc + TSA	AMPc	TSA	AMPc + TSA
PC-12.6	1,6 $\pm$ 0,8	6,5 $\pm$ 5,8	13 $\pm$ 3,8*	1,3 $\pm$ 0,6	184,7 $\pm$ 97,7	247,9 $\pm$ 78,4
PC-12.8	1,2 $\pm$ 0,4	25,3 $\pm$ 17,5	22,2 $\pm$ 4,2	1,3 $\pm$ 0,5	260,7 $\pm$ 106	761,2 $\pm$ 200,1*
PC-12.9	1,2 $\pm$ 0,6	15,6 $\pm$ 10,6	16,9 $\pm$ 6,2	1,5 $\pm$ 0,5	246,8 $\pm$ 85,5	133,1 $\pm$ 54,8*
PC-12.11	1,4 $\pm$ 0,6	7,4 $\pm$ 4,4	10,4 $\pm$ 2	1,6 $\pm$ 0,8	134,2 $\pm$ 66,6	774 $\pm$ 423,8*
C6.1	1,2 $\pm$ 0,5	209,2 $\pm$ 87,4	219,8 $\pm$ 86,6	1,2 $\pm$ 0,7	3000,4 $\pm$ 855,7	1635,1 $\pm$ 748,9*
C6.2	2,2 $\pm$ 1,2	2 $\pm$ 0,9	1,5 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,7	2,4 $\pm$ 0,8	3,6 $\pm$ 1,6*
C6.4	1,2 $\pm$ 1,0	2,5 $\pm$ 0,8	3,4 $\pm$ 0,9	1,0 $\pm$ 0,4	7 $\pm$ 4,2	21,7 $\pm$ 6,5*

* $p < 0,05$ AMPc+TSA vs TSA no tempo de tratamento equivalente

Desta forma, os experimentos realizados com o promotor de PrPc mostram que sua regulação é bastante dependente da estrutura da cromatina e que NGF e drogas como TPA e AMPc podem aumentar seu efeito indutor da transcrição quando associados à TSA, enquanto que RA pode diminuí-lo.

Expressão do RNAm de PrPc

O objetivo seguinte foi avaliar se as alterações na atividade do promotor de PrPc eram levadas à nível de RNAm. Para isso foram usadas as linhagens celulares parentais, uma vez que seria avaliada a expressão do gene endógeno de PrPc. As figuras 7 e 8 mostram respectivamente ensaios de “Northern blot” em células PC-12 e C6 tratadas com TSA, TPA, RA, AMPc e NGF, além dos tratamentos conjuntos destas com TSA. Para este ensaio foram escolhidos compostos que possuíam algum efeito no promotor associadas ou não à TSA, por este motivo foi descartado o tratamento com Dexametasona.

A

B

Figura 7: Ensaio de “Northern blot” mostrando a expressão do RNAm de PrPc (2,1Kb) em células **PC-12** tratadas conforme indicado. A hibridização com a sonda de GAPDH (RNAm de 1,2Kb) é usada como controle da quantidade de RNA adicionada no gel para cada ponto de tratamento.

A

B

Figura 8: Ensaio de “Northern blot” mostrando a expressão do RNAm de PrPc (2,1 Kb) em células C6 tratadas conforme indicado. A hibridização com a sonda de GAPDH (RNAm de 1,2 Kb) é usada como controle da quantidade de RNA adicionada no gel para cada ponto de tratamento.

O resultado apresentado é representativo de dois ensaios realizados e mostra que TSA tem um efeito marcante de regulação positiva da expressão do RNAm de PrPc. Este efeito é mais evidente após 8 horas de tratamento do que em 24 horas, para ambas as linhagens, PC-12 (figura 7A) e C6 (figura 8A). Estes dados corroboram os resultados anteriormente apresentados mostrando a ação de TSA na atividade do promotor de PrPc (figura 6).

O tratamento com TPA aumenta também a expressão do RNAm, como esperado, e a associação com TSA promove a potencialização do efeito de TSA tanto em células PC-12 (figura 7A) como em células C6 (figura 8A). Este resultado está de acordo com o que foi observado anteriormente para a atividade do promotor nos clones de células PC-12 (tabela 5) mas discorda daquele obtido para células C6 pois nestas a associação de TPA à TSA não foi capaz de potencializar o efeito indutor desta última (tabela 5).

O resultado obtido para células PC-12 e C6 tratadas com RA não mostra regulação negativa da expressão do RNAm de PrPc (figuras 7A e 8A), como ocorreu para a atividade do promotor (figura 3) que apresentou decréscimo de 50%. Este fato pode ser devido à sensibilidade do ensaio de “Northern blot” de detectar este valor de inibição. Entretanto, quando TSA é associada a RA no tratamento de células PC-12 (figura 7A) e C6 (figura 8A), observa-se uma clara inibição do efeito indutor de TSA. Estes resultados estão de acordo com o obtido para a atividade do promotor para este tratamento conjunto (tabela 4).

A sensibilidade do ensaio de Northern blot pode ser também uma justificativa para o resultado obtido após o tratamento das células com AMPc. A regulação positiva do promotor de cerca de 1,5 vezes não pôde ser detectada a nível de RNAm. Já a associação de AMPc com TSA causou uma potencialização do efeito indutor da TSA apenas para células PC-12 (figura 7B) e não C6 (figura 8B). Vale lembrar que a maioria dos clones PC-12 apresentou regulação positiva da atividade do promotor quando AMPc e TSA foram associados (tabela 6).

O tratamento com NGF por 24 horas em células PC-12 (figura 7B) e C6 (figura 8B) não surtiu efeito sobre a expressão do RNAm de PrPc mas por 120 horas esta neurotrofina foi capaz de induzir as concentrações deste RNAm em células PC-12 (figura 7B).

Além disto a associação de NGF e TSA não produziu aumento nas concentrações do RNAm de PrPc (figura 7B), enquanto que a nível de promotor a neurotrofina potencializou o efeito de TSA (tabela 2).

Estes resultados confirmam que a atividade das drogas estudadas sobre a regulação da atividade do promotor de PrPc é seguida pela modulação das concentrações do mRNA do gene sob seu controle.

Expressão da proteína PrPc

A verificação do paralelismo entre o aumento da atividade do promotor de PrPc e da proteína codificada pelo gene sob seu controle é bastante importante, pois afinal é a última que vai determinar a atividade biológica.

Recentemente foi publicado por nosso grupo a importância da ligação PrPc-laminina (LN) no processo de neuritogênese em células PC-12 (Graner e cols, 2000a). Estas células eram previamente tratadas com NGF e posteriormente plaqueadas sobre LN onde iniciavam sua diferenciação. Foi mostrado também que na ausência de tratamento prévio com a neurotrofina a neuritogênese sobre laminina era muito menor. Um fato crucial deste trabalho foi mostrar que a expressão de PrPc era aumentada com o tratamento prévio de NGF, além de ser um dos objetivos desta tese.

A figura 9 mostra um ensaio representativo de pelo menos 3 citometrias realizadas com células PC-12 tratadas com NGF. A expressão de PrPc aumentou cerca de 3,5 vezes após 5 dias de tratamento. Para a célula C6 vários ensaios foram também realizados na tentativa de se observar o mesmo efeito de NGF em PC-12 mas o método não foi capaz de detectar qualquer alteração.

Figura 9: Expressão de PrPc em células PC-12 e C6 tratadas com NGF por 120 horas medida em ensaio de citometria de fluxo. As células tratadas (T) ou não (NT) foram incubadas com anti-PrPc policlonal de camundongo. Foram utilizados como controles as respectivas células não tratadas, incubadas com soro de camundongo não imune (SN).

As demais drogas de interesse não mostraram regulação da expressão de PrPc detectável em citometria de fluxo como mostra a figura 10. Isto ocorreu tanto para células PC-12 como C6.

Figura 10: Expressão de PrPc em células PC-12 e C6 tratadas com **DEX (A)**, **RA (B)**, **TPA (C)** e **AMP(D)** por 24 horas, medida em ensaio de citometria de fluxo. As células tratadas (T) ou não (NT) foram incubadas com anti-PrPc policlonal de camundongo. Foram

utilizados como controles as respectivas células não tratadas, incubadas com soro de camundongo não imune (SN).

A expressão de PrPc foi ainda avaliada por “western blot” nas células tratadas com DEX, RA, TPA e AMPc mas não se encontrou sinal específico. Isto está de acordo com o que foi descrito anteriormente onde a detecção de PrPc por essa técnica em linhagens celulares é muito limitada (Scott e col., 1988). Entretanto, o tratamento com TSA que aumentou muito a atividade do promotor e a expressão do RNAm produziu uma indução significativa na concentração da proteína PrPc.

A figura 11 mostra o resultado do ensaio de “Western blot” de células PC-12 (A) e C6 (B) tratadas por 24 horas com TSA, este resultado foi confirmado também no ensaio de citometria de fluxo realizado com ambas as células tratadas com TSA por 24 e 48 horas.

