BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
20.290

Rec. 11/03/03
Fidel
Fidel de

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

BIOLOGIA DA PROTEÍNA PRION CELULAR

KIL SUN LEE
TESE DE DOUTORADO

ORIENTADORA: DRA. VILMA R. MARTINS

SÃO PAULO
04 de novembro de 2002

(Nota da BCQ: Não foi possível capturar fielmente a imagem das figuras desta tese)

DEDALUS - Acervo - CQ

30100005153

Ficha Catalográfica

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

Lee, Kil Sun
L478b Biologia da proteína prion celular / Kil Sun Lee. --
São Paulo, 2002.
103p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Martins, Vilma Regina

I. Prion celular : Bioquímica I. T. II. Martins,
Vilma Regina, orientador.

574.19245 CDD

Dedicatória

Ao meu marido Marcelo, pela convivência cheia de amor e carinho e pelo apoio e estímulo constante.

Aos meus pais, Woo Jin Lee e Eun Joo Hwang, pela educação e pelo imenso amor.

Aos meus irmãos, KyuSun,, JungHwa, JinHwa e YooSung, por todo amor e carinho que existe entre nós.

Agradecimentos

À minha orientadora, Dra. Vilma Regina Martins pela orientação, pelas sugestões, pela confiança e pelas oportunidades concedidas.

Ao Prof. Ricardo R. Brentani pelos seus ensinamentos, pela discussão sobre os trabalhos e pelas oportunidades concedidas.

Ao Dr. Marco Prado pelos seus ensinamentos, pela orientação e colaboração e pelos incentivos e estímulos que trouxeram um grande avanço na minha formação.

Às minhas queridas amigas Adriana Freitas e Rosa Castro pela amizade, pelo apoio, pelas convivências carinhosas e pelas conversas agradáveis e às vezes engraçadas.

À Adriana Mercadante e ao Sílvio Zanata pela amizade, pelas conversas e sugestões.

À Ana pelo convite de participar no seu trabalho de Doutorado.

À Marilene pela companhia nos experimentos realizados em outras instituições e pela amizade.

À Glaucia pelas discussões sobre o trabalho e sobre nossos maridos e pela amizade.

Ao pessoal do laboratório, Angelita, Flávia, Kath, Wanda, Regina, Fernanda, Michele, Rogério, Carol, Freitas, Rosa, Marilene e Glaucia pelas inúmeras ajudas, pela amizade, pelo apoio, pelas convivências agradáveis e pelas reuniões do grupo que foram bastante produtivas.

Ao pessoal do laboratório de Neurofarmacologia de ICB da UFMG, Aninha e Aléx, Lucimar e Andrezinho, Cristina, Magda, Júnior, Juliana, Luciane, Adriane, Eliane,

Melissa, Flávia, André e Guilherme por ter me acolhido com muito carinho durante a época que trabalhei em BH e pela amizade.

À Elis e à Anna Chirs pelos sequenciamento e pela disponibilidade a todo momento

Aos Aristóbolo, Eduardo Pires e Dr. Luis Fernando Lima Reis por terem me ensinado toda técnica de biologia molecular.

Ao pessoal do Instituto Ludwig pela disponibilidade e auxílio constante e pelas convivências agradáveis.

Aos Prof. Antonio Cassola (ICB – USP) e Dr. Renato Mortara (EPM) e às Fernanda (EPM) e Dra. Alison (ICB – USP) por ter disponibilizado o microscopia confocal para a realização dos experimentos deste trabalho.

Aos meus sogros pela compreensão, pelo carinho e pelo apoio.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

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

Índice

Abreviações	3
Resumo	5
Summary	7
Prefácio	9
1. Introdução	11
1.1 Prions	11
1.2 Proteína Prion Celular	13
1.3 Estudos da função fisiológica de PrPc a partir da identificação de seus ligantes	14
1.4 Sinalização	16
1.4.1 A importância da sinalização de cálcio nos processos neuronais	16
1.4.2 Sinalização mediada por PrPc	17
1.5 Tráfego de PrPc	18
1.6 Organelas envolvidas no tráfego de proteínas	20
2. Objetivos	24
3. Materiais e Métodos	25
3.1 Animais	25
3.2 Anticorpos e peptídeos	25
3.3 Culturas de células	25
3.4 Extração de RNA total	26
3.5 DDRT-PCR	27
3.6 “Northern blot”	29
3.7 Preparação de sinaptossoma e extrato total	30
3.8 Tratamento de camundongos com solução de ácido caínico	30
3.9 Medidas de cálcio Intracelular	31
3.10 Proteínas recombinantes	32
3.11 Transfecção dos plasmídeos	36
3.12 Preparação de extrato total de células SN56	37
3.13 “Western blot”	37
3.14 Tratamento com PiPLC	38
3.15 Marcação de Organelas	38

3.16 Imunofluorescência	40
3.17 Ensaio de Internalização de GFP-PrPc	41
4. Resultados	43
4.1 Caracterização dos genes regulados pela interação de PrPc –receptor (STI1) ou diferencialmente expressos entre animais normais e “knockout” para PrPc	43
4.2 Regulação da expressão de PrPc	49
4.3 Sinalização da interação PrPc-laminina	51
4.3.1 Sinalização de cálcio mediada por peptídeo $\gamma 1$ da laminina nas células SN56	51
4.3.2 Sinalização de cálcio desencadeada pela interação PrPc-laminina	56
4.4. Biologia celular de PrPc	58
4.4.1 Caracterização de proteínas recombinantes de PrPc	58
4.4.2 Caracterização da distribuição e o tráfego celular de PrPc	61
4.4.3 Internalização de GFP-PrPc	65
4.4.4 Mapeamento dos domínios de PrPc responsáveis pela localização e tráfego de PrPc	67
5. Discussão	76
5.1 Caracterização dos genes regulados pela interação de PrPc –receptor (STI1) ou diferencialmente expressos entre animais normais e “knockout” para PrPc	76
5.2 Regulação da expressão de PrPc	77
5.3 Sinalização de cálcio desencadeada pela interação PrPc-laminina	78
5.4 GFP-PrPc: uma nova ferramenta para estudos de tráfego de PrPc	82
5.5 Caracterização da distribuição e o tráfego celular de PrPc	83
5.6 Domínios responsáveis pela distribuição celular de PrPc	85
6. Conclusões	90
7. Referências Bibliográficas	91
Curriculum Vitae	101
Anexos	103

Abreviações

a.a. – aminoácidos

CJD – Doença de Creutzfeldt-Jakob

Da – dalton

DDRT – “differential display reverse transcription”

DEPC – dietil pirocarbonato

DNA – ácido desoxirribonucleico

DMEM – “Dulbecco’s modified Eagle’s Medium”

EDTA – ácido etilenodiaminatetracético

FITC – isotiocianato de fluoresceína

GFP – “Green Fluorescent Protein”

GPI – “glycosylphosphatidylinositol”

GSS – Doença de Gertsman-Straussler-Scheiker

HBSS – “Hepes Buffered Saline Solution”

HEPES – hidroxietil – piperazina – N – 2 – etano – sulfônico

MEM – “Minimal Essential Medium”

mRNA – RNA mensageiro

PB – tampão de fosfato

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PiPLC – “Phospholipase C, Phosphatidylinositol-specific”

PrPc - Proteína Prion Celular

PrPsc- Proteína Prion *Scrapie*

RFP – “Red Fluorescent Protein”

RNA – ácido ribonucleico

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS –PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

STI 1 – “Stress Inducible Protein 1”

TBS – “Tris buffered saline”

TGN – “Trans Golgi Network”

UV – radiação ultravioleta

xg – aceleração de gravidade

Resumo

O prion celular (PrPc) é uma glicoproteína ligada à membrana plasmática por uma âncora de GPI (glycosylphosphatidylinositol). A sua isoforma anormal (PrPsc) é uma molécula infecciosa que causa várias doenças neurodegenerativas em mamíferos. A etiologia dessas doenças está associada a uma mudança conformacional pós-traducional de PrPc que ocorre após sua internalização (Prusiner, 1998).

Na tentativa de desvendar as funções fisiológicas de PrPc, nosso grupo tem identificado e caracterizado as interações celulares que PrPc participa. A primeira delas é a interação entre PrPc e STI1 (Stress Inducible Protein 1). Essa interação transduz sinalização por cAMP e PKA levando a neuroproteção contra morte celular programada (Chiarini e cols, 2002; Zanata e cols, 2002). A segunda é a interação específica que existe entre PrPc e as proteínas da matriz extracelular, laminina e vitronectina, contribuindo para os processos neuronais, tais como crescimento, manutenção (Graner e cols., 2000 a e b) e regeneração dos neuritos (Hajj e cols., submetido), além da formação de memória de curta e longa duração (Coitinho e cols., submetido).

Na primeira parte deste trabalho, procuramos investigar os genes regulados pelos sinais resultantes dessas interações e também pela remoção de PrPc usando a técnica de “differential display” RT-PCR.

Na segunda parte do trabalho, caracterizamos que a interação PrPc – laminina é capaz de induzir uma sinalização transitória de cálcio, a qual ocorre mesmo na ausência de cálcio do meio extracelular.

PrPc é uma molécula que cicla continuamente entre a membrana plasmática e os compartimentos intracelulares. Estudos recentes têm correlacionado o processo de internalização de PrPc com alguns dos seus papéis fisiológicos, tais como, homeostase de Cu^{2+} (Brown, 2001), interação com receptor de laminina (Gauczynski e cols, 2001) e até na conversão de PrPc para PrPsc (McKinley e cols, 1991; Arnold e cols, 1995).

Portanto, na terceira parte deste trabalho, caracterizamos a localização e o tráfego celular de PrPc mostrando que PrPc está localizado na membrana

plasmática e em compartimentos intracelulares e que trafega pelo Golgi, membrana plasmática, endossomos iniciais e de reciclagem. Foram mapeados ainda domínios na região amino-terminal responsáveis pela internalização de PrPc e na região carboxi-terminal como participantes da via secretora.

Este trabalho contribuiu para o esclarecimento de alguns eventos biológicos relacionados à sinalização e ao tráfego de PrPc. Estes achados são de grande importância para a determinação das funções celulares de PrPc e ainda dos mecanismos envolvidos com as doenças relacionadas com esta molécula.

Summary

The cellular prion protein (PrPc) is a glycoprotein anchored to the plasma membrane by GPI (Glycosyl-phosphatidylinositol). Its abnormal isoform (PrPsc) is the infectious protein responsible for several neurodegenerative diseases. The main etiology of the prion diseases is related to conformational changes in the PrPc molecule, which occur after its internalization (Prusiner, 1998).

In order to elucidate the physiological functions of PrPc, our group identified and characterized interactions between PrPc and other cellular molecules. The first is the interaction between PrPc and STI 1 (Stress Inducible Protein 1). This interaction has an important role in the neuroprotection against apoptosis through cAMP and PKA signaling (Chiarini et al., 2002; Zanata et al., 2002). PrPc also interacts with proteins of the extracellular matrix such as laminin and vitronectin. These interactions contribute for neurite outgrowth, maintenance and regeneration (Graner et al., 2000 a and b; Hajj et al., submitted) and also in memory formation (Coitinho et al., submitted).

In the first part of this work we have applied the differential display RT-PCR technique in order to identify genes that are regulated by PrPc – STI 1 interaction and also by the deletion of PrPc.

In the second part we have demonstrated that PrPc-laminin interaction induces transient calcium signaling in neuronal cells, which occurs even in the absence of extracellular calcium.

PrPc cycles continuously between the plasma membrane and intracellular compartments. This mechanism is associated with some of the physiological function of PrPc, such as Cu^{2+} homeostasis (Brown, 2001), interaction with laminin receptor (Gauczynski et al., 2001), and PrPc conversion into PrPsc (McKinley et al., 1991; Arnold et al., 1995).

Thus, in the third part of this project, we have characterized the PrPc localization at the cell surface and in intracellular compartments. The protein trafficking through Golgi apparatus, plasma membrane, early and recycling endosomes was also defined. Moreover, we have determined that N-terminus

PrPc domain is responsible for its internalization while C-terminus participates in PrPc delivery.

Therefore, this work has contributed to elucidate biological events related to the cell signaling and trafficking of PrPc, which are important for the characterization of PrPc physiological functions and to understand the pathological mechanisms related to this molecule.

Prefácio

O prion (PrPsc) é uma partícula infecciosa, isenta de ácidos nucleicos e composta exclusivamente de proteínas, que é capaz de induzir a conversão da isoforma normal denominada de proteína prion celular, PrPc para a forma infecciosa PrPsc. Essa conversão de PrPc para PrPsc está associada às mudanças conformacionais pós-traducionais que formam uma molécula infecciosa, transmissível e patogênica, relacionada a várias doenças neurodegenerativas em mamíferos (Prusiner, 1998). Esse novo mecanismo de infecção e transmissão das doenças a partir de partículas protéicas despertou uma grande interesse no meio científico e o prion tornou-se um dos temas de destaque na literatura nos últimos anos.

Nosso grupo tem se dedicado a investigar as possíveis funções fisiológicas de PrPc identificando as moléculas que interagem com PrPc e averiguando o significado fisiológico dessas interações. Esses estudos foram realizados através da intensa colaboração com grupos das outras instituições, utilizando diversos modelos experimentais. Além disso, vários aspectos foram tratados, desde a regulação da expressão de PrPc até a sua participação em processos mais complexos, tais como a formação de memória. Pertencendo a este grupo tão ativo, tive muitas oportunidades de conhecer novas técnicas, aprender a interpretar os resultados com diversos pontos de vista e de participar em diferentes estudos.

No presente trabalho, foram apresentados somente os dados gerados sob a minha responsabilidade que abrangem: a identificação dos genes regulados pela interação PrPc-STI 1; regulação da expressão de PrPc por ácido caínico; a caracterização da sinalização de cálcio desencadeada pela interação PrPc-laminina e a avaliação da distribuição e o tráfego celular de PrPc.

As duas últimas partes desse trabalho foram realizadas em colaboração com o grupo do Dr. Marco A. Prado do Departamento da Neurofarmacologia do ICB da UFMG que disponibilizou a microscopia confocal para nossos experimentos além de ensinar as técnicas de aquisição de imagem e as

estratégias para o estudo de tráfego das proteínas e de quantificação de sinalização de cálcio intracelular. Esta colaboração foi bastante produtiva e permitiu a publicação de dois artigos em tempo relativamente curto (Lee e cols., 2001; Magalhães e cols., 2002; em anexo).

Além desses estudos, tive a oportunidade de participar na identificação e a caracterização de STI1 como o ligante de PrPc (Zanata e cols., 2002) e no estudo da regulação da expressão do gene da proteína prion celular (Cabral e cols., 2002). Os resultados obtidos destes estudos foram anexados na forma do artigo.

1. Introdução

1.1 Prions

1.1.1 Doenças causadas por prion

A melhor definição do termo "*prion*" é uma partícula protéica infecciosa isenta de ácidos nucléicos. O prion é o agente responsável por várias doenças neurodegenerativas fatais, sendo *Scrapie* que afeta cabras e ovelhas, foi a primeira a ser reconhecida como a doença causada por prion. Alguns anos depois, foram identificadas várias doenças humanas que são clinicamente e patologicamente semelhante a *Scrapie*: "Kuru", Doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), Doença de Gertsman-Straüssler-Scheiker (GSS) e Insônia Familiar Fatal (FFI) (Horwich e Weissman, 1997). Essas doenças podem ocorrer por fatores genéticos, esporádicos ou iatrogênicos. Recentemente, as doenças prionicas causaram um impacto profundo na área de saúde pública devido às evidências que encefalopatia espongiforme bovina (BSE), também conhecida como "doença da vaca louca", foi transmitida para homens através do consumo de carnes contaminados (Chiesa e Harris, 2001). Essas doenças são caracterizadas por demência progressiva, ataxia, degeneração neuronal espongiforme, gliose e em alguns casos pela deposição de material amilóide (Prusiner, 1998).

1.1.2 Proteína prion scrapie

A identificação e a caracterização da partícula infecciosa, prion, deve-se em parte à habilidade de transmitir a doença a partir do homogenato de cérebro de animais infectados. Em 1982, Prusiner e colaboradores conseguiram preparar uma fração que contem a infectividade enriquecida em aproximadamente 1000 vezes a partir de extrato total de cérebros de animais infectados por prion. Esta fração foi conseguida após várias etapas de purificação tais como precipitação por polietileno glicol, digestão com nuclease, digestão limitada com a proteinase K e centrifugação em gradiente de sacarose (Prusiner e cols., 1982). Foi verificado que a infectividade pode ser inativada

pela digestão com proteinase K, uréia, fenol e SDS, mas não pela irradiação com UV ou pelos tratamentos com nucleases, sugerindo que o agente responsável pela infecção possui caráter protéico. A purificação desta proteína infecciosa permitiu a produção de anticorpos prion específicos. Curiosamente, esses anticorpos reconheceram uma proteína de 33-35 kDa tanto no extrato de cérebros de animais normais como no extrato de cérebros de animais infectados além de uma proteína de 27-30 kDa na fração enriquecida de infectividade (Oesch e cols. 1985). O seqüenciamento dessas proteínas demonstrou que estas possuíam a mesma seqüência de aminoácidos sendo que a proteína de 27-30 kDa é uma molécula resultante da clivagem de 67 resíduos de aminoácidos do N-terminal, gerada durante o processo de purificação e digestão limitada com a proteinase K. Apesar da mesma seqüência de aminoácidos, as duas isoformas possuem características bioquímicas bem diferentes. Enquanto a isoforma normal é solúvel e sensível à ação de proteases, a isoforma infecciosa mostra-se insolúvel e resistente à proteólise. Além disso, estudos de espectroscopia mostraram que a estrutura de proteína normal é rica em alfa-hélice enquanto que a molécula infecciosa possui mais estruturas beta-pregueadas (Caughey e cols., 1991; Stahl e cols., 1993; Pan e cols., 1993). Assim, a isoforma infecciosa foi denominada de proteína prion scrapie (PrPsc) e a isoforma celular normal de proteína prion celular (PrPc).

As evidências de que prion é isento de ácidos nucléicos e que PrPsc tem a mesma seqüência de aminoácidos de PrPc, sendo que toda fase aberta de leitura do gene está contida em um único exon, sugerem que as diferenças entre PrPc e PrPsc sejam provenientes das modificações pós-traducionais (Hope e cols., 1986). Esta hipótese foi definitivamente confirmada quando o animal transgênico depletado do gene de PrPc mostrou-se resistente à infecção por prion (Büeler e cols., 1993). Assim, o estudo sobre PrPc teve um grande destaque na literatura devido a sua participação na replicação das partículas infecciosas por um mecanismo completamente novo e a possibilidade que modificações de PrPc estejam relacionadas às doenças ainda desconhecidas.

1.2 Proteína Prion Celular (PrPc)

PrPc é uma glicoproteína ligada a membrana plasmática por âncora de GPI (glicosilfosfatidilinositol), expressa constitutivamente em vários tecidos principalmente no sistema nervoso central (Chesebro e cols., 1985). A proteína de várias espécies possui aproximadamente 250 aminoácidos, dos quais os primeiros 22 resíduos da extremidade amino-terminal constituem o peptídeo sinal para endereçamento da proteína e os 23 resíduos do carboxi-terminal são removidos para a adição do âncora de GPI. O gene de PrPc encontra-se no braço curto do cromossomo 20 do homem e no cromossomo 2 do camundongo (Chesebro e cols., 1985). Após a tradução, PrPc é submetido a algumas modificações pós-traducionais, tais como a adição de oligossacarídeos N-ligados em regiões consenso (nos aminoácidos 181 e 197 de PrPc de hamster e de humano), formação de uma ponte de dissulfeto intramolecular entre resíduos de cisteína 179 e 214 e remoção dos peptídeos sinais de endereçamento e de adição de âncora de GPI como foi mencionado anteriormente (Prusiner, 1991). Através dos estudos de modelagem molecular e de RMN (Ressonância Magnética Nuclear) foi possível prever a presença de três estruturas em α -hélice que estão localizadas nos fragmentos de resíduos de aminoácidos 144 - 155 (α -hélice 1), 173 - 194 (α -hélice 2) e 200 - 228 (α -hélice 3). Além disso, foram detectadas pequenas estruturas de folha β -pregueada anti-paralelas nos resíduos 128 - 131 e 161 - 164. A região N-terminal (23-124) não possui uma estrutura secundária bem definida (Zahn e cols., 2000).

A função fisiológica de PrPc foi intensamente estudada por vários grupos diferentes e há fortes evidências que PrPc associa-se a Cu^{2+} (Brown e cols., 1997) e que essa ligação é importante para homeostase deste íon na região da sinapse (Brown, 2001). Além disso, foi demonstrado que quando PrPc está associado ao íon cobre apresenta atividade enzimática semelhante à da superóxido dismutase, o que poderia propiciar a resistência celular ao estresse oxidativo (Brown e cols., 1999). Foi mostrado também que PrPc participa na

modulação da ativação de plasminogênio tecidual de maneira dependente de íon cobre (Ellis e cols., 2002). A localização de PrPc na região pré-sináptica e nos axônios em alongamento sugere que PrPc pode ter um papel importante no crescimento de axônios (Salès e cols., 2002). Esses dados reforçam os resultados do nosso grupo, uma vez que as interações de PrPc com a laminina ou com a vitronectina estimulam o crescimento e a regeneração de neuritos (Graner e cols., 2000a e b, Hajj e cols., submetido). Além disso, a interação de PrPc com STI 1 (Stress Inducible Protein 1) induz sinais de neuroproteção contra morte celular programada (Chiarini e cols., 2002; Zanata e cols., 2002).

1.3 Estudos das funções fisiológicas de PrPc a partir da identificação de seus ligantes.

Vários estudos investigaram as moléculas que interagem com PrPc na tentativa de elucidar melhor seu papel fisiológico. Atualmente, diversas moléculas foram identificadas como sendo ligantes ou receptores de PrPc tais como receptor da laminina (Gauczynski e col., 2001), glicosaminoglicana (Gonzalez-Iglesias e cols., 2002), N-CAM (Schmitt-Ulms e cols., 2001), entre outras. No entanto, não foi possível identificar nenhuma função fisiológica relevante a partir destas interações, o que não trouxe novas informações a respeito da função celular de PrPc.

Por outro lado, algumas interações demonstradas pelo nosso grupo serviram para aumentar o conhecimento sobre o papel fisiológico de PrPc. A primeira delas é a interação específica que ocorre entre PrPc e a laminina. Laminina é uma glicoproteína da matriz extracelular responsável pela proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência das células (Powell e Kleinman, 1997). Foi mostrado que o domínio contido entre os aminoácidos 173 a 180 de PrPc é capaz de se ligar ao domínio do decapeptídeo (RNIAEIIKDI) localizado na cadeia γ 1 da laminina. Esta interação estimula o crescimento de neuritos e ao ser desligada, provoca uma retração dos processos já estendidos sugerindo que PrPc seja importante para a plasticidade neuronal (Graner e cols., 2000a e b). Além disso, existem

evidências que essa interação é importante para a consolidação da memória de curta e longa duração (Coitinho e cols., submetido).

Outra interação importante ocorre entre PrPc e a molécula de STI 1 (Stress Inducible Protein 1). A identificação de STI 1 como ligante de PrPc foi baseada nos dados da literatura, os quais demonstram que a região compreendida entre os aminoácidos 114 - 129 é essencial para internalização de PrPc (Shyng e cols., 1995) sendo ainda o domínio mais conservado entre as espécies (Schätzl e cols., 1995). Além disso, o peptídeo que abrange os aminoácidos 106 a 126 é capaz de reproduzir a neurotoxicidade causada por uma molécula inteira de PrPsc (Forloni e cols., 1993). Portanto, um provável receptor de PrPc que medeia a internalização do mesmo e que promova a comunicação entre PrPc e meio intracelular deveria interagir com este sítio dentro da molécula de PrPc. Assim, nos baseamos na teoria de hidropaticidade complementar para desenhar um peptídeo teórico complementar a região de aminoácidos 114 - 129. Esse peptídeo complementar foi sintetizado quimicamente e foi utilizado para produção de anticorpos, que reconheceram uma proteína de 66kDa em extrato total de cérebro e em preparações de membranas celulares (Martins e cols., 1997). Várias abordagens experimentais mostraram a interação desta proteína com PrPc. Além disso, o peptídeo complementar foi capaz de bloquear o efeito tóxico do peptídeo correspondente a região de aminoácidos 106 a 126 de PrPc em cultura primária de neurônios hipocâmpais sugerindo que o peptídeo complementar pode mimetizar a proteína de 66 kDa (Martins e cols., 1997). Desta forma, o presente trabalho iniciou-se com objetivo de identificar os genes regulados pela interação de PrPc com a proteína de 66 kDa. Para isso, utilizamos a técnica de DDRT-PCR comparando a expressão gênica das células tratadas ou não com o peptídeo complementar, já que naquele momento, a identidade da proteína de 66 kDa não havia sido determinada.

Posteriormente, foi possível purificar esta proteína através de eletroforese bidimensional. O seqüenciamento dessa proteína permitiu a identificação de STI 1 como possível receptor de PrPc. É importante ressaltar que o sítio de ligação de STI 1 na molécula de PrPc está localizado nos

resíduos de aminoácidos 113 a 128 como foi predito pela teoria de hidropaticidade complementar e que o sítio de ligação de PrPc localizado na região de aminoácidos 230 a 245 da molécula de STI 1 possui um perfil de hidropaticidade complementar a PrPc e semelhante ao peptídeo proposto inicialmente (Zanata e cols., 2002). Foi mostrado também que essa interação ocorre na superfície celular induzindo sinais de neuroproteção contra morte celular programada (Chiarini e cols., 2002; Zanata e cols., 2002). Interessantemente, o domínio de ligação de STI 1 está situado entre os aminoácidos 113-128 na molécula de PrPc, diferente do sítio de ligação de laminina, sugerindo que PrPc poderia participar na formação de complexos macromoleculares entre as proteínas da matriz extracelular e as proteínas da membrana plasmática (Martins e cols., 2002).

Uma terceira interação ocorre ainda entre PrPc e a vitronectina, onde os sinais gerados levam a regeneração de neurônios de gânglios de raiz dorsal (Hajj e cols, submetido).

Assim, os resultados gerados pelo nosso grupo sugerem que PrPc seja uma molécula muito importante para os processos de diferenciação e regeneração neuronais.

1.4 Sinalização

1.4.1 A importância da sinalização de cálcio nos processos neuronais

A alteração transitória da concentração de cálcio intracelular modula vários processos neuronais fundamentais, tais como a liberação de neurotransmissores e a plasticidade sináptica. Os neurônios utilizam fontes intra e extracelulares de cálcio como outras células. O mecanismo de influxo de cálcio a partir do meio extracelular está bem estabelecido e é dado pela entrada de íon cálcio através de canais sensíveis a voltagem ou canais regulados pelos receptores de neurotransmissores (Berridge, 1998). No entanto, o mecanismo de liberação de cálcio a partir do retículo endoplasmático é menos conhecido.

Os neurônios possuem um sistema elaborado de retículo endoplasmático que está estendido por toda a célula incluindo a região de sinapse (Martone e cols., 1993; Terasaki e cols., 1994). A rede de retículo endoplasmático neuronal contribui para as dinâmicas de sinalização por cálcio sendo que os receptores de Inositol 1, 4, 5-tris-fosfato ou de rianodina distribuídos em toda membrana de retículo endoplasmático são os principais responsáveis pela liberação de cálcio intracelular (Simpson e cols., 1995). Uma das características mais importantes desses receptores é que eles são sensíveis a íon Ca^{2+} , produzindo um fenômeno de liberação de cálcio, induzido por cálcio (" Ca^{2+} - induced Ca^{2+} release"). Este fenômeno é considerado como um processo regenerativo da sinalização de cálcio e é fundamental para a amplificação e a propagação de sinais de cálcio por toda a célula (Berridge, 1998).

Portanto, a sinalização por cálcio nos neurônios apresenta uma grande vantagem em termos de velocidade da propagação de sinais e o retículo endoplasmático tem uma importante função de transferir informações a partir das regiões distantes do corpo celular para o núcleo. Esse tipo de sinalização é bastante útil, por exemplo, nos processos de formação de memória de longa duração, a qual requer uma mudança mais permanente tais como a síntese de novas proteínas e as modificações na plasticidade sináptica, ou seja uma comunicação rápida entre sinapse e núcleos (Izquierdo e Medina, 1997).