Os níveis de expressão basal são quase indetectáveis para ambas linhagens no ensaio de “Western blot”, como esperado, entretanto a citometria de fluxo mostra que ambas expressam PrPc ao se comparar o resultado obtido após incubação das células com soro não imune (SN) e com anti-PrPc sem tratamento (NT).

O tratamento com TSA levou a um aumento das concentrações basais facilmente detectado em ambos procedimentos. É interessante notar também que o ensaio de “Western blot” mostra que as células C6 expressam diferentes formas da proteína PrPc quando comparada com a célula PC-12. Este fato deve-se provavelmente a algum mecanismo pós-traducional tipo-celular específico como glicosilação ou clivagem (Chen e col., 1995) e não à atividade de TSA.

O ensaio de citometria de fluxo foi realizado com células tratadas por 24 e 48 horas com TSA. Os valores de PrPc na superfície das células tratadas com TSA atinge seu máximo em 48 horas. Valores de expressão semelhantes são obtidos após o tratamento por 72 horas com TSA, sendo que não há diferença da expressão de PrPc quando comparado ao tratamento por 48 horas (dado não mostrado).

Vale ressaltar que foram também realizados ensaios de citometria de fluxo com associação das drogas à TSA mas não foram detectadas alterações significativamente diferentes.

Figura 11: Expressão de PrPc em células PC-12 (A) e C6 (B) tratadas com TSA, medida em ensaios de "Western blot" (24 horas) e citometria de fluxo (24 e 48 horas). O ensaio de "Western blot" foi revelado com anticorpo primário anti-PrPc monoclonal (Prionics) e o secundário anti-mouse conjugado à peroxidase. Para controle da quantidade de proteína aplicada no gel foi utilizado como anticorpo primário anti- β -tubulina. No ensaio de citometria de fluxo as células não tratadas (NT) ou tratadas por 24 (T 24h) ou 48 horas (T 48h) foram incubadas com anti-PrPc policlonal de camundongo e foram utilizados como controles as respectivas células não tratadas, incubadas com soro de camundongo não imune (SN).

Discussão

A regulação gênica é exercida por fatores de transcrição que ligam elementos reguladores em promotores e “enhancers”, estimulando a taxa basal de início da transcrição (Roeder, 1991).

A identificação do promotor de PrPc de rato por Saeki e colaboradores (1996b) permitiu que uma direção fosse dada aos estudos de regulação de PrPc. Esta proteína é expressa constitutivamente em diversos tecidos neurais de animais adultos (Satoh e col., 1998), sendo que foi detectada uma alta expressão no cérebro, moderada no pulmão e coração e praticamente inexistente no baço e fígado (Manson e col. 1992).

Alguns trabalhos mostram alterações da expressão de PrPc, de acordo com o ritmo circadiano (Cagampang e col., 1999) ou após estresse térmico (Shyu e col., 2000) e apesar da alta regulação desta proteína durante o desenvolvimento, pois entre 6 a 9 dias de gestação não há expressão de PrPc que aumenta posteriormente entre 13 e 16 dias, permanecendo alta em tecidos cerebrais até o nascimento (Manson e col., 1992), nenhum trabalho mostrou até hoje mecanismo da regulação gênica de PrPc.

Saeki e colaboradores (1996b) caracterizaram a sequência do promotor do gene de rato (ilustração 1 na introdução) revelando a presença de um elemento CCAAT (Chodosh e col., 1988) e outros sítios para fatores de transcrição como SP-1 (Briggs e col., 1986), AP-1 (Lee e col., 1987) e AP-2 (Mitchell e col., 1987).

Muitos promotores eucarióticos apresentam um elemento regulador da transcrição que possui a sequência pentanucleotídica CCAAT entre 60 e 80 pares de bases à 5' do sítio de início da transcrição (McKnight e Tjian, 1986). A frequência de elementos CCAAT parece ser mais alta em promotores que não possuem elemento TATA (como é o caso do promotor de PrPc), podendo indicar que este seja responsável pelo recrutamento do aparato basal de transcrição neste tipo de promotor (Mantovani, 1998).

Sabe-se que o mecanismo de regulação transcricional em promotores ricos em GC, como é o caso do promotor de PrPc, é complicado pelo fato de vários fatores de transcrição, além de SP-1 reconhecerem esta sequência (Berg, 1992). Além disto a ausência de elemento TATA e presença de GC aponta para promotores de genes expressos constitutivamente ou “housekeeping” (Basler e col., 1986). Neste estudo aqui realizado

mostramos pela primeira vez que um gene anteriormente considerado “housekeeping” pode ser altamente regulado.

Para desenvolver o estudo da regulação transcricional de PrPc estabelecemos clones de células PC-12 e C6 transfectadas estavelmente com um vetor contendo o promotor do gene de PrPc controlando o gene “reporter” de luciferase. Este procedimento possibilitou a realização de inúmeros ensaios de tratamentos das células com as drogas de interesse e medidas da atividade transcricional do promotor de PrPc. Além disso, permitiu a determinação de um ajuste fino da regulação de PrPc, ajuste este que seria ignorado em alguns casos, se fossem realizados somente ensaios de “Northern blot” ou “Western blot”, devido ao limite de detecção intrínseco de cada uma destas técnicas. A utilização de dois tipos celulares diferentes permitiu também que fosse avaliada a regulação gênica de PrPc tipo-celular específica em células de origem neural, onde sabidamente PrPc é mais expresso (Manson e col, 1992).

Após a seleção dos clones com diferentes atividades basais as células foram tratadas com drogas eleitas com base na composição dos elementos de resposta a fatores de transcrição presentes no promotor de PrPc, para avaliar a regulação deste.

A presença do sítio AP-1 sugere que Jun e Fos, membros da superfamília de fatores de transcrição AP-1 possam ser moduladores da atividade do promotor de PrPc. É sabido que os fatores AP-1 são induzidos por éster de forbol (TPA) (Angel e col., 1987) e os resultados aqui obtidos mostram que esta droga foi capaz de regular a atividade do promotor e a expressão do RNAm de PrPc. Infelizmente o ensaio de citometria de fluxo não evidenciou o aumento de proteína, provavelmente devido à limitações do método para detecção de uma pequena variação.

PrPc sofre várias modificações pós-traducionais que incluem remoção do peptídeo sinal (Hope e col., 1986), sialoglicosilações e incorporação da âncora de GPI na porção C-terminal (Stahl e col., 1990) e uma clivagem C-terminal entre os aminoácidos 110/111 e 112 (Chen e col., 1995, Jimenez-Huete, 1998). O significado fisiológico desta clivagem ainda é desconhecido mas em cérebros com CJD foi encontrada a proteína PrPc com uma clivagem em torno do aminoácido 90 (Chen e col., 1995, Jimenez-Huete, 1998) que deixa intacta a região neurotóxica localizada entre os aminoácidos 106-126 previamente

identificada (Forloni e col., 1993), evidenciando a importância desta modificação no processo patológico.

Recentemente Vincent e colaboradores (2000) mostraram que o processamento normal de PrPc é regulado positivamente por ativadores de PKC, como é o caso de TPA. O éster de forbol regula positivamente a clivagem 110/111-112 na proteína normal, portanto, mesmo que a regulação da proteína seja pequena, como é o nosso caso, esta poderia estar sendo mais processada após o uso do éster de forbol.

É interessante notar que houve uma regulação do promotor tipo-celular-específica, que mostra um decréscimo da atividade do promotor nos clones de células C6 após um tratamento longo com TPA, o que não foi observado para os clones de PC-12. Esta regulação deve refletir as diferenças de composição de fatores de transcrição de células PC-12 e C6, anteriormente reportado por Kapatos e colaboradores (2000). Neste trabalho os autores observaram um padrão de regulação do promotor do gene de GTP cyclohydrolase I (GTPCH), distinto em C6 e PC-12 devido à composição diferencial de proteínas nucleares nestes tipos celulares.

AMPc foi utilizado também para avaliação da regulação do gene de PrPc. Este composto induz atividade de PKA (González e col., 1991) que fosforila o fator de transcrição CREB. Apesar do promotor de PrPc não possuir CRE (elemento de resposta a AMPc), CREB em alguns sistemas interage com elementos AP-1 (Masquillier e Sassone-Corsi, 1992) e em outros com AP-2 (Walton e Rehfuß, 1990), ambos presentes no promotor do gene de PrPc.

Os resultados obtidos mostram que apenas após o tratamento com AMPc por 8 horas foi gerado um pequeno aumento não significativo da atividade do promotor de PrPc. Esta resposta tardia sugere que AMPc pode agir ativando CREB, que por sua vez regularia diretamente o promotor de PrPc (via por exemplo AP-1) ou ainda induziria outros fatores de transcrição que poderiam atuar sobre a atividade deste promotor.

A presença dos elementos AP-1 e AP-2 sugeriu ainda que este promotor pudesse ser regulado por receptores esteróidicos. A interação entre estes receptores ativados, que funcionam como fatores de transcrição, e os membros da família AP-1 foi amplamente descrita. É sabido que o receptor de glicocorticóide (GR) interage com Jun, o que modula tanto sua própria interação com o elemento de resposta GRE como a ligação dos

homodímeros Jun-Jun ou heterodímeros Jun-Fos no elemento AP-1 (Miner e Yamamoto, 1991). Portanto, o balanço da quantidade dos fatores de transcrição é que determina a regulação a ser desencadeada (Pfahl, 1993). A ativação de GR pelo tratamento dos clones celulares com o hormônio sintético Dexametasona não foi capaz de modular a atividade do promotor de PrPc, então, podemos sugerir que a quantidade dos membros AP-1 pode ultrapassar os efeitos de GR ativado (Pfahl, 1993).

Um bom exemplo da indução de Fos e Jun suplantando a regulação gênica promovida por outro fator de transcrição é o que ocorre com RA. A indução do promotor do gene da osteocalcina promovida por RA é abolida quando há expressão de altas concentrações de Jun e Fos induzidos por TPA (Schüle e col., 1990).

Sabe-se que além de TPA e AMPc, o ácido retinóico, também induz a atividade de AP-2, o que se acredita ser importante na regulação de genes envolvidos em diferenciação celular (Mitchell e col., 1987, Imagawa e col., 1987, Luscher e col., 1989, Snape e col., 1991). AP-2 foi primeiramente identificado e purificado a partir de células HeLa (Haslinger e Karin, 1985, Mitchell e col., 1987, Imagawa e col., 1987). Este fator de transcrição é expresso de forma tipo-celular específica (Williams e col., 1988) e é regulado espacial e temporalmente durante a embriogênese de camundongos (Mitchell e col., 1991) e em particular no promotor de PrPc. A extremidade carboxi-terminal da proteína AP-2 dimerizada liga-se a uma região rica em GC do DNA (Williams e Tjian, 1991) que está presente em uma grande variedade de promotores e "enhancers" associados tanto com genes virais como celulares (Imagawa e col., 1987, Mitchell e col., 1987).

Nossos resultados mostram que o receptor de ácido retinóico (RAR) ativado, pela ligação ao hormônio gerou uma regulação negativa significativa do promotor de PrPc. Esta observação está completamente de acordo com os dados obtidos por Dodelet e Cashman (1998), onde células HL-60 tratadas com RA por 1 e 3 dias apresentam uma diminuição da expressão do RNAm de PrPc. O paralelo da regulação negativa do promotor na expressão tanto do RNAm quanto da proteína não foi observado nos nossos resultados, provavelmente, devido às limitações dos métodos de detecção.

Estes resultados sugerem que a ativação do receptor de ácido retinóico não está modulando a atividade do promotor de PrPc via AP-2, uma vez que este hormônio aumenta a expressão do fator de transcrição AP-2 (Luscher e col. 1989). Seu efeito

inibitório parece ser mais relacionado à sua ligação e seqüestro de membros da família AP-1 (DiSepio e col., 1999, Salbert e col., 1993).

NGF foi incapaz de regular a atividade do promotor de PrPc, entretanto foi observado um aumento das concentrações do RNAm de PrPc após 5 dias de tratamento. Este achado está de acordo com os dados obtidos por Wion e colaboradores (1988) que observaram aumento da expressão do RNAm de PrPc em células tratadas com NGF e sugere que esta neurotrofina regule a estabilidade do RNAm de PrPc. A regulação positiva do RNAm gerada por esta neurotrofina reflete no aumento da expressão da proteína PrPc nas células PC-12, dados estes que já fizeram parte de um trabalho publicado por nosso grupo (Graner e col., 2000a).

Nas células C6 não foi observada a regulação de PrPc dependente de NGF. Na realidade NGF é secretado por células gliais e tem um papel importante na sua diferenciação e sobrevivência tanto deste tipo celular quanto de neurônios (Watanabe e col., 1999). Entretanto, o papel desta neurotrofina na célula C6 parece não envolver a expressão de PrPc como no caso de células PC-12.

O empacotamento do DNA eucariótico em nucleossomos representa o maior obstáculo que a transcrição deve transpor para permitir o acesso da maquinaria transcricional ao DNA molde. A descoberta de complexos enzimáticos dedicados ao remodelamento da cromatina, tanto por modificação direta das histonas quanto por adição dos nucleossomos dependente de ATP, tem gerado uma nova visão do controle do mecanismo de transcrição (Wolffe e Guschin, 2000, Wu e Grunstein, 2000, Workman e Kingston, 1998, Kornberg e Lorch, 1999).

Fortes evidências obtidas nos últimos seis anos indicam que a acetilação do "core" das histonas, a qual é catalisada pelas histonas acetiltransferases (HATs) e removida pelas histonas deacetilases (HDACs), está ligada a ativação da transcrição (Rice e Allis, 2001). As modificações dinâmicas da estrutura da cromatina são diretamente influenciadas por alterações pós-traducionais nas regiões amino-terminais das histonas (Luger e Richmond, 1998, Wolffe e Hayes, 1999). Estas regiões altamente básicas são preditas como sendo menos estruturadas do que outras regiões da molécula e acredita-se que interajam com o DNA carregado negativamente, ou ainda com outras proteínas associadas à cromatina

(Wolffe e Guschin, 2000, Luger e Richmond, 1998, Whitlock e Simpson, 1977, Ausio e col., 1989, Luger e col., 1997, Wolffe e Kurumizaka, 1998, Hansen e col., 1998).

Tem sido postulado que a acetilação das histonas causa uma diminuição da afinidade desta pelo DNA, permitindo o relaxamento da estrutura da cromatina e o conseqüente acesso de fatores de transcrição aos respectivos elementos de resposta (Kadonaga 1998).

Em 1995 Futamura e colaboradores demonstraram que Tricostatina A inibe a deacetilação das histonas em células PC-12, o que deve influenciar a expressão de genes envolvidos na diferenciação celular. Uma vez que nosso grupo descreveu a importância da expressão de PrPc no processo de neuritogênese (Graner e col., 2000a e 2000b), decidimos avaliar se a regulação de PrPc poderia ser influenciada pelo nível de organização da cromatina utilizando-se de Tricostatina A no tratamento das células dos clones de PC-12 e C6.

Os resultados aqui obtidos mostram que o tratamento das células com TSA produz uma grande indução da atividade do promotor seguida da regulação positiva da expressão tanto do RNAm quanto da proteína PrPc. É importante notar que este efeito não é generalizado a todos os promotores da célula, uma vez que não foi observada nenhuma variação da expressão de GAPDH ou β -tubulina utilizadas como controle interno dos ensaios de “Northern blot” e “Western blot” respectivamente. Além disso, TSA não é capaz de regular a expressão de c-jun, c-fos e c-myc (Futamura e col., 1995).

Sabe-se que o promotor de PrPc possui 3 sítios SP-1 (Saeki e col., 1996b) aos quais se ligam fatores de transcrição SP-1 e/ou SP-3 que podem agir como reguladores tanto positivos como negativos da expressão de determinados genes celulares e virais (Dylan e Tjian, 1985, Dylan e col., 1985, Jones e Tjian, 1985). O mecanismo de regulação gênica promovido por SP-1 parece ser dependente da ligação de HDACs ou HATs, primeiramente ao fator de transcrição e posteriormente ao elemento de resposta.

Doetzlhofer e colaboradores (1999) reportam que HDAC1 associa-se com a porção C-terminal de SP-1 que anteriormente havia sido descrita por associar-se a E2F1, um fator de transcrição que possui um papel fundamental na atividade de promotores regulados ao longo do ciclo celular (Karlseder e col., 1996). A ativação ou repressão de promotores que possuem sítios SP-1 são promovidas pela ligação respectivamente de E2F1 ou HDAC1

nestes sítios. Neste mesmo trabalho, Doetzlhofer e colaboradores mostraram ainda que TSA tem atividade sobre o promotor estudado somente quando o sítio SP-1 está presente, ou seja, o promotor permanece inativado quando SP-1 está associado a HDAC1 e a inibição de HDAC por TSA promove uma indução da atividade do promotor.

Era de se esperar que a regulação positiva do promotor e do RNAm gerada pelo tratamento com TSA produzisse um aumento da proteína PrPc. Isto na verdade aconteceu, entretanto não na magnitude ocorrida para atividade do promotor ou concentração de RNAm. De fato, Kuusisto e colaboradores (2001) identificaram que TSA induz a proteína p62 que pode ser conectada ao sistema de ubiquitina para degradação de proteínas. Portanto, além de TSA produzir um enorme regulação positiva de PrPc pode também induzir, em um segundo momento o sistema de degradação desta e de outras proteínas. Entretanto, esta especulação só seria verdadeira se PrPc fosse realmente degradada em um sistema dependente de ubiquitina, o que é ainda pouco conhecido (Alves-Rodrigues e col., 1998).