1.4.2 Sinalização mediada por PrPc

Existem várias evidências que sugerem que PrPc poderia ser uma molécula de sinalização. Por exemplo, Mouillet-Richard e colaboradores mostraram que PrPc pode sinalizar ativando a Fyn quinase e que esta sinalização ocorre após "cross linking" de PrPc na superfície celular pelo anticorpo e é dependente da caveolina-1 (Mouillet-Richard e cols., 2000). Além disso, as moléculas importantes para os processos de sinalização neuronal, tais como, sinapsina Ib e Grb2, foram identificadas como ligantes de PrPc (Spielhaupter e Schatzl, 2001). Foi mostrado que PrPc bovino é capaz de

interagir fortemente com a subunidade catalítica de proteína quinase CK2 aumentando a atividade de fosfotransferase desta enzima (Meggio e cols., 2000). Nosso grupo mostrou que a interação de PrPc com STI 1, que leva a proteção contra apoptose, envolve a sinalização por via de cAMP e PKA (Chiarini e cols., 2002). Sabemos ainda que a formação de memória de longa e curta duração é estimulada pela interação PrPc – laminina e que esta interação desencadeia a sinalização por via cAMP, PKA e MAPK. Além disso, estudos eletrofisiológicos sugerem que os animais infectados por prion scrapie apresentam a perda de neurônios devido à diminuição de entrada de Ca^{2+} extracelular e redução de concentração de cálcio intracelular (Jefferys e cols., 1994; Barrow e cols., 1999). Parece que essa diminuição está relacionada à resposta de cálcio mediada por receptores de neurotransmissores, tais como nociceptor (Kristensson e cols., 1993). Herms e colaboradores mostraram que as células granulares de cerebelo derivadas de animais "knockout" de PrPc apresentam alteração na homeostase de cálcio (Herms e cols., 2000). Assim, parece que PrPc apresenta também uma importante função no processo de sinalização de cálcio neuronal.

Tendo evidências de que a interação de PrPc com a laminina tem importante papel no crescimento e manutenção de neuritos e na formação de memória e que PrPc pode participar na sinalização de cálcio que é um evento importante para os processos neuronais, resolvemos estudar a sinalização de cálcio desencadeada pela interação de PrPc – laminina.

1.5 Tráfego de PrPc

O tráfego e a localização celular de PrPc é um outro aspecto bastante relevante para a função fisiológica do mesmo. PrPc cicla constitutivamente entre a superfície celular e os compartimentos intracelulares (Shyng e cols., 1993), mas a razão dessa reciclagem é pouco conhecida. Portanto, o estudo sobre a trajetória tomada por PrPc e as moléculas envolvidas no seu tráfego pode gerar mais informações, sobre sua função fisiológica.

Quanto ao mecanismo de internalização de PrPc, existem pelo menos duas vias possíveis e os dados da literatura a respeito são bastante

controversos. Enquanto que o grupo de David Harris mostrou que a internalização de PrPc se dá por vesículas encapadas por clatrina (Shyng e cols. 1995), Vey e colaboradores sugerem que tal processo ocorre por cavéola (Vey e cols. 1996;). Além disso, vários grupos mostraram que o íon cobre é capaz de estimular a endocitose de PrPc de aves e de mamíferos (Pauly & Harris, 1998; Sumudhu e cols., 2001; Lee e cols., 2001). Foi sugerido ainda que a ligação de íons cobre a PrPc poderia alterar a conformação do mesmo de tal maneira que aumente a sua afinidade por um possível receptor (Pauly & Harris, 1998).

É importante ressaltar que algumas mutações em moléculas de PrPc, relacionadas às doenças priônicas, são capazes de alterar o tráfego e/ou a localização da proteína. Foi proposto que a mutação de resíduo de alanina 117 para valina que ocorre na doença de GSS pode estimular a produção de uma molécula transmembrânica de PrPc e que essa biogênese anormal seria um componente chave para a neurodegeneração (Hegde e cols., 1998). As substituições de resíduos de aminoácidos de PrPc (E200K e D178N) relacionadas com as doenças de CJD e a insônia familiar fatal causam anomalias na distribuição de PrPc (Negro e cols., 2001). Outras mutações que introduzem um novo códon de terminação produzindo PrPc truncado resultam na translocação da proteína para o núcleo, a qual vai ser degradada rapidamente por proteassomos (Lorenz e cols., 2001). O enovelamento errôneo assim como o desvio da trajetória normal tomada por PrPc mutantes pode ser um fator importante para a patogênese, sugerindo mais uma vez que o tráfego de PrPc está intimamente associado com a sua função fisiológica.

PrPc como outras proteínas da membrana plasmática é sintetizado no retículo endoplasmático e sofre modificações pós-traducionais no lúmen deste. Após a síntese, a proteína é endereçada para membrana plasmática atravessando o complexo de Golgi. Recentemente foi demonstrado que o transporte retrógrado de PrPc para o retículo endoplasmático estimula a formação de PrPsc nas células infectadas por prion (Beranger e cols., 2002), dando suporte aos estudos anteriores que sugerem que a conversão de PrPc para PrPsc dá-se após a internalização de PrPc nos compartimentos

intracelulares (McKinley e cols., 1991; Arnold e cols., 1995). Por outro lado, foi proposto que a conversão de PrPc para PrPsc pode ocorrer na membrana plasmática dentro de domínios ricos em lipídeos insolúveis a detergente, onde normalmente as moléculas de PrPc estão agrupadas (Kaneko e cols., 1997). Além disso, Baron e colaboradores mostraram que a conversão de PrPc para PrPsc pode ocorrer num sistema livre de células contendo somente a preparação de domínios da membrana ricos em lipídeos insolúveis a detergente e a fração microssomal. O fator essencial para que ocorra a conversão nesse sistema é que o inoculo de PrPsc deve estar contido na membrana contígua onde PrPc está ancorado (Baron e cols., 2002). Interessantemente, foi mostrado que a proteína PrPc pode ser transferida de uma célula para outra nas condições em que a proteína quinase C esteja ativada e que as células doadoras e receptoras estejam em contato físico (Liu e cols., 2002). Assim, a replicação das partículas infecciosas parece ocorrer tanto nos compartimentos intracelulares como na membrana plasmática.

Desta forma, o estudo do tráfego de PrPc além de contribuir para o entendimento da função fisiológica desta molécula, trará um grande avanço no esclarecimento do processo infeccioso mediado por prion.

1.6 Organelas envolvidas no tráfego das proteínas

Vários estudos de tráfego de proteínas desde as leveduras até as células de mamíferos têm mostrado um mesmo mecanismo básico onde as proteínas movimentam-se entre os compartimentos intracelulares e a membrana plasmática (Jackson, 1998; Marsh e McMahon, 1999). Portanto, o tráfego de proteínas da membrana plasmática deve ocorrer sempre dentro do contexto de bicamada lipídica que são denominadas como organelas endocíticas ou endossomos. A organização celular e as características específicas de cada organela mantêm bem definidas mesmo na troca contínua dos conteúdos entre essas organelas, pois este processo ocorre através de vesículas carregadoras que transportam materiais entre as organelas (Le Borgne e Hoflack, 1998). Assim, uma das etapas fundamentais deste processo

inicia-se com a liberação dessas vesículas carregadoras a partir de compartimentos doadores e a atividade de uma GTPase denominado de dinamina, exerce uma importante função nessa etapa (McNiven e cols., 2000). Apesar de que a dinamina foi identificada inicialmente como a molécula que medeia a endocitose dependente da clatrina (Damke e cols., 1994; Herskovits e cols., 1993), existem evidências de que esta GTPase pode participar também na endocitose mediada por caveola (Henley e cols., 1998 Oh e cols., 1998).

Uma vez que a proteína da membrana plasmática é internalizada, ela é transportada para endossomos iniciais ("early endosomes") também chamados de endossomos de endereçamento ("sorting endosomes") (Dunn e cols., 1989). Essas organelas encontram-se espalhadas próximas à membrana plasmática. A partir de endossomos iniciais as proteínas podem ser enviadas para endossomos de reciclagem ("recycling endosomes") e para endossomos tardios ("late endosomes"), que têm a localização pericentrolar. A partir de endossomos tardios, as proteínas podem ser enviadas para lisossomos, onde serão degradadas ou para TGN ("Trans-Golgi-network") e seguir novamente as vias secretoras (Clague, 1998) (Figura 1).

A distinção dessas diversas organelas é uma tarefa difícil, uma vez que o fluxo das vias endocíticas não ocorre em tempos sincronizados e que os endossomos são extremamente pleomórficos (Griffiths e cols., 1989) sendo que cada tipo celular apresenta diferentes morfologias e a localização de endossomos (Yamashiro e Maxfield 1984; Hopkins e cols., 1990). Além disso, os endossomos iniciais e de reciclagem trocam sua membrana e seu conteúdo constantemente com os endossomos tardios, membrana plasmática e TGN (Ghosh e cols., 1998).

Portanto, uma definição mais precisa de cada organela endossomal deve incluir seus marcadores moleculares. Algumas das proteínas mais estudadas que auxiliam na identificação funcional de cada organela endossomal são as pequenas GTPases da família Rab. Cada membro dessa família possui uma localização distinta ao longo das vias secretoras e endocíticas (Novick e Zerial, 1997). Por exemplo, Rab 5 é conhecido como responsável pela formação, e fusão homotípica de endossomos iniciais (McLauchlan e cols.,

1998) enquanto que Rab 4 está envolvida na reciclagem rápida para membrana plasmática a partir de endossomos iniciais (Sheff e cols., 1999). Rab 11 é normalmente encontrado nos endossomos de reciclagem e em TGN e participa nas vias secretoras reguladas (Calhoun e cols., 1998).

Membrana plasmática

Figura 1: Esquema de tráfego das proteínas da membrana plasmática. VE –vesículas encapadas; EI – endossomos iniciais; ER – endossomos de reciclagem; VC- vesículas carregadoras de fração endossomal; ET – endossomos tardios; L – lisossomos; TGN – “Trans – Golgi – network”. Setas unidirecionais indica as etapas da transporte e setas bidirecionais indicam eventos de fusão homotípicas ou existência de organelas híbridas.

Além de proteínas da família Rab, fatores como pH intracompartimental, a composição lipídica e a organização do citoesqueleto são importantes para a identificação de endossomos e a organização de fluxos de materiais dentro das vias endocíticas (Clague, 1998).

Desta forma, a última parte deste projeto consiste na geração de proteína recombinante GFP-PrPc que servirá de ferramenta para que a seguir estudemos o tráfego e a distribuição celular de PrPc, além de caracterizar os domínios da molécula envolvidos neste eventos.

Este trabalho portanto, está totalmente integrado a trabalhos que estiveram ou que ainda estão em andamento em nosso grupo que tem como objetivo de caracterizar as funções celulares de PrPc.

2. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivos:

- a) Identificar os genes regulados pela sinalização resultante da interação PrPc – STI 1.
- b) Estudar a sinalização de cálcio desencadeada pela interação PrPc-laminina.
- c) Construir a proteína recombinante, GFP-PrPc e seus mutantes de deleção de domínios de ligação a laminina, a STI1 e de outros domínios relevante citados na literatura.
- d) Caracterizar a localização e o tráfego de GFP-PrPc comparando com as proteínas nativas de PrPc.
- e) Mapear os domínios de PrPc responsáveis por seu tráfego e a distribuição celular.

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais

Camundongos “knockout” de PrPc: Camundongos híbridos de raça C57BL/6J e 129Sv cujo gene de PrP foi deletado (PrP0/0). Esses camundongos foram doados pelo Dr. Charles Weissmann (Universidade Zürich, Suíça) e sua obtenção foi descrita previamente (Büeler e col., 1992).

Camundongos WT: Os camundongos controle foram gerados no laboratório acasalando C57BL/6J e 129/Sv para que estes tivessem a conteúdo genético similar que os animais “knockout”.

3.2 Anticorpos e peptídeos

Os anticorpos anti-PrPc usados neste trabalho foram gerados no laboratório através da imunização de camundongos “knockout” de PrPc com a proteína recombinante de His₆-PrPc (Chiarini e cols., 2002 ; Zanata e cols., 2002).

Os anticorpos anti-STI 1 foram produzidos contra a proteína recombinante STI 1 em coelho (Bethyl Co) (Zanata e cols., 2002).

Os anticorpos anti-SNAP25 (SySY), anti-GFP (Clontech) e anti-actina (Sigma) foram adquiridos comercialmente.

Os peptídeos utilizados nos experimentos de medidas de cálcio intracelular foram sintetizados quimicamente por Neosystem (França) ou pelo grupo do Dra. Maria Aparecida Juliano de INFAR (Brasil).

3.3 Cultura de células

Linhagem SN56

SN56 é uma linhagem híbrida gerada pela fusão de neurônios septais de camundongos com neuroblastoma N18TG2 (Lee e cols., 1990). Essa linhagem de células apresenta várias características neuronais incluindo a expressão das proteínas de vesículas sinápticas e de canais de cálcio neuronais (Barbosa e cols., 1999). Essas células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco’s modified Eagle’s médium, Invitrogen) contendo 10% de soro fetal bovino, 2mM

de L-glutamina e 1% de penicilina/estreptomicina, trocando o meio a cada 48 horas. A diferenciação das células foi realizada no mesmo meio citado acima, porém desprovida de soro fetal bovino e contendo 1mM de dibutilil-cAMP. Durante a diferenciação, o meio foi trocado diariamente.

Cultura primária de neurônios de hipocampo de E18 de camundongos

Hipocampos de embriões de 18 dias de camundongos normais e "knockout" de PrPc foram dissecados em HBSS (Invitrogen) e tripsinizados por 15 min a 37°C. Após a inativação da tripsina com meio Neurobasal (Invitrogen) contendo 10% de soro fetal bovino, as células foram dissociadas mecanicamente com auxílio de pipeta Pasteur de orifício de 1mm² formando uma suspensão homogênea. Para os experimentos de DDTR-PCR, 4 x 10⁶ células foram semeadas em placa de Petri de diâmetro de 10cm previamente tratadas com poli-L-lisina (5 µg/ml) ou com a laminina (10 µg/ml) e para os experimentos de medida de cálcio intracelular, 1,5 x 10⁵ células foram semeadas em lamínulas de vidro (2,2 x 2,2 cm²) também, previamente tratadas com Poli-L-lisina (5µg/ml). Nas primeiras 24 horas, as células foram cultivadas em meio Neurobasal contendo suplemento B-27 (Invitrogen), 2mM de glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina e 5% de soro fetal bovino. A partir do segundo dia, as células foram mantidas no mesmo meio, porém desprovido de soro por três a cinco dias até a realização dos experimentos.

3.4 Extração de RNA total

As células foram lavadas com PBS e lisadas com 3ml de solução D (250g de tiocianato de guanidina; 293ml de água purificada em milliQ; 17,6ml de Na-citrato 0,75M, 26,4ml de sarcosyl 10%, 0,36ml de β-mercaptoetanol, pH 7). Às células lisadas, foram adicionados 300µl de NaOAc 2M pH 4. A seguir, foi realizada uma extração com 3ml de fenol (pH 4) e 600µl de uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (49:1). A fase aquosa foi recuperada e o RNA foi precipitado pela adição do mesmo volume de isopropanol. Os precipitados foram lavados com etanol 80%, secos e ressuspensos em H₂O tratada com

dietil pirocarbonato (DEPC).

3.5 DDRT-PCR

Iniciadores

Para DDRT-PCR e a reamplificação dos cDNAs obtidos a partir do gel de poliácridamida, foram utilizados os iniciadores aleatórios denominados por 13 (5'-CTGATCCATG-3'), 14 (5'-CTGCTCTCAA-3') e 15 (5'-CTTGATTGCC-3') e os iniciadores ancorados T₁₁VN, sendo que o V representa os nucleotídeos A, C ou G e o N, os nucleotídeos A, T, C e G.

DDRT-PCR

Cinqüenta microgramas de RNA total de cada amostra foram tratados com 10U de Dnase I e 0,04µg/µl de proteinase K. Após o tratamento, foi realizada uma extração com fenol (pH 4) e clorofórmio, seguida de uma precipitação com NaCl 1,2 M e etanol 75%. Os precipitados foram lavados, secos e ressuspensos em H₂O/DEPC.

Com 0,4µg de RNA tratado, foi feita uma transcrição reversa usando-se 2µl de iniciador ancorado 25µM, 2µl de dNTPs 200µM, 1µl de RNAsin 40U/µl e 200U de transcriptase reversa em volume final de 20µl.

Dois microlitros de cDNAs obtidos acima foram amplificados por PCR utilizando-se 2,5U de Taq DNA-polimerase, 2µl de dNTPs 200µM, 2,5mM de MgCl₂, 0,5µl de dCTP α-[³²P] 10Ci/µl, 2µl de iniciador ancorado 25µM e 2µl de iniciador aleatório 5µM em volume final de 20µl. A reação foi feita em 40 ciclos de 94°C/30seg., 40°C/2min., 72°C/30seg. e um último ciclo de extensão a 72°C/5min.

Recuperação de cDNA

Os produtos de PCR foram fracionados em gel de poliácridamida 6%. Os fragmentos de gel que contém as bandas diferenciais entre as amostras foram cortados e cDNA de cada fragmento de gel foi eluído com 100µl de água à 95°C e precipitados com NaOAc 3M e etanol. Após a centrifugação, os precipitados foram lavados com etanol 80%, secos e ressuspensos em 20µl

de água. Dois microlitros desse cDNA foram reamplificados nas mesmas condições de PCR mencionadas acima, porém sem usar [dCPT] radioativo. Os produtos da reamplificação foram fracionados em gel de agarose 1,2% e purificados por extração com fenol/clorofórmio (pH 8) e seguida de precipitação.

Clonagem de cDNAs reamplificados

Foi utilizado Kit Sure Clone[®] da Pharmacia de acordo com especificações de fabricante: cDNAs foram fosforilados e as extremidades cegas foram formadas com 6U de fragmento Klenow da DNA polimerase, 6U de T4 Polinucleotídeo Quinase e tampão “blunting/kinase” 1X em volume final de 20µl, a 37°C por 30 minutos. O produto da reação foi purificado em uma micro coluna de sephacryl S-200. A reação de ligação foi procedida utilizando 50ng de pUC 18 digerido com SmaI (extremidade não coesiva) e defosforilado com CIP (calf intestinal phosphatase), 10mM de DTT, 13µl de material eluído da coluna, 6U da enzima T4 DNA ligase e 1µl de tampão da enzima para um volume final de 20µl. A reação foi incubada por 16 horas a 16°C.

As bactérias termocompetentes foram transformadas pelos produtos da ligação incubando-se as bactérias com os produtos da ligação por 30 minutos à 4°C e submetendo a um choque térmico de 42°C por 2 minutos. Depois do choque térmico, foi adicionado 1ml de meio LB e incubado à 37°C por uma hora. As bactérias transformadas foram plaqueadas em LB contendo bacto ágar 15g/L, ampicilina 100µg/ml, IPTG 0,15mM e X-Gal 20µg/ml. Colônias brancas contendo o inserto foram recuperadas.

Isolamento de DNA plasmidial e Seqüenciamento

Este procedimento foi realizado conforme as determinações do Kit Wizard Minipreps. As bactérias transformadas foram crescidas por 16 horas a 37°C sob agitação constante. Estas foram recuperadas, ressuspensas com 150µl da solução de suspensão (50mM tris HCl pH 7,5; 10mM EDTA, 100mg/ml RNase A). Foram acrescentados 150µl da solução de lise (0,2M

NaOH; 1%SDS) e agitados vagarosamente. Após a agitação, foram adicionados 150µl da solução de neutralização (1,32M acetato de potássio). O lisado foi centrifugado a 22000 xg por dez minutos. O sobrenadante foi recuperado e incubado com 500µl da resina do kit por 30 minutos, sob agitação constante, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para uma micro coluna para separar a resina da solução. Cinquenta microlitros de água à 70°C foram adicionados à resina que foi centrifugada. DNA plasmidial obtido foi seqüenciado em um aparelho Alf Express da Pharmacia Biotech usando-se iniciadores fornecidos pela Pharmacia.

3.6 “Northern blot”

Dez microgramas de cada amostra de RNA total foram fracionados em gel de agarose 1% contendo formaldeído. Após a eletroforese, o gel foi lavado com a solução de SSC 4X (NaCl 0,6M e Citrato de sódio 0,06M) por 15 minutos e com SSC 10X (NaCl 1,5 M e Citrato de sódio 0,15 M) por 20 minutos. Os RNAs foram transferidos para uma membrana de nylon por capilaridade por 18 horas, à temperatura ambiente. Os RNAs foram fixados a membrana utilizando-se UV Crosslinker® da Fisher Biotech.

As membranas foram pre-incubadas com a solução contendo 0,25M de Na₂HPO₄, SDS 7%, BSA 1% e 1mM de EDTA (pH 7,2) por 1hora à 65°C em forno giratório. Após a pré-incubação, as sondas marcadas radioativamente por Kit “Random primers - DNA labelling System (Invitrogen) foram adicionadas e a hibridização foi realizada por 12 a 16 horas à 65°C. Em seguida, as membranas foram lavadas com uma solução contendo 0,25M de Na₂HPO₄, SDS 1% e 1mM de EDTA (pH 7,2) por 30 minutos à 65°C. Após a lavagem, um filme de raio X foi exposto à membrana. O filme foi revelado em câmara escura, utilizando-se soluções reveladora e fixadora conforme as especificações do fabricante. A quantificação do sinal radioativo no autoradiograma foi realizada usando-se um densitômetro LKB Bromma ULTROSAN. Os valores relativos do sinal foram normalizados pela razão entre o sinal apresentado pela amostra após a hibridização com a sonda de interesse e o apresentado após a

hibridização com o DNA do controle interno, GAPDH.

3.7 Preparação de sinaptossoma e de extrato total de hipocampus

Sinaptossoma

Hipocampus de camundongos normais e de “knockout” de PrPc de 2 meses foram homogeneizados em tampão-gradiente (sacarose 0,32M; EDTA 1mM e DTT 0,25mM pH7,4) com Daunce acoplado com pistilo de teflon. O homogenato foi centrifugado a 1,030 xg por 10 minutos. O sobrenadante coletado foi aplicado em gradiente de Percoll (3, 10, 15 e 23 % em solução gradiente) e centrifugado por 15 min a 18000 xg. As frações 3 e 4 formadas no tubo (de cima para baixo) foram recolhidas, lavadas com tampão de HBSS (NaCl 124mM; KCl 4mM; MgSO₄ 1,2mM; HEPES 25mM e glicose 10mM) e centrifugando por 15 minutos a 18000 xg. O precipitado foi recuperado, transferido para tubos eppendorff e lavado mais uma vez com HBSS. A preparação foi armazenada no freezer -70°C em HBSS com inibidores de protease.

Extrato total de hipocampo

Hipocampus de camundongos normais e “knockout” de PrPc foram dissecados em PBS e triturados mecanicamente com auxílio de pipeta Pasteur. As células foram recuperadas pela centrifugação de 10 min a 1000 xg e lisadas em PBS contendo NP-40 1% e inibidores de proteases. O lisado foi centrifugado novamente por 10 minutos a 5000 xg e o sobrenadante foram armazenados no freezer -70°C com inibidores de protease.

3.8 Tratamento de camundongos com solução de ácido cáinico

A solução de ácido cáinico foi preparada sempre no dia do experimento dissolvendo o mesmo em PBS. Antes de preparar a solução, os camundongos a serem tratados foram pesados previamente e a solução foi preparado numa concentração de tal maneira que aproximadamente 300µl seja aplicada nos camundongos. Neste trabalho, utilizamos seguintes concentrações: 5 e 10mg

de ácido cáínico por kg de massa corporal de camundongos. A solução é administrada no camundongo intraperitonealmente. Um animal injetado com 300µl de PBS foi usado como controle.

3.9 Medida de cálcio intracelular

Fluo-3 AM é uma molécula derivada de EGTA que fluoresce quando está ligado a Ca^{2+} . Esse corante fluorescente é usado como indicador de concentração de cálcio intracelular (Haugland e cols., 1996).

As células SN56 diferenciadas por dois dias foram marcadas com o corante fluorescente, fluo-3AM 10µM por uma hora a 37°C. Após a marcação, as células foram lavadas três vezes com a solução de HBSS. A lamínula contendo as células foi transferida para câmara de perfusão e as células foram mantidas em HBSS. Em seguida, 3 ml de HBSS com alta concentração de KCl (60mM) ou de soluções de peptídeos γ 1 (RNIAEIIKDI; 40µg/ml) ou “scrambled” de γ 1 (IRADIEIKIN; 40µg/ml) dissolvidos em HBSS foram perfundidas nas células, sendo que entre as perfusões de cada solução, as células foram lavadas com HBSS. A variação da intensidade da fluorescência das células foi registrada a cada dois segundos no sistema de microscopia confocal Bio-Rad MRC 1024 acoplado a um microscópio Zeiss (Axiovert 100) com objetiva de imersão em água (40X, 1,2 NA) com auxílio de programa Timecourse 1.0. O laser de argônio UV (488nm) foi usado para excitação das amostras e a fluorescência emitida foi selecionada utilizando filtro 522/35. Para verificar a participação do estoque de cálcio intracelular do retículo endoplasmático neste

evento, realizamos o mesmo experimento com HBSS desprovida de CaCl_2 e contendo EDTA 5mM.

A medida de cálcio intracelular foi realizada também com as células de cultura primária de hipocampo derivado de camundongos normais e “knockout” de PrPc mantidas três a cinco dias na cultura. Foi utilizado o mesmo procedimento citado acima com as pequenas mudanças, tais como, o tempo de incubação com fluo-3AM que foi de 30 minutos e a concentração da solução de peptídeos (80 $\mu\text{g/ml}$).

3.10 Proteínas Recombinantes e vetores de expressão

GFP-PrPc

GFP ("Green Fluorescent Protein") é uma proteína de 238 aminoácidos clonada a partir de água-viva *Aequorea victoria*. Essa proteína é capaz de emitir a fluorescência por si só quando excitada sob determinados comprimentos de onda sem necessidade de cofatores especiais ou um substrato permitindo seu uso como um fluoróforo funcional (Chalfie e cols., 1994). Além disso, a expressão de GFP parece ser inerte para as células. Assim, para estudar a localização e o tráfego de PrPc nas células vivas, construímos a proteína recombinante GFP-PrPc de seguinte maneira: o cDNA codificador de peptídeo sinal de PrPc de camundongo (códon 1 a 22) foi amplificado por PCR usando os iniciadores 5'-CCA CCG GTA TCA GTC ATC ATG GCG AAC CT-3' e 5'-AAA CCG GTA AGC AGA GGC CTA CAT CAG TC-3'. O produto de PCR foi purificado e clonado na extremidade 5' do cDNA codificador de EGFP, presente no vetor pEGFP-C1 (Clontech). Para isso, foi utilizado o sítio de enzima de restrição AgeI.

A região codificadora de aminoácidos 23 a 254 de PrPc de camundongo foi amplificada por PCR usando iniciadores 5'-CAG AAT TCT AAA AAG CGG CCA AGC-3' e 5'-CAG GAT CCA CCC ACG ATC AGG AAG ATG-3'. O produto de PCR foi purificado e clonado utilizando os sítios de enzima de restrição Eco RI e Bam HI, localizados na extremidade 3' do cDNA codificador de EGFP.

Essa estratégia de clonagem evita que GFP seja clivada de PrPc quando o mesmo sofre as modificações pós-traducionais, especificamente a clivagem dos peptídeos sinais de endereçamento na extremidade amino ou de adição de âncora de GPI na extremidade carboxila.

O plasmídeo foi purificado e seqüenciado usando os seguintes iniciadores: 5'-AGT GAA CCG TCA GAT CCG CT-3' e 5'-AAC AGC TCC TCG CCC TTG CT-3', 5'-AAG TCC GGA CTC AGA TCT CG-3' e 5'-TAC AAA TGT GGT ATG GCT GA-3'.

Mutantes de deleções de GFP-PrPc

Os cDNAs de dois mutantes de deleção da região N-terminal (PrP Δ 32-121 e PrP Δ 32-134) foram amplificados a partir do DNA de camundongos transgênicos que expressam PrPc mutantes com estas deleções (Shmerling e cols., 1998; camundongos gentilmente doados por Drs. C. Weismann e H. Kretzschmar) usando os mesmos iniciadores mencionados acima. Os produtos de PCR foram purificados e clonados utilizando o sítio de enzimas de restrição Eco RI e Bam HI do vetor pEGFP-C1 que já contem o cDNA codificador do peptídeo sinal de PrPc (códon 1 a 22).