Quando empregamos somente TSA e avaliamos a expressão gênica de PrPc estamos, na verdade, observando a atuação de fatores de transcrição endógenos sobre o promotor com a cromatina desenovelada. Para avaliar a atuação de fatores de transcrição específicos no promotor nu, resolvemos associar TSA com as drogas de interesse, no tratamento dos clones celulares.

O ensaio de medida da atividade do promotor mostra que a associação de TSA e TPA potencializou o efeito indutor de TSA em células PC-12, o que sugere que o sítio AP-1 tenha ficado mais exposto aos fatores de transcrição Jun e Fos. Uma vez que Jun e Fos ligam o elemento AP-1 presente em regiões reguladoras de diversos genes é de se esperar que algumas vezes estes elementos não estejam expostos. De fato, foi demonstrado que Jun/Fos ligam o DNA acetilado 4 a 5 vezes mais do que o não acetilado (Ng e col., 1997). Entretanto, como foi demonstrado neste trabalho a ativação de Jun/Fos por TPA leva à indução da atividade do promotor mesmo na ausência de TSA. Isto se deve ao fato do dímero Jun/Fos ser capaz de romper a estrutura do nucleossomo, além disto este rompimento facilita a ligação subsequente de outros fatores de transcrição em sítios adjacentes (Ng e col., 1997).

O efeito da associação de TSA e TPA observado somente para células PC-12 e não C6 foi confirmado a nível de RNAm e evidencia novamente algum tipo de regulação tipo-celular-específica, provavelmente calcada na diferente composição de fatores de transcrição destas linhagens (Kapatos e col., 2000).

Outra droga que parece ter gerado uma regulação dependente do tipo celular foi AMPc pois quando associado à TSA potencializou o efeito indutor desta última na atividade do promotor e nas concentrações do RNAm de PrPc nas células PC-12, enquanto que nas células C6 esta potencialização só foi observada na atividade do promotor. De fato, Kapatos e colaboradores (2000) identificaram em ensaio de retardamento de mobilidade eletroforética que somente proteínas nucleares de PC-12 e não de C6 ligavam no sítio CRE. Portanto podemos sugerir que somente a célula PC-12 deva possuir fatores de transcrição da família CREB em concentração suficiente para regular a atividade do gene de PrPc, provavelmente por intermédio da ligação destes fatores no sítio AP-1, como já descrito (Masquillier e Sassone-Corsi, 1992).

A associação de TSA e AMPc permitiu também concluir que o efeito de AMPc é mais produtivo neste promotor quando a estrutura da cromatina está rompida, podendo expor mais os elementos de resposta (por exemplo AP-1 e AP-2) a fatores de transcrição (como CREB) induzidos por este composto nas células PC-12.

O ácido retinóico foi capaz de reprimir a indução gerada por TSA tanto na atividade do promotor como na expressão do RNAm, mostrando que RAR é um potente inibidor da expressão de PrPc.

NGF também age em sinergismo com TSA a nível da atividade do promotor de PrPc, mas no entanto é necessário um longo período de tratamento (120 horas) para se observar este efeito. Isto indica que a regulação do gene de PrPc por NGF é indireta e necessita da expressão ou repressão de outras proteínas. Uma vez que este efeito sinérgico não é observado a nível de RNAm, sugerimos que esta associação possa promover modificações que atenuem a estabilidade do RNAm de PrPc.

Nossos resultados mostram pela primeira vez que a expressão de PrPc é dependente da estrutura da cromatina e que fatores de transcrição como AP-1, CREB e RAR podem controlar a regulação gênica.

Baseados em nossas observações poderíamos sugerir um modelo de organização do promotor de PrPc onde os sítios SP-1, AP-1 e CCAAT estariam associados a um nucleossomo, sendo que as drogas ativadoras de fatores de transcrição que se ligariam a estes sítios agem melhor quando associadas a TSA. O sítio AP-2 parece não ter um grande papel na regulação do promotor de PrPc. Ácido retinóico que induz o fator AP-2 (Williams e Tjian, 1991) regulou negativamente a expressão de PrPc. Desta forma, a ação deste hormônio parece realmente ser de seqüestro de fatores da família AP-1 (Miner e Yamamoto, 1991) que regularia positivamente a expressão de PrPc como foi demonstrado após o tratamento com TPA ou AMPc. No caso deste último, a indução de CREB regularia a atividade do promotor de PrPc por dimerizar-se com fatores de transcrição da família AP-1 (Masquillier e Sassone-Corsi, 1992).

Estes dados podem ser extremamente importantes para avaliar o envolvimento de PrPc no crescimento e diferenciação celulares e mais ainda pode permitir o desenvolvimento de estratégias que ajudem no controle das doenças priônicas.

Portanto, o tratamento das doenças priônicas poderia ser abordado de duas formas. Agentes como o RA poderiam ser usados para inibir a expressão de PrPc diminuindo a velocidade da infecção. Por outro lado, agentes que bloqueiam a conversão de PrPc a PrPsc poderiam ser associados a compostos que induzem a atividade de histona deacetilase. Desta forma, pelo bloqueio das modificações estruturais promovidas pelo agente infeccioso e o recrutamento do aumento da expressão de PrPc, poderíamos resgatar um possível componente de perda de função envolvido com essas doenças.

Conclusões

1-TPA e AMPc foram capazes de regular positivamente a atividade do promotor de PrPc, bem como seu RNA mensageiro.

2-RA regulou negativamente a atividade do promotor de PrPc e a expressão do RNAm.

3- A regulação do promotor de PrPc é extremamente dependente da conformação da cromatina pois TSA, um inibidor da histona deacetilase foi capaz de regular positivamente não só a atividade do promotor mas também a expressão dos RNAm e proteína de PrPc.

4- A exposição dos elementos de resposta do promotor de PrPc, gerada pelo rompimento da estrutura da cromatina após o tratamento com TSA permitiu que NGF e drogas como TPA e AMPc apresentassem uma potencialização dos seus respectivos efeitos, tanto á nível da atividade do promotor quanto da expressão do RNAm.

Bibliografia

- ALPER T, CRAMP WA, HAIG DA, CLARKE MC. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 214(90):764-6, 1967.
- ALVES-RODRIGUES A, GREGORI L, FIGUEIREDO-PEREIRA ME. Ubiquitin, cellular inclusions and their role in neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 21(12):516-20, 1998.
- ANDERSON RM, DONNELLY CA, FERGUSON NM, WOOLHOUSE ME, WATT CJ, UDY HJ, MAWHINNEY S, DUNSTAN SP, SOUTHWOOD TR, WILESMITH JW, RYAN JB, HOINVILLE LJ, HILLERTON JE, AUSTIN AR, WELLS GA. Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature* 382(6594):779-88, 1996.
- ANGEL P, IMAGAWA M, CHIU R, STEIN B, IMBRA RJ, RAHMSDORF HJ, JONAT C, HERRLICH P, KARIN M. Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 49(6):729-39, 1987.
- AUSIO J, DONG F, VAN HOLDE KE. Use of selectively trypsinized nucleosome core particles to analyze the role of the histone "tails" in the stabilization of the nucleosome. *J Mol Biol.* 206(3):451-63, 1989.
- AUSUBEL FM, BRENT R, KINGSTON RE, MOORE DD, SEIDMAN JG, SMITH JA, STRUHL K. Current protocols in molecular biology, New York, Greene Publishing Associates, 1998.
- BARRY RA, KENT SB, MCKINLEY MP, MEYER RK, DEARMOND SJ, HOOD LE, PRUSINER SB. Scrapie and cellular prion proteins share polypeptide epitopes. *J Infect Dis.* 153(5):848-54, 1986.

- BASLER K, OESCH B, SCOTT M, WESTAWAY D, WALCHLI M, GROTH DF, MCKINLEY MP, PRUSINER SB, WEISSMANN C. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46(3):417-28, 1986.
- BATEMAN D, HILTON D, LOVE S, ZEIDLER M, BECK J, COLLINGE J. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in a 18-year-old in the UK. *Lancet* 346(8983):1155-6, 1995.
- BENDA P, LIGHTBODY J, SATO G, LEVINE L, SWEET W. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 161: 370-371, 1968.
- BEDINO JH. Creutzfeldt Jakob disease and related disorders. In: Champion Expanding encyclopedia of mortuary practices. 625 part 1 pp 2514-17, 1995.
- BENDHEIM PE, BOCKMAN JM, MCKINLEY MP, KINGSBURY DT, PRUSINER SB. Scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease prion proteins share physical properties and antigenic determinants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(4):997-1001, 1985.
- BERG JM. Sp1 and the subfamily of zinc finger proteins with guanine-rich binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89(23):11109-10, 1992.
- BRADFORD MM. 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, 1976.
- BRIGGS MR, KADONAGA JT, BELL SP, TJIAN R. Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science*. 234(4772):47-52, 1986.