Os cDNAs de PrPc (códon 23 a 231) de camundongos com deleções na região 51-90 e 105-128 tinham sido clonados no vetor de pRSET A (Invitrogen) para expressão em bactérias (Lopes MH e cols.; projeto de mestrado). No entanto, como essas construções não possuíam o sítio de adição de âncora de GPI nem o peptídeo sinal de endereçamento, o que é necessário para expressão em células de mamíferos, os cDNAs de PrPc inseridos neste vetor foram amplificados por PCR utilizando os iniciadores 5'-CAG AAT TCT AAA AAG CGG CCA AAG C-3' e 5'-AGA GAA TTC TCA GCT GGA TCT TCT CC CGT C-3'. O produto de PCR foi digerido com as enzimas de restrição EcoR I e Asp700 que digere a região do códon 173 de PrPc. Após a digestão, os fragmentos que contem as deleções foram purificados e clonados no vetor de GFP-PrPc digerido com as enzimas de restrição Eco RI e Asp700 (Figura 2). Assim, aproveitamos as construções já existentes com as deleções desejadas,

substituindo a parte normal de PrPc (a.a.23-173) da construção de GFP-PrPc por cDNA com deleções derivadas do vetor pRSET A.

O mutante de deleção de resíduos de aminoácidos 144 a 173 foi construído amplificando as seqüências de cDNA que codifica a.a. 23 a 144 e a.a. 173 a 254 separadamente utilizando seguintes iniciadores: 5' CAG AAT TCT AAA AAG CGG CCA AAG C 3' e 5' GTG CAC AAA CCA GTC GTT GCC 3' para primeira parte e 5' AAT GAC TGG TTC GTG CAT GAC 3' e 5' CAG GAT CCA CCC ACG ATC AGG AAG ATG 3' para segunda parte. As duas partes foram ligadas pela reação de extensão que consiste basicamente numa reação de polimerase onde cada parte funciona como iniciadora e molde entre si. O cDNA de PrPc, já com a deleção de a.a. 144-173, foi amplificado novamente utilizando os iniciadores 5' CAG AAT TCT AAA AAG CGG CCA AAG C 3' e 5' CAG GAT CCA CCC ACG ATC AGG AAG ATG 3 e clonado no pEGFP-C1 contendo o peptídeo sinal de PrPc.

O mutante de deleção de de aminoácido 173 a 180 foi gerado por outro membro do grupo (Lopes MH) utilizando as mesmas estratégias citadas acima.

Para construir o mutante de deleção dupla (GFP-PrP Δ 51-90/105-128), digerimos o vetor GFP-PrP Δ 51-90 com as enzimas de restrição *EcoR* I e *Kpn* I (digere na região de códon 95) e o inserto liberado foi clonado no vetor GFP-PrP Δ 105-128 digerido com as mesmas enzimas de restrição (Figura 2).

Todas as construções foram seqüenciadas para verificar sua integridade.

permite a maior variabilidade de marcação múltipla dos componentes celulares. Para a construção desta proteína recombinante, os cDNAs de peptídeo sinal de PrPc murino (aminoácidos 1 a 22) e região codificadora de aminoácido 23 a 254 foram amplificados separadamente por reação de PCR utilizando os seguintes iniciadores: 5'-CCA CCG TAT CAG TCA TCA TGG CGA ACC T-3' e 5'-GAC TGA TGT AGG CCT CTG CTT ACC GGT TT-3' para o segmento de peptídeo sinal e 5'- GAG GGA TCC AAA AAG CGG CCA AAG-3' e 5'-CAT CTT CCT GAT CGT GGG TGG ATC CTG-3' para a região de aminoácidos de 23 a 254. O vetor pDsRed-C1 da Clontech e o produto de PCR do peptídeo sinal foram digeridos com a enzima de restrição Age I a 25°C por 16 horas e o cDNA do peptídeo sinal foi clonado no sítio de Age I de vetor pDsRed-C1, na extremidade N-terminal de RFP. O cDNA correspondente aos resíduos de aminoácidos de 23 a 254 de PrPc de camundongos, digeridos com as enzimas de restrição BamH I a 37°C por 16 horas, foi clonado na extremidade C-terminal de RFP do vetor pDsRed-C1 contendo o cDNA de peptídeo sinal. Os produtos clonados foram seqüenciados para confirmar sua integridade.

Rab5 Q79L

O vetor de expressão de mutante de Rab5 na forma constantemente ativa foi doado por Prof. Marc G Caron do Departamento de Biologia Celular (Duke University e Howard Hughes Medical Institute).

3.11 Transfecção dos plasmídeos

No dia anterior a transfecção, $5,5 \times 10^4$ células da linhagem SN56 foram semeadas na lamínula de 2,2cm x 2,2cm e mantidas dentro da placa de petri de diâmetro 35mm em DMEM com 10% de soro fetal bovino. A transfecção foi realizada utilizando 1 µg de DNA e 2,5 µl de lipofectamina 2000 (Invitrogen) para cada lamínula, seguindo o procedimento fornecido pelos fabricantes. Após 4 horas, o meio de transfecção foi removido e as células foram diferenciadas na presença de 1mM de dibutilil cAMP durante dois dias. Após 48 horas de transfecção, a distribuição da proteína recombinante foi observada através do sistema de microscopia confocal Bio-Rad MRC 1024 acoplado a um

microscópio Zeiss (Axiovert 100) com objetiva de imersão em água (40X, 1,2 NA) com auxílio de programa Lasersharp 3.0. O laser de argônio UV (488nm) foi usado para excitação das amostras e a fluorescência emitida foi selecionada utilizando filtro 522/35. Para co-transfecção dos plasmídeos de GFP-PrPc e de mutantes de Rab5 Q79L, 1 µg de cada DNA e 5 µl de lipofectamina 2000 foram utilizados seguindo o mesmo procedimento de transfecção.

3.12 Preparação de extrato total de células SN56

Extratos de SN56 transfectadas com GFP-PrPc ou com RFP-PrPc foram preparados por homogeneização das células em PBS (NaCl 137 mM; KCl 3 mM; Na₂HPO₄ 8 mM; KH₂PO₄ 1,4 mM; pH 7.4) contendo 5mM EGTA, 1% NP-40 e inibidor de protease ("complete protease inhibitor tablets"; Boehringer Mannheim, na concentração recomendada pelo fabricante). Fragmentos celulares foram removidos por centrifugação (5,000 xg por 10min). Proteínas do extrato (30 a 40µg) foram fracionadas em gel de 10% (SDS-PAGE).

3.13 " Western Blot"

As proteínas fracionadas em gel de poli-acrilamida foram transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana de nitrocelulose foi incubada com 5% de leite Molico em PBS contendo 0.1% de Tween-20 por uma hora na temperatura ambiente seguida dos anticorpos primários por três horas. Os anticorpos foram utilizados nas seguintes diluições: anti-PrPc (1:1000), anti-GFP (1:500), anti-SNAP25 (1:10.000) e anti-actina (1:200). Após a incubação com anticorpos primários, procedeu-se a lavagem por três vezes de 10 minutos com PBS contendo 0.1% de Tween-20. A seguir foi realizada uma incubação com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:10000). Para anti-actina, foi utilizado anti-IgG de coelho como secundário na mesma diluição. Depois de três lavagens, a reação foi revelada usando-se o kit ECL conforme a instrução do fabricante (Amersham Life Science) e exposição de um filme à membrana.

3.14 Tratamento com PiPLC (Phospholipase C, Phosphatidylinositol-specific)

Para verificar se GFP-PrPc está associado à membrana plasmática por âncora de GPI, tratamos as células com 1U/ml de PiPLC (Sigma) por 90 min a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com HBSS (NaCl 137 mM, KCl 4 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 2 mM, glicose 10 mM, HEPES 25 mM). As células foram mantidas em HBSS com 1U de PiPLC durante a aquisição de imagem na microscopia confocal. As células de controle foram submetidas aos mesmos tratamentos porém sem a enzima PiPLC.

3.15 Marcação de Organelas

Complexo de Golgi

Ceramidas são compostos essenciais para formação de esfingolípídios e seu metabolismo ocorre principalmente no complexo de Golgi e retículo endoplasmático. A biosíntese de esfingomielina nas células de mamíferos ocorre quando a fosfocolina é transferida a partir de glicerofosfocolina para ceramida. Essa reação é catalisada pela enzima esfingomielina sintetase na membrana do complexo de Golgi. Portanto, o análogo fluorescente da ceramida, Bodipy FL C₅-Ceramida, foi utilizado como marcadores de complexo de Golgi (Haugland e cols., 1996).

As lamínulas que contém as células marcadas com Bodipy-FL C₅ - ceramida foram transferidas para câmara de perfusão e as células foram mantidas em HBSS durante a aquisição das imagens pelo sistema de microscopia confocal. Foi utilizado o laser kriptônio/argônio (488nm e 568nm) para excitar os corantes Bodipy-FL e RFP respectivamente e filtros 522/35 e 598/40 para selecionar as fluorescência emitida.

Organelas endocíticas

Corante fluorescente FM4-64 é uma molécula orgânica bastante utilizada para estudos de reciclagem de vesículas sinápticas e de endocitoses. Esses corantes possuem uma característica interessante que apresentam a fluorescência somente quando inseridos nas membranas lipídicas. Assim, a inserção do corante na membrana plasmática permite o monitoramento do tráfego da mesma nas células vivas (Haugland e cols., 1996).

Desta forma, as células transfectadas com GFP-PrPc foram incubadas com 8 a 16 µM de corante FM4-64 em meio de diferenciação por 15 a 30 minutos a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com HBSS e foram observadas pelo sistema de microscopia confocal. Foi utilizado o laser kriptônio/argônio (488nm e 568nm) para excitar os corantes GFP e FM4-64 respectivamente e filtros 522/35 e 680/32 para selecionar as fluorescências emitidas.

Endossomos de reciclagem

Transferrina é a glicoproteína de soro responsável pelo transporte de íon Fe^{3+} e quando está associado com Fe^{3+} sofre a endocitose mediada por um receptor específico. Dentro do compartimento intracelular o íon Fe^{3+} é dissociado da transferrina devido ao pH ácido e tanto a transferrina e como o receptor é reciclado para a membrana plasmática (Haugland e cols., 1996). Assim, para caracterizar melhor os compartimentos onde PrPc está presente, a transferrina conjugada com corante fluorescente, Texas Red foi utilizada. Após 48 horas da transfecção, as células foram lavadas com DMEM desprovido de soro. Uma hora depois, as células foram incubadas com 20 a 30 $\mu\text{g/ml}$ de Transferrina conjugada com Texas Red por 20 minutos a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS gelado e fixadas com a solução de 3% de p-formaldeído em PBS por 20 minutos. A distribuição dos endossomos de reciclagem marcados com Transferrina-Texas Red foi observada no sistema de microscopia confocal e comparada com a distribuição intracelular de GFP-PrPc. Foi utilizado o laser kriptônio/argônio (488nm e 568nm) para excitar os corantes GFP e Texas Red respectivamente e filtros 522/35 e 598/40 para selecionar a fluorescência emitida.

3.16 Imunofluorescência

As células semeadas sobre as lamínulas de vidro foram lavadas duas vezes com tampão de fosfato (PB, 0.1M, pH 7.4) e fixadas com a solução de 3% de p-formaldeído em 0.1M de PB por 20 minutos. Após a fixação, as células foram lavadas uma vez com PB 0.1M e duas vezes com TBS 0.1M (Tris-buffered saline; Tris 100mM; NaCl 150mM pH 7.4) e incubadas com anticorpo anti-PrPc diluído 1:500 em TBS contendo 1% de soro normal de cabra e 0.1 % de Triton X-100 por 16h a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com TBS e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com FITC por 40 min a temperatura ambiente. As células foram então, lavadas três vezes com TBS e as lamínulas de vidro foram montadas sobre a lâmina de vidro com auxílio de solução de Hydromount

(National Diagnostics). Foi utilizado o laser de argônio UV (488nm) para excitar a preparação e filtro 522/35 para selecionar a fluorescência emitida.

3.17 Ensaio de internalização de GFP-PrPc.

As células transfectadas com GFP-PrPc, GFP-PrP Δ 32-121 ou com GFP-PrP Δ 32-134 foram perfundidas com MEM (Minimal Essential Medium) sem corante “phenol Red”. Após a obtenção da primeira imagem (0 min) de um campo fixo, MEM com ou sem íons Cu²⁺ (100 e 500 μ M) foi perfundida e as imagens posteriores do mesmo campo foram adquiridas em 5, 15 e 30 min após o início da perfusão. As imagens adquiridas foram analisadas com auxílio de “software” Metamorph (Universal Imaging) quantificando a intensidade da fluorescência da região da membrana plasmática e da região perinuclear delimitada manualmente. Os valores da intensidade da fluorescência da região perinuclear ($INR_{x\ min}$) e da membrana plasmática ($IPM_{x\ min}$) foram transformados em porcentagem ($\%NR_{x\ min}$ ou $\%PM_{x\ min}$) em relação ao valor da intensidade da fluorescência total da célula ($IT_{x\ min}$) medida na imagem do tempo correspondente ($x\ min$, onde x é 0, 5, 15, ou 30 min). A variação da intensidade da fluorescência de cada compartimento celular foi normalizada ($NNR_{x\ min}$ ou $NPM_{x\ min}$) em relação à imagem do tempo 0 min ($\%NR_{0\ min}$ ou $\%PM_{0\ min}$).

$$\%NR_{x\ min} = \frac{INR_{x\ min}}{IT_{x\ min}} \times 100 \qquad \%PM_{x\ min} = \frac{IPM_{x\ min}}{IT_{x\ min}} \times 100$$

$$NNR_{x\ min} = \frac{\%NR_{x\ min}}{\%NR_{0\ min}} \qquad NPM_{x\ min} = \frac{\%PM_{x\ min}}{\%PM_{0\ min}}$$

Para analisar a distribuição da fluorescência dos diferentes mutantes, foi realizado o mesmo procedimento de análise, calculando a porcentagem da fluorescência da membrana plasmática ($\%PM_{0\ min}$) e da região perinuclear ($\%NR_{0\ min}$) de cada célula transfectada. Após a análise de cada células, construímos uma curva acumulativa para cada população de células que expressam diferentes mutantes, sendo que a abscissa é representada pela

porcentagem da fluorescência da membrana plasmática ou da região perinuclear e a ordenada, pelo valor da frequência acumulada do número de células. Em seguida, para avaliar se as curvas são significativamente diferentes entre si, utilizamos a estatística de Kolmogorov-Smirnov (D_{K-S}) (Press e cols., 1986; Kushmerick e cols., 1999).

4. Resultados

4.1 Caracterização dos genes regulados pela interação de PrPc –receptor (STI1) ou diferencialmente expressos entre animais normais e “knockout” para PrPc.

Estes experimentos foram realizados no início deste trabalho, portanto STI 1 não havia sido identificada como o ligante ou receptor de PrPc. Desta forma, o peptídeo complementar a PrPc, que mimetiza o sítio de interação de PrPc ao receptor (Martins e cols., 1997) foi a ferramenta usada nesta abordagem.