- BRITTON TC, AL-SARRAJ S, SHAW C, CAMPBELL T, COLLINGE J. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in a 16-year-old in the UK. *Lancet* 346(8983):1155, 1995.
- BROWN DR, BESINGER A Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem J.* 334 (Pt 2):423-9, 1998.
- BROWN DR, BESINGER A, HERMS JW, KRETZSCHMAR HA. Microglial expression of the prion protein. *Neuroreport* 9(7):1425-9, 1998a.
- BROWN DR, QIN K, HERMS JW, MADLUNG A, MANSON J, STROME R, FRASER PE, KRUCK T, VON BOHLEN A, SCHULZ-SCHAEFFER W, GIESE A, WESTAWAY D, KRETZSCHMAR H. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 390(6661):684-7, 1997a.
- BROWN DR, SCHMIDT B, GROSCHUP MH, KRETZSCHMAR HA. Prion protein expression in muscle cells and toxicity of a prion protein fragment. *Eur J Cell Biol* 75(1):29-37, 1998b.
- BROWN DR, SCHULZ-SCHAEFFER WJ, SCHMIDT B, KRETZSCHMAR HA. Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol.* 146(1):104-12, 1997b.
- BROWN DR. Prion and prejudice: normal protein and the synapse. *Trends Neurosci.* 24(2):85-90, 2001.
- BROWN P, GIBBS C J JR., RODGERS-JOHNSON P, ASHER DM, SULIMA MP, BACOTE A et al. Human spongiform encephalopathy: The National Institute of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Ann. Neurol.* 35:513-529, 1994.

- BROWN P, PREECE MA, WILL RG. "Friendly fire" in medicine: hormones, homografts, and Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 340(8810):24-7, 1992.
- BROWN P. The fenotypic expression of different mutations in transmissible human spongiform encephalopathy. *Rev. Neurol.* 148: 317-327, 1992.
- BRUCE ME, WILL RG, IRONSIDE JW, MCCONNELL I, DRUMMOND D, SUTTIE A, MCCARDLE L, CHREE A, HOPE J, BIRKETT C, COUSENS S, FRASER H, BOSTOCK CJ. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389(6650):498-501, 1997.
- BÜELER H, AGUZZI A, SAILER A, GREINER RA, AUTENRIED P, AGUET M, WEISSMANN C. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73(7):1339-47, 1993.
- BÜELER H, FISCHER M, LANG Y, BLUETHMANN H, LIPP HP, DEARMOND SJ, PRUSINER SB, AGUET M, WEISSMANN C. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356(6370):577-82, 1992.
- CAGAMPANG FR, WHATLEY SA, MITCHELL AL, POWELL JF, CAMPBELL IC, COEN CW. Circadian regulation of prion protein messenger RNA in the rat forebrain: a widespread and synchronous rhythm. *Neuroscience* 91(4):1201-4, 1999.
- CHEN C, OKAYAMA H. Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* 6: 632-638, 1988

- CHEN SG, TELOW DB, PARCHI P, TELLER JK, GAMBETTI P, AUTILIO-GAMBETTI L. Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. *J Biol Chem.* 270(32):19173-80, 1995.
- CHESEBRO B, RACE R, WEHRLY K, NISHIO J, BLOOM M, LECHNER D, BERGSTROM S, ROBBINS K, MAYER L, KEITH JM. Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* 315(6017):331-3, 1985.
- CHESEBRO B. Prion protein and the transmissible spongiform encephalopathy diseases. *Neuron* 24(3):503-6, 1999.
- CHODOSH LA, BALDWIN AS, CARTHEW RW, SHARP PA. Human CCAAT-binding proteins have heterologous subunits. *Cel.* 53(1):11-24, 1988.
- COHEN SN, CHANG AC, HSU L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl Acad. Sci.* 69: 210, 1972.
- COLLINGE J, PALMER MS, DRYDEN AJ. Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 337(8755):1441-2, 1991.
- COLLINGE J, SIDLE KC, MEADS J, IRONSIDE J, HILL AF. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 383(6602):685-90, 1996.
- COLLINGE J, WHITTINGTON MA, SIDLE KC, SMITH CJ, PALMER MS, CLARKE AR, JEFFERYS JG. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370(6487):295-7, 1994.

- DAWSON-SAUNDERS B, TRAPP RG. eds. Basic and clinical biostatistics. 2^a ed. Appleton & Lange. Norwalk, Connecticut, USA, p 99-120, 1994.
- DICKINSON AG. Scrapie in sheep and goats. *Front Biol.*44:209-41, 1976.
- DIOMEDE L, SOZZANI S, LUINI W, ALGERI M, DE GIOIA L, CHIESA R, LIEVENS PM, BUGIANI O, FORLONI G, TAGLIAVINI F, SALMONA M. Activation effects of a prion protein fragment [PrP-(106-126)] on human leucocytes. *Biochem J.* 320 (Pt 2):563-70, 1996.
- DISEPIO D, SUTTER M, JOHNSON AT, CHANDRARATNA RA, NAGPAL S. Identification of the AP1-antagonism domain of retinoic acid receptors. *Mol Cell Biol Res Commun.* 1(1):7-13, 1999.
- DODELET VC, CASHMAN NR. Prion protein expression in human leukocyte differentiation. *Blood* 91(5):1556-61, 1998.
- DOETZLHOFFER A, ROTHENEDER H, LAGGER G, KORANDA M, KURTEV V, BROSCHE G, WINTERSBERGER E, SEISER C. Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1. *Mol Cell Biol.* 19(8):5504-11, 1999.
- DYNAN WS, TJIAN R. Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins. *Nature* 316(6031):774-8, 1985.
- DYNAN WS, SAFFER JD, LEE WS, TJIAN R. Transcription factor Sp1 recognizes promoter sequences from the monkey genome that are simian virus 40 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82(15):4915-9, 1985.

- EDENHOFER F, RIEGER R, FAMULOK M, WENDLER W, WEISS S, WINNACKER EL. Prion protein PrPc interacts with molecular chaperones of the Hsp60 family. *J Virol.* 70(7):4724-8, 1996.
- FORLONI G, ANGERETTI N, CHIESA R, MONZANI E, SALMONA M, BUGIANI O, TAGLIAVINI F. Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 362(6420):543-6, 1993.
- FORT P, MARTY L, PIECHACZYK M, EL SABROUTY S, DANI C, JEANTEUR P, BLANCHARD JM. Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Res.* 13(5):1431-42, 1985.
- FRASER H. The pathology of a natural and experimental scrapie. *Front Biol.* 44:267-305, 1976.
- FUTAMURA M, MONDEN Y, OKABE T, FUJITA-YOSHIGAKI J, YOKOYAMA S, NISHIMURA S. Trichostatin A inhibits both ras-induced neurite outgrowth of PC12 cells and morphological transformation of NIH3T3 cells. *Oncogene* 10(6):1119-23, 1995.
- GAJDUSEK DC, GIBBS CJ JR, ALPERS, M. Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 209:794-796, 1966.
- GASSET M, BALDWIN MA, LLOYD DH, GABRIEL JM, HOLTZMAN DM, COHEN F, FLETTERICK R, PRUSINER SB. Predicted alpha-helical regions of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(22):10940-4, 1992.

- GONZALEZ GA, MENZEL P, LEONARD J, FISCHER WH, MONTMINY MR. Characterization of motifs which are critical for activity of the cyclic AMP-responsive transcription factor CREB. *Mol Cell Biol.* 11(3):1306-12, 1991.
- GRANER E, MERCADANTE AF, ZANATA SM, FORLENZA OV, CABRAL AL, VEIGA SS, JULIANO MA, ROESLER R, WALZ R, MINETTI A, IZQUIERDO I, MARTINS VR, BRENTANI RR. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Brain Res Mol Brain Res.* 76(1):85-92, 2000.
- GRANER E, MERCADANTE AF, ZANATA SM, MARTINS VR, JAY DG, BRENTANI RR. Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. *FEBS Lett.* 482(3):257-60, 2000.
- GRUNSTEIN M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389(6649):349-52, 1997.
- HADLOW, WJ. Scrapie and Kuru. *Lancet* ii 289-290, 1959.
- HANSEN JC, TSE C, WOLFFE AP. Structure and function of the core histone N-termini: more than meets the eye. *Biochemistry* 37(51):17637-41, 1998.
- HASLINGER A, KARIN M. Upstream promoter element of the human metallothionein-IIA gene can act like an enhancer element. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82(24):8572-6, 1985.
- HOPE J, MORTON LJ, FARQUHAR CF, MULTHAUP G, BEYREUTHER K, KIMBERLIN RH. The major polypeptide of scrapie-associated fibrils (SAF) has the same size, charge distribution and N-terminal protein sequence as predicted for the normal brain protein (PrP). *EMBO J.* 5(10):2591-7, 1986.

- HORNSHAW MP, MCDERMOTT JR, CANDY JM, LAKEY JH. 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(3):993-9, 1995.
- HSIAO K, BAKER HF, CROW TJ, POULTER M, OWEN F, TERWILLIGER JD, WESTAWAY D, OTT J, PRUSINER SB. Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature* 23;338(6213):342-5, 1989.
- HSIAO KK, GROTH D, SCOTT M, YANG SL, SERBAN H, RAPP D, FOSTER D, TORCHIA M, DEARMOND SJ, PRUSINER SB. Serial transmission in rodents of neurodegeneration from transgenic mice expressing mutant prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91(19):9126-30, 1994.
- HSIAO KK, SCOTT M, FOSTER D, GROTH DF, DEARMOND SJ, PRUSINER SB. Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein. *Science* 250(4987):1587-90, 1990.
- IMAGAWA M, CHIU R, KARIN M. Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways: protein kinase C and cAMP. *Cell* 51(2):251-60, 1987.
- INOUE S, TANAKA M, HORIUCHI M, ISHIGURO N, SHINAGAWA M. Characterization of the bovine prion protein gene: the expression requires interaction between the promoter and intron. *J Vet Med Sci.* 59(3):175-83, 1997.
- JIMENEZ-HUETE A, LIEVENS PM, VIDAL R, PICCARDO P, GHETTI B, TAGLIAVINI F, FRANGIONE B, PRELLI F. Endogenous proteolytic cleavage of normal and disease-associated isoforms of the human prion protein in neural and non-neural tissues. *Am J Pathol.* 153(5):1561-72, 1998.

JIN T, GU Y, ZANUSSO G, SY M, KUMAR A, COHEN M, GAMBETTI P, SINGH N

The chaperone protein BiP binds to a mutant prion protein and mediates its degradation by the proteasome. *J Biol Chem.* 275(49):38699-704, 2000.

JONES KA, TJIAN R. Sp1 binds to promoter sequences and activates herpes simplex virus 'immediate-early' gene transcription in vitro. *Nature.* 317(6033):179-82, 1985.

KADONAGA JT. Eukaryotic transcription: an interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. *Cell.* 92(3):307-13, 1998.

KAKIZUKA A. Protein precipitation: a common etiology in neurodegenerative disorders? *Trends Genet.* 14(10):396-402, 1998.

KAPATOS G, STEGENGA SL, HIRAYAMA K. Identification and characterization of basal and cyclic AMP response elements in the promoter of the rat GTP cyclohydrolase I gene. *J Biol Chem.* 275(8):5947-57, 2000.

KARDASSIS D, PAPAKOSTA P, PARDALI K, MOUSTAKAS A. c-Jun transactivates the promoter of the human p21(WAF1/Cip1) gene by acting as a superactivator of the ubiquitous transcription factor Sp1. *J Biol Chem.* 274(41):29572-81, 1999.

KARLSEDER J, ROTHENEDER H, WINTERSBERGER E. Interaction of Sp1 with the growth- and cell cycle-regulated transcription factor E2F. *Mol Cell Biol.* 16(4):1659-67, 1996.

KITAMOTO T, AMANO N, TERAOKA Y, NAKAZATO Y, ISSHIKI T, MIZUTANI T, TATEISHI J. A new inherited prion disease (PrP-P105L mutation) showing spastic paraparesis. *Ann Neurol.* 34(6):808-13, 1993.

KLATZO I, GAJDUSEK DC, ZIGAS V. Pathology of kuru. *Lab Invest* 8: 799-847, 1959.

- KOCISKO DA, COME JH, PRIOLA SA, CHESEBRO B, RAYMOND GJ, LANSBURY PT, CAUGHEY B. Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* 370(6489):471-4, 1994.
- KORNBERG RD, LORCH Y Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98(3):285-94, 1999.
- KUUSISTO E, SUURONEN T, SALMINEN A. Ubiquitin-binding protein p62 expression is induced during apoptosis and proteasomal inhibition in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 280(1):223-8, 2001.
- KURSCHNER C, MORGAN JI Analysis of interaction sites in homo- and heteromeric complexes containing Bcl-2 family members and the cellular prion protein. *Brain Res Mol Brain Res.* 37(1-2):249-58, 1996.
- LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(259):680-5, 1970.
- LEE W, MITCHELL P, TJIAN R. Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell.* 49(6):741-52, 1987.
- LIN MC, MIRZABEKOV T, KAGAN BL. Channel formation by a neurotoxic prion protein fragment. *J Biol Chem.* 272(1):44-7, 1997.
- LUGER K, RICHMOND TJ. DNA binding within the nucleosome core. *Curr Opin Struct Biol.* 8(1):33-40, 1998.

- LUGER K, RECHSTEINER TJ, FLAUS AJ, WAYE MM, RICHMOND TJ. Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *J Mol Biol.* 272(3):301-11, 1997.
- LUSCHER B, MITCHELL PJ, WILLIAMS T, TJIAN R. Regulation of transcription factor AP-2 by the morphogen retinoic acid and by second messengers. *Genes Dev.* 3(10):1507-17, 1989.
- MAHAL SP, ASANTE EA, ANTONIOU M, COLLINGE J. Isolation and functional characterisation of the promoter region of the human prion protein gene. *Gene.* 268(1-2):105-14, 2001.
- MANDEL M, HIGA A. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53: 159, 1970.
- MANGE A, NISHIDA N, MILHAVET O, MCMAHON HE, CASANOVA D, LEHMANN S. Amphotericin B inhibits the generation of the scrapie isoform of the prion protein in infected cultures. *J Virol.* 74(7):3135-40, 2000.
- MANSON JC, CLARKE AR, HOOPER ML, AITCHISON L, MCCONNELL I, HOPE J. 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol.* 8(2-3):121-7, 1994.
- MANSON JC, WEST JD, THOMSON V, MCBRIDE P, KAUFMAN MH, HOPE J. The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development.* 115(1):117-22, 1992.
- MANTOVANI R. A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes. *Nucleic Acids Res.* 26(5):1135-43, 1998.

- MARTINS VR, GRANER E, BRENTANI, RR Doenças neurodegenerativas associadas a prions. In: Forlenza OV e Caramelli P editores. Neuropsiquiatria geriátrica. 1ªed. São Paulo, Brasil, Editora Atheneu, p 489-504, 2000.
- MARTINS VR, GRANER E, GARCIA-ABREU J, DE SOUZA SJ, MERCADANTE AF, VEIGA SS, ZANATA SM, NETO VM, BRENTANI RR. Complementary hydropathy identifies a cellular prion protein receptor. *Nat Med.* 3(12):1376-82, 1997.
- MARTINS VR, MERCADANTE AF, CABRAL AL, FREITAS AR, CASTRO RM. Insights into the physiological function of cellular prion protein. *Braz J Med Biol Res.* 34(5):585-95, 2001.
- MASQUILIER D, SASSONE-CORSI P. Transcriptional cross-talk: nuclear factors CREM and CREB bind to AP-1 sites and inhibit activation by Jun. *J Biol Chem.* 267(31):22460-6, 1992.
- MCKNIGHT S, TJIAN R. Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cel.* 46(6):795-805, 1986.
- MEDORI R, TRITSCHLER HJ, LEBLANC A, VILLARE F, MANETTO V, CHEN HY, XUE R, LEAL S, MONTAGNA P, CORTELLI P. Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *N Engl J Med* 326(7):444-9, 1992.
- MINER JN, YAMAMOTO KR. Regulatory crosstalk at composite response elements. *Trends Biochem Sci.* 16(11):423-6, 1991.

- MITCHELL PJ, TIMMONS PM, HEBERT JM, RIGBY PW, TJIAN R. Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis. *Genes Dev.* 5(1):105-19, 1991.
- MITCHELL PJ, WANG C, TJIAN R. Positive and negative regulation of transcription in vitro: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen. *Cell* 50(6):847-61, 1987.
- MOBLEY WC, NEVE RL, PRUSINER SB, MCKINLEY MP. Nerve growth factor increases mRNA levels for the prion protein and the beta-amyloid protein precursor in developing hamster brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(24):9811, 1988.
- MOORE RC, LEE IY, SILVERMAN GL, HARRISON PM, STROME R, HEINRICH C, KARUNARATNE A, PASTERNAK SH, CHISHTI MA, LIANG Y, MASTRANGELO P, WANG K, SMIT AF, KATAMINE S, CARLSON GA, COHEN FE, PRUSINER SB, MELTON DW, TREMBLAY P, HOOD LE, WESTAWAY D. Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J Mol Biol.* 292(4):797-817, 1999.
- MOSER M, COLELLO RJ, POTT U, OESCH B. Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron* 14(3):509-17, 1995.
- MOUILLET-RICHARD S, ERMONVAL M, CHEBASSIER C, LAPLANCHE JL, LEHMANN S, LAUNAY JM, KELLERMANN O. Signal transduction through prion protein. *Science.* 289(5486):1925-8, 2000.
- NARANG H. Origin and implication of Bovine Spongiform Encephalopathy. *Proc Soc Exp Biol Med.* 211:306-322, 1996.