Numa primeira tentativa de identificar genes regulados pela interação PrPc – receptor (STI 1), neurônios da cultura primária de hipocampo de ratos e de camundongos normais ou deletados para o gene de PrPc foram tratados com o peptídeo complementar 80 μ M por vários tempos diferentes. RNA total extraído a partir dessas células foi utilizado para os experimentos de DDRT-PCR. Os principais genes que apresentaram a expressão diferencial no autoradiograma de DDRT-PCR estão mostrados na tabela –1.

Tabela 1: Bandas de cDNAs diferencialmente expressos no gel de DDRT-PCR.

Homologia	Perfil de bandas observadas no autoradiograma de DDRT-PCR
<ul style="list-style-type: none">• proteína Gi2α• β-globina• Cu-Zn superóxido dismutase• fosfoproteína ribossomal ácida• proteína ribossomal S11• histona H3.3A• receptor de manose• “TATA box binding protein”	Expressão diminuída nas células de rato ou de camundongos normais com o tratamento com o peptídeo complementar
<ul style="list-style-type: none">• GTPase Cdc42• Subunidade I de citocromo oxidase mitocondrial	Expressão aumentada nas células de rato ou de camundongos normais com o tratamento com o peptídeo complementar
<ul style="list-style-type: none">• Proteína associada a integrina (IAP)• α-sinucleína• Cul-2 ,	Mais expresso nas células de camundongos normais comparados aos “knockout” de PrPc

Apesar do enorme trabalho gerado nesta primeira abordagem, os ensaios de “northern blot” realizados para cada cDNA clonado não confirmaram os dados de DDRT-PCR sendo que nenhum dos genes citados acima teve sua expressão significativamente regulada pelo tratamento com o peptídeo complementar (dados não mostrados).

Numa segunda abordagem experimental, tivemos a idéia de identificar os genes diferencialmente expressos entre os camundongos normais e “knockout” de PrPc e para isso, procedemos DDRT-PCR com RNAs provenientes de baço e de cérebro de animais adultos e de embriões. O autoradiograma de DDRT-PCR está mostrado na figura 3. A partir desse gel, foram obtidos 5 clones com a expressão diferente entre estes animais e que apresentavam homologia com os genes já conhecidos conforme mostrado na tabela-2.

Tabela-2: Clones com a expressão diferencial em tecidos de animais normais ou “knockout” de PrPc.

Clone	Homologia	Perfil de bandas observadas no autoradiograma
158A2	Proteína associada a sinaptossoma (SNAP25)	Mais expresso no hipocampo de animal adulto “knockout” para PrPc
158A4	“Transforming acidic coiled-coil containing protein”	Mais expresso no baço de animal adulto “knockout” para PrPc
158A5	“kinesin-like protein”	Mais expresso no hipocampo de animal normal adulto
158C1	Proteína CRIPT	Mais expresso no hipocampo de embrião de animal “knockout” para PrPc
158C4	Proteína pMEM2	Mais expresso no hipocampo de animal adulto “knockout” para PrPc

Entre esses clones, o único que apresentou o mesmo perfil de expressão de DDRT-PCR no ensaio northern blot foi o clone de SNAP25 (figura 3, seta 158A2 e figura 4). Este gene mostrou-se mais expresso no hipocampo de animais adultos “knockout” de PrPc.

Figura-3: Autoradiograma de DDRT-PCR. Os produtos do DDRT-PCR realizado com os iniciadores ancorados $T_{12}VA$ e $T_{12}VC$ e iniciador aleatório 13 foram fracionados em gel de poliacrilamida. Foram utilizados baços do animal normal adulto (1) e do animal "knockout" para PrPc (2), hipocampo de animal normal adulto (3) e do animal "knockout" para PrPc (4) e hipocampo de embrião de animal normal (5) e de embrião de animal "knockout" para PrPc (6). As reações de PCR foram realizadas em duplicatas e RNA total tratado com DNaseI foi usado como controle negativo da reação (7). As setas indicam as bandas dos genes diferencialmente expressos.

Figura-4: RNA total foi extraído a partir do hipocampo de embriões normais (WT) e “knockout” para PrPc (PrP0/0) e de camundongos adultos normais (WT) e “knockout” para PrPc (PrP0/0). Dez microgramas de cada RNA foram fracionados em gel de agarose, transferidos para membrana de nylon e hibridizados com a sonda de SNAP25. GAPDH foi utilizado como controle de quantidade de RNA total aplicado em cada poço. O gráfico de barras mostra os valores relativos da expressão de SNAP25 normalizados pelos valores densitométricos de GAPDH.

Em seguida, para verificar a expressão protéica de SNAP25, realizamos os ensaios de “western blot” utilizando o extrato total ou preparação de sinaptossomas de hipocampus de camundongos normais e “knockout” de PrPc de idades diferentes. Vários ensaios mostraram que a expressão protéica de SNAP25 não é alterada nos animais “knockout” de PrPc. A figura 5 mostra um ensaio representativo.

Esses resultados sugerem que a quantidade de mRNA expresso não apresenta uma correlação com a concentração da proteína. Para confirmar esses dados, realizamos um segundo ensaio de “northern blot” e “western blot” utilizando RNA e proteínas extraídas a partir de um mesmo animal que foi diferente do utilizado nos experimentos de DDRT-PCR e de “Northern blot”. Inesperadamente, não observamos uma diferença significativa na concentração de mRNA de SNAP25 entre os animais normais e “knockout” de PrPc (Figura 6 A). Além disso, ambos os animais apresentaram uma

concentração similar da proteína SNAP 25 como foi verificado anteriormente (figura 6 B).

Figura-5: **A** - Extratos totais de hipocampo de Embrião de 18 dias (E18), de pós-natal de 8 dias (P8), de 16 dias (P16) e de adultos de 2 meses (2 meses) foram fracionados em SDS-PAGE 12% e o ensaio de "western blot" foi realizado utilizando anticorpos anti-SNAP25. Anticorpo anti-PrPc foi utilizado como o controle dos animais utilizados. **B** - O mesmo procedimento de A foi usado para preparação de sinaptossomas de neurônios de hipocampo de camundongos adultos (2 meses) normais (WT) e "knockout" de PrP (0/0)

Desta forma, podemos sugerir que a expressão de SNAP25 não é alterada nos animais "knockout" de PrPc. Os RNAs usados no DDRT-PCR e no primeiro ensaio de "northern blot" é o mesmo e, portanto, geraram o mesmo padrão de expressão, isto é aumento de SNAP25 em animais "knockout". Este dado entretanto, não foi reproduzido no segundo experimento, sugerindo que existe uma variabilidade na expressão de SNAP25 de animal para animal.

Esta primeira abordagem do trabalho mostrou, que a técnica de DDRT-PCR pode gerar um grande número de dados falso positivos. Isto impediu que conseguíssemos dados importantes com relação à expressão gênica modulada pela interação de PrPc-receptor ou pela retirada de PrPc do sistema.

Figura - 6: **A** RNA foi extraído a partir do hipocampo de camundongo normal (WT) ou “knockout” de PrPc (0/0). Dez microgramas de cada RNA foram fracionados em gel de agarose, transferidos para membrana de nylon e hibridizados com a sonda de SNAP25. GAPDH foi utilizado como controle da quantidade de RNA total aplicado em cada poço.

B- Proteínas extraídas a partir do hipocampo de camundongo normal (WT) ou “knockout” de PrPc (0/0) foram fracionadas em SDS-PAGE 12% e o ensaio de “western blot” foi realizado com anticorpo anti-SNAP25. Anticorpo anti-actina foi utilizado como controle da quantidade de proteína total aplicada em cada poço.

4.2 Regulação da expressão de PrPc

O gene de PrPc é considerado um “housekeeping”, uma vez que sua expressão não varia em diferentes condições (Oesch e cols., 1985; Chesebro e cols., 1985). Participando de um trabalho de doutorado de uma outra aluna do grupo, mostramos que a expressão de PrPc pode ser modulada pela estrutura de cromatina (Cabral e cols., 2002).

Um outro aspecto que nos intrigava era a capacidade do agente convulsivante, ácido caínico, degradar a laminina (Chen e Strickland, 1997), uma vez que este é um ligante muito importante de PrPc para os processos de plasticidade neuronal (Graner e cols., 2000a e b). Desta forma, avaliamos como a expressão de PrPc era regulada frente ao tratamento dos animais com ácido caínico. Observamos que o tratamento dos animais com esta droga leva a um aumento de aproximadamente 1.5 vezes após 30 minutos e 2.5 vezes em 60 minutos tanto do mRNA (figura 7) quanto de proteína de PrPc (figura 8), indicando portanto, que na eventual degradação de seu ligante laminina por ácido caínico, a síntese de PrPc pode aumentar.

Figura- 7: A Foi preparado RNA total de hipocampus de camundongos normais (WT) ou “knockout” (0/0) tratados com 5mg de ácido caínico / kg de massa corporal por 30 minutos (30min), 60 minutos (60min) ou com PBS (salina) por 60 minutos. RNA foi fracionado em gel de agarose 1% e o ensaio de “northern blot” foi realizado usando-se as sondas de cDNA de PrPc e de GAPDH.

B- Os autorradiogramas foram densitometrados. Os valores da intensidade das bandas de PrPc foram normalizados pelos valores densitométricos de GAPDH.

Figura- 8: **A** Foi preparado extrato total de hipocampus de camundongos normais (WT) ou "knockout" (0/0) tratados com 5mg de ácido caínico / kg de massa corporal por 30minutos (30min), 60 minutos (60min) ou com PBS (salina) por 60 minutos. Proteínas foram fracionados em SDS-PAGE 12% e o ensaio de "western blot" foi realizado usando-se anticorpos anti-PrPc e anti-actina.

B- Os autoradiogramas foram densitometrados. Os valores da intensidade das bandas de PrPc foram normalizados pelos valores densitométricos de actina.

4.3 Sinalização da interação PrPc-laminina

4.3.1 Sinalização de cálcio mediada por peptídeo $\gamma 1$ da laminina nas células SN56

A interação entre PrPc e a laminina está intimamente relacionada com a diferenciação e a manutenção dos neuritos (Graner e cols., 2000a e b) assim como a sinalização por cálcio como foi mencionado na introdução. Desta forma, foi investigado o padrão de sinalização de cálcio desencadeada pelo peptídeo da cadeia $\gamma 1$ da laminina (peptídeo $\gamma 1$), que é o domínio ligante de PrPc. Para isso, foram utilizadas as células SN56 marcadas com Fluo – 3 AM e a variação da fluorescência de cada célula foi observada por microscopia confocal.

A figura 9A mostra um campo representativo das células marcadas com Fluo-3AM e tratadas com a solução de peptídeo $\gamma 1$ (40 μ g/ml) na presença de cálcio extracelular. O padrão da variação da intensidade da fluorescência de uma célula representativa está mostrado na figura 9B. Pode-se observar que a primeira perfusão de peptídeo $\gamma 1$ aumenta rapidamente a concentração de cálcio intracelular e mesmo na presença contínua de peptídeo $\gamma 1$, a concentração de cálcio volta à concentração basal rapidamente. Além disso, as células ficam dessensibilizadas frente a segunda perfusão do peptídeo $\gamma 1$. A perfusão de HBSS com KCl 60mM serviu como controle positivo de cada experimento na verificação do sistema de perfusão e o estado das células. Nas condições normais, a perfusão da solução de KCl 60mM aumenta a concentração de cálcio intracelular rapidamente, pois a alta concentração de K^+ no meio extracelular despolariza a membrana plasmática ativando os canais de cálcio sensíveis à voltagem. Este aumento é muito variado dependendo do estado das células e a eficiência de captação do corante Fluo-3AM.

Figura –9: A sinalização de Ca^{2+} mediada por peptídeo $\gamma 1$ na presença de Ca^{2+} extracelular. **A** - As células SN56 foram marcadas com fluo-3 AM e tratadas com as soluções de peptídeo $\gamma 1$ e HBSS com KCl 60mM. **B** - O gráfico mostra a variação de fluorescência de uma célula representativa ao longo do experimento.

Para verificar se o aumento da concentração de cálcio intracelular com o tratamento do peptídeo $\gamma 1$ é inteiramente dependente do cálcio extracelular ou não, a solução de HBSS sem CaCl_2 , contendo EDTA 5mM foi utilizada como o meio extracelular. A figura 10 mostra que mesmo na ausência de cálcio no meio extracelular, as células respondem ao peptídeo $\gamma 1$, sugerindo que o estoque de cálcio do retículo endoplasmático participa neste evento. Por outro lado, observamos que em geral, na ausência de cálcio extracelular, o aumento da concentração de cálcio intracelular induzido pelo peptídeo $\gamma 1$ é menor que o observado quando há Ca^{2+} extracelular, sugerindo que o recrutamento de cálcio para esta sinalização é dependente do cálcio intra e extracelular (comparar a intensidade dos picos de tratamento com o peptídeo $\gamma 1$ nas figuras 9 e 10). No entanto, isto deve ser confirmado pelo uso de indicadores de cálcio que permitem a medida quantitativa de concentração de cálcio intracelular.

Com o objetivo de demonstrar que essa sinalização é específica do peptídeo $\gamma 1$, uma solução de um peptídeo que possui a mesma composição de aminoácidos do peptídeo $\gamma 1$, porém ordenados numa sequência diferente (peptídeo “scrambled” de $\gamma 1$), foi perfundida nas células SN56. Pode-se observar que o peptídeo “scrambled” não foi capaz de transduzir sinal sendo que as mesmas células foram capazes de responder ao estímulo do peptídeo $\gamma 1$ e do KCl (figura 11). Portanto, esses resultados demonstram que essa sinalização de cálcio observadas nas células SN56 é mediada especificamente pelo peptídeo da cadeia $\gamma 1$ de laminina.

Figura-10: A sinalização de Ca^{2+} mediada por peptídeo $\gamma 1$ na ausência de Ca^{2+} extracelular. As células SN56 foram marcadas com fluo-3AM e tratadas com o peptídeo $\gamma 1$ na ausência de cálcio extracelular. O gráfico mostra a variação de fluorescência de uma célula representativa ao longo do experimento.

Figura-11: Ausência de sinalização mediada por peptídeo "scrambled" $\gamma 1$. Para confirmar a especificidade da sinalização desencadeada pelo peptídeo $\gamma 1$, foi feito uma perfusão de peptídeo "scrambled" $\gamma 1$ seguida de peptídeo $\gamma 1$ nas células SN56 marcadas com fluo 3 AM. O gráfico mostra a variação de fluorescência de uma célula representativa ao longo do experimento.

4.3.2 Sinalização de cálcio desencadeada pela interação PrPc– laminina

Apesar das fortes evidências de que PrPc é o único ligante do peptídeo da cadeia $\gamma 1$ da laminina, realizamos outros experimentos na tentativa de mostrar que a sinalização de cálcio mediada por peptídeo $\gamma 1$ é dependente de PrPc. Utilizamos células de cultura primária derivadas de hipocampo de embriões de 18 dias de camundongos normais e “knockout” de PrPc. Na figura 12, estão apresentadas as curvas padrão de variação da fluorescência de células individuais *versus* tempo. O intervalo de perfusão do peptídeo $\gamma 1$ está representado por uma linha acima das curvas. Podemos observar que durante a perfusão do peptídeo $\gamma 1$, a intensidade da fluorescência é aumentada transitoriamente nas células de camundongos normais e não nas células de animais “knockout” de PrPc. No final de cada experimento, HBSS com alta concentração de KCl foi perfundida para verificar a viabilidade de células.

Figura-12: Os gráficos mostram a variação da concentração de cálcio intracelular de células individuais *versus* tempo. A linha representa o intervalo de perfusão do peptídeo $\gamma 1$ (0,08 mg/ml) e a seta indica o tempo em que foi adicionada a solução de KCl 60mM. As curvas em azul representam a variação de células normais (WT) e as rosas, de células “knockout” de PrPc (O/O).

Considerando como células responsivas somente aquelas que apresentaram um aumento de pelo menos 25% da fluorescência em relação à

basal tanto na perfusão de peptídeos como na perfusão de solução de KCl 60 mM, pode-se observar que uma maior porcentagem das células de camundongos normais (42%) responderam ao peptídeo $\gamma 1$ comparado com as células de “knockout” de PrPc (12%). Além disso, foi observado que uma pequena porcentagem das células normais e de “knockout” de PrPc responderam ao peptídeo “scrambled”, o que acreditamos ser apenas variações basais ou inespecíficas (figura 13). Portanto, esses resultados confirmam que a transdução de sinal de cálcio desencadeada por peptídeo $\gamma 1$ é mediada por PrPc.

Figura-13: Porcentagem das células que responderam ao tratamento com os peptídeos. A porcentagem das células responsivas foi calculada considerando somente as células que apresentaram aumento de 25% na perfusão dos peptídeos e de HBSS com KCl 60mM. * indica que o valor das células normais (wt) tratadas com o peptídeo $\gamma 1$ é significativamente diferente de wt tratadas com o peptídeo scrambled ($p < 0,005$). # indica que o valor de wt tratadas com o peptídeo $\gamma 1$ é significativamente diferente das células de “knockout” de PrPc (0/0) tratadas com o peptídeo $\gamma 1$ ($p < 0,02$).

4.4 Biologia celular de PrPc

4.4.1 Caracterização da proteína de fusão GFP-PrPc

O vetor de expressão de GFP-PrPc foi construído como descrito em material e métodos. Para verificar a expressão e o peso molecular aparente desta proteína recombinante, as células SN56 foram transfectadas com vetor GFP-PrPc e o extrato total dessas células foi preparado e submetido a um ensaio de “western blot” utilizando anticorpos anti-PrPc ou anti-GFP. Ambos os anticorpos reconheceram uma proteína de aproximadamente 60 kDa no extrato total das células transfectadas (figura 14, canaletas 2 e 3) e não, no extrato total das células não transfectadas (figura 14, canaletas 5 e 6). O peso molecular apresentado pela proteína recombinante, 60 kDa, corresponde a 27 kDa de GFP e 33-35 kDa de PrPc. O anticorpo anti-GFP reconheceu inespecificamente uma proteína de 56 kDa tanto nas células transfectadas como nas não transfectadas (figura 14, canaleta 3 e 6). O anticorpo anti-PrPc reconheceu também o PrPc endógeno de 33 a 35 kDa em ambos os extratos (figura 14, canaletas 2 e 5). Também foram detectadas duas bandas com peso molecular maior que 33-35 kDa que poderiam ser isoformas diferentes de PrPc ainda não descritas na literatura (figura 14, canaleta 2 e 5). O soro irrelevante não reconheceu bandas nos extratos das células transfectadas ou não (figura 14, canaletas 1 e 4).

Em seguida, para caracterizar a localização de GFP-PrPc, várias células transfectadas com GFP-PrPc foram observadas e analisadas por microscopia confocal. A figura 15 A–F apresenta várias fatias ópticas de uma célula representativa transfectada com GFP-PrPc. A reconstrução dessas fatias ópticas mostra claramente que a proteína recombinante está presente na membrana plasmática, nos neuritos e em uma região perinuclear (figura 15G). Essa localização de GFP-PrPc é bastante semelhante a da proteína endógena observada por imunofluorescência (comparar figura 15G com 15M). Quando a proteína recombinante GFP contendo somente o peptídeo sinal de PrPc (aminoácido 1 a 22) foi expressa nas células SN56, observou-se uma marcação homogênea do citosol (figura 15I). Além disso, foi visto que a

proteína GFP-PrPc que não possui o peptídeo sinal no N-terminal de GFP é retida nos compartimentos intracelulares (figura 15K) e que a morfologia desses compartimentos intracelulares é completamente diferente daqueles marcados por GFP-PrPc com peptídeo sinal ou por PrPc endógeno (comparar 15G e 15M com 15K) sugerindo que tanto o peptídeo sinal como as seqüências de PrPc são importantes para o endereçamento correto da proteína.

Figura-14: Células SN56 foram transfectadas transitoriamente com GFP-PrPc e o extrato total foi preparado a partir das células transfectadas ou não. O ensaio de "western blot" foi realizado utilizando os anticorpos anti-PrPc, anti-GFP ou soro normal. ← indica a proteína recombinante e ▼ indica as proteínas endógenas.

Figura-15: **A-F** – Imagens das fatias ópticas da célula transfectada com GFP-PrPc. **G**- Reconstrução das fatias ópticas da mesma célula representada em a-f. **I**- Reconstrução das fatias ópticas de uma célula transfectada com a proteína recombinante que contém somente o peptídeo sinal de PrPc ligado a GFP. **K**- Reconstrução das fatias ópticas de uma célula transfectada com GFP-PrPc sem o peptídeo sinal de PrPc. **H, J, L, N**- imagens de luz transmitida das respectivas células. Barra = 20 μ m.

Como foi mencionado na introdução, as mutações na molécula de PrPc podem provocar a produção de PrPc transmembrânico (Hegde e cols., 1998). Portanto é importante verificar se a inserção de uma proteína relativamente grande como GFP (27 kDa) entre peptídeo sinal e o restante da molécula de PrPc pode causar ou não danos no processo de modificação pós-traducional. Para isso, as células transfectadas foram tratadas com a enzima PiPLC. O tratamento das células com PiPLC resultou na diminuição da intensidade da fluorescência na membrana plasmática (figura 16B) enquanto que as células controles que sofreram o mesmo processo de tratamento, porém sem a enzima PiPLC, mantiveram a mesma intensidade da fluorescência na membrana plasmática (figura 16A) sugerindo que o GFP-PrPc foi corretamente processado e que está associado a membrana plasmática por âncora de GPI.

Figura-16: As células transfectadas com GFP-PrPc foram incubadas a 4°C por 90 minutos na presença (B) ou na ausência (A) de PiPLC (1U/ml). As duas imagens foram adquiridas com os mesmos parâmetros de microscopia confocal. As setas indicam as células transfectadas. C e D representam as imagens de luz transmitida das respectivas células. Barra = 20μm.

4.4.2 Caracterização da distribuição e do tráfego celular de PrPc

Seguindo o mesmo método de clonagem de GFP-PrPc, foi construída a proteína recombinante RFP-PrPc, prion celular fluorescente vermelha. A variabilidade das duas cores de proteína recombinante de PrPc permite uma maior opção na escolha dos marcadores específicos para avaliar sua distribuição nas organelas celulares. A figura 17 mostra que a proteína recombinante RFP-PrPc é reconhecida por anticorpo anti-PrPc (figura 17 A) e que apresenta uma localização similar ao GFP-PrPc e PrPc endógeno (comparar a figura 17B, vermelho com a figura 15 G e M).

Sabe-se que o complexo de Golgi é a primeira organela para onde a molécula recém-sintetizada de PrPc é direcionada. Portanto, na tentativa de determinar a natureza das organelas intracelulares onde PrPc está localizada, as células transfectadas com RFP-PrPc foram incubadas com o marcador de complexo de Golgi de Bodipy FL-C₅ Ceramida. Foi observada uma co-localização entre a fluorescência de Bodipy FL-C₅ Ceramida (figura 17b, verde)

e de RFP-PrPc (figura 17b vermelha) na região perinuclear, sugerindo que esta região compreende o complexo de Golgi.

Figura 17: *A* Proteínas do extrato de células SN56 transfectadas ou não com RFP-PrPc foram separadas eletroforéticamente em SDS-PAGE 10% e o ensaio de “western blot” foi realizado com anticorpos anti-PrPc. *B* As células transfectadas com RFP-PrPc (vermelho) foram incubadas com marcador de Golgi, Bodipy FL C⁵-ceramida (verde). Na imagem sobreposta, observa-se que a fluorescência de RFP-PrPc colocaliza com a de Bodipy FL C⁵-ceramida.

Entretanto, os dados da literatura sugerem que o PrPc recicla constitutivamente entre a membrana plasmática e organelas endocíticas (Shyng e cols., 1993). Desta forma, seria importante confirmar se a região perinuclear marcada por GFP-PrPc abrange também os endossomos. Para isso, foi utilizado o marcador de compartimentos endocíticos FM4-64 nas células transfectadas com GFP-PrPc. Na figura 18, podemos observar que a fluorescência de GFP-PrPc (verde) colocaliza com a fluorescência de FM4-64 (vermelho) na região perinuclear (imagem sobreposta) confirmando a presença de GFP-PrPc em organelas endocíticas. Portanto, a marcação na região perinuclear deve conter tanto o complexo de Golgi como endossomos.

Figura-18: Célula transfectada com GFP-PrPc (verde) foram incubadas com marcador de compartimentos endocíticos FM4-64 (vermelho) por 30 minutos a 37°C e analisadas por microscopia confocal. A imagem sobreposta mostra uma co-localização das fluorescências na região perinuclear. Barra = 20µm.

O receptor da transferrina é uma das proteínas clássicas que segue a via endocítica mediada por clatrina sendo reciclado constantemente. Assim, a transferrina conjugada com um corante fluorescente está sendo amplamente utilizada como o marcador de endossomos de reciclagem. Neste trabalho, foi utilizada transferrina conjugada com Texas Red como marcador de endossomos de reciclagem. Pode-se observar que as organelas marcadas com transferrina – Texas Red (figura 19 A) são marcadas parcialmente com GFP-PrPc (figura 19 B) mostrando uma co-localização parcial das duas fluorescências na região perinuclear (figura 19 C). Esses resultados sugerem que PrPc pode compartilhar a mesma via endocítica que o receptor da transferrina trafegando pelos endossomos de reciclagem.

Figura-19: Células SN56 transfectadas com GFP-PrPc (B) foram incubadas com Transferrina – Texas Red (A) por 20 minutos a 37°C. Observa-se uma colocação das fluorescências na região perinuclear na imagem sobreposta (C). D- imagem de luz transmitida. Barra = 20µm.

Segundo as vias clássicas de endocitose, para que uma proteína da membrana plasmática seja transportada para os endossomos de reciclagem, é necessária sua passagem por endossomos iniciais. Entretanto, dificilmente observamos a presença de organelas próximas à membrana plasmática marcadas por GFP-PrPc. Isto sugere que PrPc possui uma via de endocitose diferente não descrita ainda ou que a passagem deste nos endossomos iniciais é um processo rápido que é dificilmente detectado. Para elucidar melhor esta questão, realizamos a co-transfecção de GFP-PrPc e Rab5 Q79L. O Rab5 Q79L é um mutante de Rab 5 constantemente ativo que promove a fusão e a formação de endossomos iniciais. Desta forma, o transporte de proteínas para endossomos de reciclagem é retardado e os endossomos iniciais adquirem um tamanho maior, facilitando sua observação. Na figura 20, pode-se observar a presença de várias organelas grandes marcadas por GFP-PrPc próximas à membrana plasmática, sugerindo então que o PrPc segue uma via clássica de endocitose, passando por endossomos iniciais, Rab5 positivos.

Figura 20: Células SN56 foram co-transfectadas com GFP-PrPc e Rab5 Q79L. As organelas localizadas próximas à membrana plasmática foram marcadas por GFP-PrPc sugerindo que PrPc possui uma via clássica de endocitose.

Desta forma, os resultados obtidos até então indicam que PrPc trafega do complexo de Golgi para membrana plasmática, de onde vai ser endocitada para endossomos iniciais e posteriormente para os endossomos de reciclagem.

4.4.3 Internalização de GFP-PrPc

Na tentativa de validar definitivamente o uso de GFP-PrPc nos estudos de tráfego de PrPc, foi verificado se GFP-PrPc é uma proteína funcional ou não com base nos dados da literatura, os quais demonstraram que a endocitose de PrPc é estimulada na presença de íon Cu^{2+} (Pauly e Harris, 1998). Assim, as células que expressam GFP-PrPc foram tratadas com MEM contendo 100 ou 500 μM de Cu^{2+} . Foi observado que ocorre uma diminuição da intensidade da fluorescência na membrana plasmática e um aumento na região perinuclear ao longo do tempo de tratamento (figura 21 A), enquanto que as células controles que foram tratadas somente com MEM não apresentaram uma variação significativa na distribuição da fluorescência nos compartimentos celulares (figura 21 C). Estes dados indicaram portanto, que a proteína recombinante GFP-PrPc apresenta um comportamento similar a PrPc endógeno .

Foi conduzido ainda um experimento controle para confirmar que o efeito do íon Cu^{2+} é dado pela porção PrPc e não sobre a fluorescência de GFP da proteína de fusão GFP-PrPc. MEM com Cu^{2+} foi perfundido em células transfectadas com os mutantes de deleção do N-terminal de PrPc (GFP-PrPc $\Delta 32-121$ e GFP-PrPc $\Delta 32-134$), os quais não possuem o sítio de ligação de Cu^{2+} (aminoácidos 50 a 90). A intensidade da fluorescência de várias células transfectadas com estes mutantes foi analisada e comparada com a proteína normal ao longo do tratamento com MEM contendo Cu^{2+} ou não. Como observado na figura 21 podemos notar que o tratamento com cobre nas células transfectadas com GFP-PrPc leva a diminuição da fluorescência na membrana plasmática que é acompanhada por seu aumento na região perinuclear. Por outro lado, não observamos uma mudança significativa na distribuição das proteínas mutantes entre a membrana plasmática e a região perinuclear durante 30 minutos de tratamento com a solução de cobre (Figura 22). Esses dados indicam fortemente que GFP-PrPc é uma proteína recombinante funcional e poderá ser usada nos estudos de internalização de PrPc.