- NG KW, RIDGWAY P, COHEN DR, TREMETHICK DJ. The binding of a Fos/Jun heterodimer can completely disrupt the structure of a nucleosome. *EMBO J.* 16(8):2072-85, 1997.
- NGUYEN J, BALDWIN MA, COHEN FE, PRUSINER SB. Prion protein peptides induce alpha-helix to beta-sheet conformational transitions. *Biochemistry* 34(13):4186-92, 1995.
- OESCH B, TELOW DB, STAHL N, SERBAN D, HOOD LE, PRUSINER SB. Identification of cellular proteins binding to the scrapie prion protein. *Biochemistry* 29(24):5848-55, 1990.
- OESCH B, WESTAWAY D, WALCHLI M, MCKINLEY MP, KENT SB, AEBERSOLD R, BARRY RA, TEMPST P, TELOW DB, HOOD LE, et al A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell.* 40(4):735-46, 1985.
- OISHI, M. e COSLOY, S. D. The genetic and biochemical basis of the transformability of *Escherichia coli* K12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49: 1568, 1972.
- PALMER MS, DRYDEN AJ, HUGHES JT, COLLINGE J. Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* 352(6333):340-2, 1991.
- PAN KM, STAHL N, PRUSINER SB. Purification and properties of the cellular prion protein from Syrian hamster brain. *Protein Sci.* 1(10):1343-52, 1992.
- PATTISON IH, MILSON GC. Distribution of the scrapie agent in the tissues of experimentally inoculated goats. *J. Comp. Pathol.* 71:171-6, 1961a.

- PATTISON IH, MILSON GC Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. *J. Comp. Pathol.* 71:101-8, 1961b.
- PATTISON J. The emergence of bovine spongiform encephalopathy and related diseases. *Emerg Infect Dis.* 4(3):390-4, 1998.
- PETERSEN RB, GOLDFARB LG, TABATON M, BROWN P, MONARI L, CORTELLI P, MONTAGNA P, AUTILIO-GAMBETTI L, GAJDUSEK DC, LUGARESI E, et al. A novel mechanism of phenotypic heterogeneity demonstrated by the effect of a polymorphism on a pathogenic mutation in the PRNP (prion protein gene). *Mol Neurobiol.* 8(2-3):99-103, 1994.
- PFAHL M. Nuclear receptor/AP-1 interaction. *Endocr Rev.* 14(5):651-8, 1993.
- PRUSINER SB, BOLTON DC, GROTH DF, BOWMAN KA, COCHRAN SP, MCKINLEY MP. Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry* 21(26):6942-50, 1982.
- PRUSINER SB, GROTH DF, BOLTON DC, KENT SB, HOOD LE. Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell* 38(1):127-34, 1984.
- PRUSINER SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(23):13363-83, 1998.
- PRUSINER SB. The prion diseases. *Sci Am.* Jan 272(1):48-51, 54-7, 1995.
- PUCKETT C, CONCANNON P, CASEY C, HOOD L Genomic structure of the human prion protein gene. *Am J Hum Genet.* 49(2):320-9, 1991.

- RAUSCHER FJ 3RD, SAMBUCETTI LC, CURRAN T, DISTEL RJ, SPIEGELMAN BM. Common DNA binding site for Fos protein complexes and transcription factor AP-1. *Cell*. 52(3):471-80, 1988.
- RICE JC, ALLIS CD. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 13(3):263-73, 2001.
- RICHARDSON EP JR, MASTERS CL. The nosology of Creutzfeldt-Jakob disease and conditions related to the accumulation of PrPCJD in the nervous system. *Brain Pathol*. 5(1):33-41, 1995.
- RIEGER R, EDENHOFER F, LASMEZAS CI, WEISS S. The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat Med*. (12):1383-8, 1997.
- ROEDER RG. The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly. *Trends Biochem Sci*. 16(11):402-8, 1991.
- ROESLER R, WALZ R, QUEVEDO J, DE-PARIS F, ZANATA SM, GRANER E, IZQUIERDO I, MARTINS VR, BRENTANI RR. Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP(C). *Brain Res Mol Brain Res*. 71(2):349-53, 1999.
- SAEKI K, MATSUMOTO Y, HIROTA Y, MATSUMOTO Y, ONODERA T. Three-exon structure of the gene encoding the rat prion protein and its expression in tissues. *Virus Genes*. 12(1):15-20, 1996a.
- SAEKI K, MATSUMOTO Y, MATSUMOTO Y, ONODERA T. Identification of a promoter region in the rat prion protein gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 219(1):47-52, 1996b.

- SAKAGUCHI S, KATAMINE S, NISHIDA N, MORIUCHI R, SHIGEMATSU K, SUGIMOTO T, NAKATANI A, KATAOKA Y, HOUTANI T, SHIRABE S, OKADA H, HASEGAWA S, MIYAMOTO T, NODA T. Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* 380(6574):528-31, 1996.
- SALBERT G, FANJUL A, PIEDRAFITA FJ, LU XP, KIM SJ, TRAN P, PFAHL M. Retinoic acid receptors and retinoid X receptor-alpha down-regulate the transforming growth factor-beta 1 promoter by antagonizing AP-1 activity. *Mol Endocrinol.* 7(10):1347-56, 1993.
- SALÈS N, RODOLFO K, HASSIG R, FAUCHEUX B, DI GIAMBERARDINO L, MOYA KL. Cellular prion protein localization in rodent and primate brain. *Eur J Neurosci.* 10(7):2464-71, 1998.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(12):5463-7, 1977.
- SANGUINETTI CJ, DIAS NETO E, SIMPSON AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques.* 17(5):914-21, 1994.
- SASSONE-CORSI P, VISVADER J, FERLAND L, MELLON PL, VERMA IM. Induction of proto-oncogene fos transcription through the adenylate cyclase pathway: characterization of a cAMP-responsive element. *Genes Dev.* 2(12A):1529-38, 1988.

- SATOH J, KUROHARA K, YUKITAKE M, KURODA Y. Constitutive and cytokine-inducible expression of prion protein gene in human neural cell lines. *J Neuropathol Exp Neurol.* Feb;57(2):131-9, 1998.
- SCHÜLE R, UMESONO K, MANGELSDORF DJ, BOLADO J, PIKE JW, EVANS RM. Jun-Fos and receptors for vitamins A and D recognize a common response element in the human osteocalcin gene. *Cell* 61(3):497-504, 1990.
- SCOTT M, FOSTER D, MIRENDA C, SERBAN D, COUFAL F, WALCHLI M, TORCHIA M, GROTH D, CARLSON G, DEARMOND SJ, et al. Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell* 59(5):847-57, 1989.
- SCOTT MR, BUTLER DA, BREDESEN DE, WALCHLI M, HSIAO KK, PRUSINER SB. Prion protein gene expression in cultured cells. *Protein Eng.* 2(1):69-76, 1988.
- SHYU WC, KAO MC, CHOU WY, HSU YD, SOONG BW. Heat shock modulates prion protein expression in human NT-2 cells. *Neuroreport.* 11(4):771-4, 2000.
- SNAPE AM, WINNING RS, SARGENT TD. Transcription factor AP-2 is tissue-specific in *Xenopus* and is closely related or identical to keratin transcription factor 1 (KTF-1). *Development.* 113(1):283-93, 1991.
- SOUTHERN PJ, BERG P. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J Mol Appl Genet.* 1(4):327-41, 1982.
- STAHL N, BORCHELT DR, PRUSINER SB. Differential release of cellular and scrapie prion proteins from cellular membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochemistry* 29(22):5405-12, 1990.

STEELMAN VM. Prion diseases: an evidence-based protocol for infection control. *AORN J* 69(5):946-54, 956-67 passim; quiz 968-76, 1999.

STEKEL DJ, NOWAK MA, SOUTHWOOD TR. Prediction of future BSE spread. *Nature* 381(6578):119, 1996.

SUPATTAPONE S, WILLE H, UYECHI L, SAFAR J, TREMBLAY P, SZOKA FC, COHEN FE, PRUSINER SB, SCOTT MR Branched polyamines cure prion-infected neuroblastoma cells. *J Virol.* 75(7):3453-61, 2001.

TELLING GC, HAGA T, TORCHIA M, TREMBLAY P, DEARMOND SJ, PRUSINER SB. Interactions between wild-type and mutant prion proteins modulate neurodegeneration in transgenic mice. *Genes Dev.* 10(14):1736-50, 1996a.

TELLING GC, PARCHI P, DEARMOND SJ, CORTELLI P, MONTAGNA P, GABIZON R, MASTRIANNI J, LUGARESI E, GAMBETTI P, PRUSINER SB. Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* 274(5295):2079-82, 1996b.

TELLING GC, SCOTT M, MASTRIANNI J, GABIZON R, TORCHIA M, COHEN FE, DEARMOND SJ, PRUSINER SB. Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 83(1):79-90, 1995.

TIENRUNGROJ W, SANCHEZ ER, HOUSLEY PR, HARRISON RW, PRATT WB. Glucocorticoid receptor phosphorylation, transformation, and DNA binding. *J Biol Chem.* 262(36):17342-9, 1987.

TOBLER I, GAUS SE, DEBOER T, ACHERMANN P, FISCHER M, RULICKE T, MOSER M, OESCH B, MCBRIDE PA, MANSON JC. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380(6575):639-42,1996.

TSAI SY, TSAI MJ, O'MALLEY BW Cooperative binding of steroid hormone receptors contributes to transcriptional synergism at target enhancer elements. *Cell* 57(3):443-8, 1989.

VILES JH, COHEN FE, PRUSINER SB, GOODIN DB, WRIGHT PE, DYSON HJ Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(5):2042-7, 1999.

VINCENT B, PAITEL E, FROBERT Y, LEHMANN S, GRASSI J, CHECLER F. Phorbol ester-regulated cleavage of normal prion protein in HEK293 human cells and murine neurons. *J Biol Chem.* 275(45):35612-6, 2000.

WALTON KM, REHFUSS RP. Molecular mechanisms of cAMP-regulated gene expression. *Mol Neurobiol.* 4(3-4):197-210, 1990.

WALZ R, AMARAL OB, ROCKENBACH IC, ROESLER R, IZQUIERDO I, CAVALHEIRO EA, MARTINS VR, BRENTANI RR. Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. *Epilepsia.* 40(12):1679-82, 1999.

WATANABE T, KATAYAMA Y, KIMURA S, YOSHINO A. Control of proliferation and survival of C6 glioma cells with modification of the nerve growth factor autocrine system. *J Neurooncol.* 41(2):121-8, 1999.

- WEISSMANN C. The Ninth Datta Lecture. Molecular biology of transmissible spongiform encephalopathies. FEBS Lett. 389(1):3-11, 1996.
- WESTAWAY D, COOPER C, TURNER S, DA COSTA M, CARLSON GA, PRUSINER SB. Structure and polymorphism of the mouse prion protein gene. Proc Natl Acad Sci U S A. 91(14):6418-22, 1994.
- WHITLOCK JP JR, SIMPSON RT. Localization of the sites along nucleosome DNA which interact with NH₂-terminal histone regions. J Biol Chem. 252(18):6516-20, 1977.
- WILESMITH JW, RYAN JB, STEVENSON MA, MORRIS RS, PFEIFFER DU, LIN D, JACKSON R, SANSON RL. Temporal aspects of the epidemic of bovine spongiform encephalopathy in Great Britain: holding-associated risk factors for the disease. Vet Rec. Sep 147(12):319-25, 2000.
- WILESMITH JW, WELLS GA, CRANWELL MP, RYAN JB. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. Vet Rec. 123(25):638-44, 1988.
- WILL RG, IRONSIDE JW, ZEIDLER M, COUSENS SN, ESTIBEIRO K, ALPEROVITCH A, POSER S, POCCHIARI M, HOFMAN A, SMITH PG. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. Lancet 347(9006):921-5, 1996.
- WILLIAMS T, ADMON A, LUSCHER B, TJIAN R. Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements. Genes Dev. 2(12A):1557-69, 1988.
- WILLIAMS T, TJIAN R. Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2. Genes Dev. 5(4):670-82, 1991.

- WINDL O, DEMPSTER M, ESTIBEIRO JP, LATHE R, DE SILVA R, ESMONDE T, WILL R, SPRINGBETT A, CAMPBELL TA, SIDLE KC, PALMER MS, COLLINGE J. Genetic basis of Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom: a systematic analysis of predisposing mutations and allelic variation in the PRNP gene. *Hum Genet.* 98(3):259-64, 1996.
- WION D, LE BERT M, BRACHET P. Messenger RNAs of beta-amyloid precursor protein and prion protein are regulated by nerve growth factor in PC12 cells. *Int J Dev Neurosci.* 6(4):387-93, 1988.
- WOLFFE AP, GUSCHIN D. Review: chromatin structural features and targets that regulate transcription. *J Struct Biol.* 129(2-3):102-22, 2000.
- WOLFFE AP, HAYES JJ. Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res.* 27(3):711-20, 1999.
- WOLFFE AP, KURUMIZAKA H. The nucleosome: a powerful regulator of transcription. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 61:379-422, 1998.
- WU J, GRUNSTEIN M. 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. *Trends Biochem Sci.* 25(12):619-23, 2000.
- WYATT JM, PEARSON GR, SMERDON TN, GRUFFYDD-JONES TJ, WELLS GA, WILESMITH JW. Naturally occurring scrapie-like spongiform encephalopathy in five domestic cats. *Vet Rec.* 129(11):233-6, 1991.
- XI YG, INGROSSO L, LADOGANA A, MASULLO C, POCCHIARI M. Amphotericin B treatment dissociates in vivo replication of the scrapie agent from PrP accumulation. *Nature* 356(6370):598-601, 1992.

- XIE WF, KONDO S, SANDELL LJ. Regulation of the mouse cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein gene by the transcription factor AP-2. *J Biol Chem.* 273(9):5026-32, 1998.
- XU L, GLASS CK, ROSENFELD MG. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev.* 9(2):140-7, 1999.
- YEHIELY F, BAMBOROUGH P, DA COSTA M, PERRY BJ, THINAKARAN G, COHEN FE, CARLSON GA, PRUSINER SB Identification of candidate proteins binding to prion protein. *Neurobiol Dis.* 3(4):339-55, 1997.
- YOSHIDA M, KIJIMA M, AKITA M, BEPPU T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem.* 265(28):17174-9, 1990.
- ZEIDLER M, STEWART GE, BARRACLOUGH CR, BATEMAN DE, BATES D, BURN DJ, COLCHESTER AC, DURWARD W, FLETCHER NA, HAWKINS SA, MACKENZIE JM, WILL RG. New variant Creutzfeldt-Jakob disease: neurological features and diagnostic tests. *Lancet* 350(9082):903-7, 1997.

CURRICULUM VITAE

Nome: Ana Lucia Beirão Cabral

Local e data nasc.: São Paulo, SP, 07/11/70

Educação:

-Colégio Bandeirantes-São Paulo-SP (1985-1987).

-Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Bacharelado em Ciências Biológicas (1989-1992).

-Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Licenciatura Ciências Biológicas (1989-1993).

-Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Mestrado em Ciências (1994-1996) sob orientação da Dra. Vilma Regina Martins, com apoio financeiro da FAPESP.

-Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Doutorado em Ciências (1997-2001) sob orientação da Dra. Vilma Regina Martins, com apoio financeiro da FAPESP.

Publicações:

-Moussa, F; **Cabral, A.L.B.** e Martins, V. R. “Participation of cellular prion-laminin interaction in adhesion, migration and invasion of metastatic cells”. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*, Suplemento 1 volume 57, 1999.

-Graner, E.; Mercadante, A.F.; Zanata, S.M.; Forlenza, O.V.; **Cabral, A.L.B.**; Veiga, S.S.; Juliano, M.A.; Roesler, R.; Walz, R.; Minetti, A.; Izquierdo, I.; Martins, V.R. e Brentani, R.R. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Molecular Brain Research* 76(1): 85-92, 2000.

-Maistro, S.; **Cabral, A.L.B.**; Martins, V.R.; Brentani, M.M.; federico, M.H.H. “Inhibitory response to $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin d3 is restored in HC11-ras clone transfected with VDR-pop13 expression vector. *Proc. Eleventh workshop on vitamin D*. 439-442, 2000.

-Martins, V. R.; Mercadante, A.F.; **Cabral, A.L.B.**; Freitas, A.R.O. e Castro, R.M.R.P.S. “Insights on the physiological function of cellular prion protein” *Braz J Med Biol Res* 34(5): 585-95, 2001.

-**Cabral, A.L.B.**; Hays, A.N.; Housley, P.R.; Brentani, M.M. e Martins, V.R. “Repression of glucocorticoid receptor gene transcription by c-jun”. *Molecular and Cellular Endocrinology* 175(1-2):67-79, 2001.

-**Cabral, A.L.B.**; Lee, K. S. e Martins, VR. "Regulation of PrPc gene expression is dependent on chromatin conformation". *Journal of Biological Chemistry*-submetido.