Figura-21: As células SN56 foram transfectadas com GFP-PrPc. As imagens das células foram adquiridas por microscopia confocal em 0, 5, 15 e 30 minutos após a perfusão com MEM contendo 500 μM de Cu^{2+} (A) ou não (C). (B) e (D) são as imagens de luz transmitida das respectivas células. Barra = 20 μm .

Figura 22: Internalização de GFP-PrPc, GFP-PrPc Δ32-121 e GFP-PrPc Δ32-134 na presença de Cu^{2+} . Os gráficos representam a variação da fluorescência na membrana plasmática e na região perinuclear durante a perfusão. As barras representam o erro padrão. ○ - células transfectadas com GFP-PrPc e tratadas somente com MEM (n=23). ● - células transfectadas com GFP-PrPc e tratadas com MEM contendo 500μM de Cu^{2+} (n=20). □ - células transfectadas com GFP-PrPc Δ32-121 e tratadas somente com MEM (n=10). ■ - células transfectadas com GFP-PrPc Δ32-121 e tratadas com MEM contendo 500μM de Cu^{2+} (n=9). △ - células transfectadas com GFP-PrPc Δ32-134 e tratadas somente com MEM (n=17). ▲ - células transfectadas com GFP-PrPc Δ32-134 e tratadas com MEM contendo 500μM de Cu^{2+} (n=22).

4.4.4 Mapeamento dos domínios de PrPc responsáveis por sua localização e tráfego.

Visto que GFP-PrPc é uma proteína funcional e que pode ser utilizada nos estudos de tráfego de PrPc, a próxima etapa do trabalho foi determinar os domínios responsáveis pela localização e a trajetória tomada por PrPc. Inicialmente, foram utilizados os mutantes de deleção da região N-terminal de PrPc (GFP-PrPc Δ32-121 e GFP-PrPc Δ32-134), uma vez que camundongos “knockout” que expressam o transgene que codifica essas proteínas truncadas, apresentam ataxia e morte neuronal na camada granular do cerebelo (Shmerling, 1998). Os mecanismos envolvidos com este fenótipo não foram avaliados. Assim, na tentativa de explorar sua distribuição celular, essas proteínas truncadas foram expressas nas células SN56. Primeiramente, foi observado que esses mutantes de deleção do domínio N-terminal possuem a mesma localização de GFP-PrPc estando presentes na membrana plasmática

e na região perinuclear. Contudo, uma maior quantidade de fluorescência foi encontrada na membrana plasmática em contrapartida a uma diminuição deste na região perinuclear quando comparada com aquelas mostradas por GFP-PrPc (figura 23 A, B e C). A intensidade da fluorescência da membrana plasmática e da região perinuclear de várias células expressando GFP-PrPc ou os mutantes GFP-PrPc Δ 32-121 e GFP-PrPc Δ 32-134 foram quantificadas. Os dados numéricos foram utilizados para construir a curva de frequência acumulada *versus* porcentagem da fluorescência em cada compartimento celular. A abscissa representa a porcentagem da fluorescência da membrana plasmática (figura 23D) ou da região perinuclear (figura 23E) e a ordenada corresponde à porcentagem acumulada do número de células utilizado na análise. A figura 23D mostra que as curvas dos mutantes estão deslocadas mais à direita em relação à curva da proteína normal, indicando que as células transfectadas com os mutantes apresentam maior intensidade da fluorescência na membrana plasmática que as células que expressam a proteína normal. Em contrapartida, na figura 23E, pode-se observar que as curvas das proteínas mutantes estão localizadas à esquerda da curva de GFP-PrPc sugerindo que os mutantes estão em menor quantidade na região perinuclear em relação à proteína GFP-PrPc. Esses resultados sugerem que apesar dos mutantes GFP-PrPc Δ 32-121 e Δ 32-134 serem corretamente endereçados para a membrana plasmática e para região perinuclear, a falta do domínio de N-terminal pode resultar numa deficiência na endocitose constitutiva o que leva a um acúmulo das proteínas na membrana plasmática.

A região deletada do mutante de N-terminal abrange pelo menos dois domínios importantes para funções fisiológicas de PrPc: o domínio de 'octarepeat' (a.a. 51- 90) que se liga a 4 íons de cobre e a região neurotóxica (a.a. 105-128) que é a região mais conservada entre as espécies e que liga a STI 1 (Zanata e cols., 2002) e a vitronectina (Hajj e cols, submetido). Como foi mencionado na Introdução, existem fortes evidências que ambos os domínios poderiam participar na internalização de PrPc. Portanto, para delimitar melhor o domínio responsável pela deficiência de endocitose constitutiva causado pela deleção do domínio N-terminal, construímos outros mutantes com deleções

menores que compreendem estas duas regiões: GFP-PrP $\Delta 51-90$ e GFP-PrP $\Delta 105-128$

Figura-23: As imagens das células transfectadas com GFP-PrPc (A), GFP-PrPc $\Delta 32-121$ (B) e GP-PrPc $\Delta 32-134$ (C) foram pseudo-coloridas de acordo com a intensidade da fluorescência e a escala da intensidade está representada na barra vertical localizada a esquerda da figura (A). As ordenadas dos gráficos representam a porcentagem acumulada das células e a abscissa corresponde à porcentagem da fluorescência da membrana plasmática (D) ou da região perinuclear (E). ○ - GFP-PrPc (n=50). □ - GFP-PrPc $\Delta 32-121$ (n=20). △ - GFP-PrPc $\Delta 32-134$ (n=34). A diferença da distribuição celular encontrada entre GFP-PrPc e os mutantes de deleção do domínio N-terminal foi significativa ($p < 0,02$ calculado por D_{k-s}).

As imagens das células SN56 transfectadas com os mutantes de deleções menores foram adquiridas usando microscopia confocal e a intensidade da fluorescência da membrana plasmática e da região perinuclear de cada célula transfectada foi medida. A distribuição celular desses mutantes foi comparada com a da proteína normal e com o mutante de deleção de 32-134. A figura 24 mostra que os mutantes com deleção no sítio de ligação a cobre (50-90) e da região neurotóxica (105-128) possuem uma distribuição celular similar a PrPc normal e diferente do mutante de N-terminal (Δ 32-134). A quantificação desta fluorescência pode ser vista nos gráficos 1, 2, 3 e 4 (figura 24).

Esses resultados sugerem que cada domínio citado acima poderia participar na internalização de PrPc por vias independentes. Assim, na ausência de um dos domínios, o segundo seria capaz de suprir a falta do outro e portanto, cada mutante (GFP-PrP Δ 51-90 e GFP-PrP Δ 105-128) poderia apresentar uma distribuição similar a do selvagem. Outra possibilidade é que os aminoácidos 32 a 49 e 91 a 104 seriam mais relevantes para a endocitose de PrPc.

Para elucidar melhor esta questão, um mutante de deleção dupla foi construído pela retirada dos domínios de ligação de Cu^{2+} e a região neurotóxica ao mesmo tempo. O mutante de deleção dupla foi expresso nas células SN56 e a sua distribuição celular foi analisada medindo a intensidade de fluorescência na membrana plasmática e no compartimento intracelular. O padrão da distribuição da fluorescência desse mutante foi comparado com o da molécula selvagem e do mutante de deleção do domínio N-terminal Δ 32-134. Foram analisadas 88 células transfectadas com GFP-PrPc (WT), 116 de GFP-PrP Δ 51-90/105-128 (CuNt) e 106 de GFP-PrP Δ 32-134 (F). As imagens representativas de células transfectadas com as respectivas construções estão mostradas na figura 25. Pode-se observar que a proteína selvagem está mais concentrada nos compartimentos intracelulares do que na membrana plasmática enquanto que os dois mutantes apresentam a maior intensidade da fluorescência na membrana plasmática. No entanto, se os dois mutantes forem comparados, observa-se que o GFP-PrP Δ 51-90/105-128 possui uma intensidade da fluorescência maior no

compartimento intracelular e menor na membrana plasmática do que GFP-PrP $\Delta 32-134$.

Figura-24: Células SN56 transfectadas com GFP-PrPc e os respectivos mutantes. As imagens representativas foram pseudocoloridas de acordo a escala de cinza para facilitar a visualização das diferenças entre cada construção. Os gráficos representam as curvas de freqüências acumuladas. Abscissa - % de fluorescência na região perinuclear (1 e 2) ou na membrana plasmática (3 e 4) em relação à fluorescência total da célula. Ordenada - % das células que apresentam determinada proporção de fluorescência ao correspondente na abscissa.

Figura-25: Imagens representativas das células SN56 transfectadas com GFP-PrPc (WT), GFP-PrPc $\Delta 51-90/105-128$ (CuNt) ou GFP-PrPc $\Delta 32-134$ (F). As imagens foram pseudocoloridas de acordo com a intensidade da fluorescência na escala de cinza. Este procedimento facilita a visualização das diferenças da distribuição constitutiva de cada construção.

A análise da intensidade da fluorescência de todas as células está mostrada na forma de gráfico de frequências acumuladas (Figura 26). Na figura 26 A, pode-se observar que a curva das células transfectadas com GFP-PrP $\Delta 51-90/105-128$ (CuNt) está mais deslocada para direita em relação à curva de GFP-PrPc (WT), indicando que este mutante em geral é mais acumulado na membrana plasmática do que a molécula selvagem. Por outro lado, a curva deste mutante está mais para esquerda que a de GFP-PrP $\Delta 32-134$, sugerindo que GFP-PrP $\Delta 51-90/105-128$ pode ser mais internalizado que o mutante GFP-PrP $\Delta 32-134$ (figura 26 A). Ao contrário na membrana plasmática, as células transfectadas com GFP-PrP $\Delta 32-134$ (F) apresentam menor fluorescência na região perinuclear que GFP-PrP $\Delta 51-90/105-128$ (CuNt) e este por sua vez, menor que o GFP-PrPc (WT) (Figura 26 B). Apesar deste experimento ser bastante reprodutível, para validar estes dados, aplicamos o método estatístico de Kolmogorov – Smirnov ($p = 0,03$) e confirmamos que a diferença observada na distribuição celular de cada construção é significativa indicando que os domínios de ligação ao cobre e a região neurotóxica estão envolvidos na internalização de PrPc. No entanto, como a deleção destas regiões não mimetiza totalmente a deleção da região N-terminal ($\Delta 32-134$), é possível que outras regiões contidas neste domínio também participem do processo da internalização.

Figura-26: A intensidade da fluorescência da membrana plasmática (A) e do compartimento perinuclear (B) de cada célula foi medida. Os valores obtidos foram normalizados pela intensidade total das células e utilizados para construir curvas de frequências acumuladas.

Abscissa - % de fluorescência na membrana plasmática (A) ou na região perinuclear (B) em relação à fluorescência total da célula.

Ordenada - % acumulada do número das células

Para análise estatística, foi usado o método de Kolmogorov – Smirnov (D_{k-s}) $p = 0,03$.

Alguns outros domínios de PrPc localizados na porção mais C-terminal da molécula e que possuem atividade biológica também foram avaliados. É de particular interesse do grupo o sítio de PrPc que liga a laminina e que está entre os resíduos de aminoácidos 173 a 180. Assim, construímos o mutante GFP-PrPc $\Delta 173-180$ e expressamos nas células SN56 para caracterizar a sua localização. Na figura 27, pode-se observar que esse mutante possui uma compartimentalização bastante diferente do GFP-PrPc e dos outros mutantes mostrados anteriormente. Este mutante é encontrado no citosol e não é observado na superfície celular. Além disso, parece haver um acúmulo preferencial numa região perinuclear. Esse resultado mostra que a deleção do domínio de aminoácidos 173 a 180 causa uma mudança brusca na distribuição celular de PrPc, principalmente no processo de endereçamento das proteínas para membrana plasmática.

Figura 27: Distribuição de GFP – PrPc $\Delta 173-180$. Células SN56 foram transfectadas com GFP-PrPc $\Delta 173-180$ e observadas em microscopia confocal após a 48 horas de transfecção.

Recentemente, foi mostrado que o receptor de laminina de 67 kDa está envolvido na internalização de PrPc (Gauczynsky e cols., 2001). Esta proteína liga-se aos aminoácidos 144 a 173 de PrPc que está contido também na região C-terminal da molécula, uma região que contem estruturas de α -hélice. Desta forma, avaliamos a função deste domínio na distribuição celular de PrPc expressando o mutante GFP-PrPc $\Delta 144-173$ nas células SN56. Pode-se observar que a distribuição celular desse mutante é semelhante à de GFP-PrPc $\Delta 173-180$ sendo que a maior parte da fluorescência é concentrada em compartimentos intracelulares e que uma parte dela é distribuída uniformemente no citosol (Figura 28 A). Para verificar se esses compartimentos intracelulares preferencialmente marcados por esses mutantes são as organelas endocíticas ou não, as células transfectadas com GFP-PrPc $\Delta 144-173$ foram incubadas com FM4-64 (Figura 28 A e B). A sobreposição das imagens mostra o baixo grau de colocalização entre as fluorescências de GFP-PrPc $\Delta 144-173$ e do corante FM4-64 (Figura 28 C). Esse resultado sugere que a localização de GFP-PrPc $\Delta 144-173$ não está

associada a endossomos. Para melhor avaliação desta distribuição, outros marcadores de compartimentos celulares devem ser usados

Figura-28: A – Imagem representativa das células transfectadas com GFP-PrPc $\Delta 144-173$ (A). Para verificar a natureza do compartimento intracelular marcado com GFP-PrPc $\Delta 144-173$ (A), incubamos as células com marcador de endossomos FM 4 – 64 (B). A sobreposição das duas imagens mostra baixo grau de colocalização (C). (D) representa a imagem de luz transmitida.

5. Discussão

5.1 Caracterização dos genes regulados pela interação de PrPc –receptor (STI1) ou diferencialmente expressos entre animais normais e “knockout” para PrPc

Com a necessidade de identificar os genes regulados pelas interações caracterizadas pelo grupo, decidimos utilizar a técnica de DDRT-PCR. Esta técnica permite a visualização da composição de mRNA das células em bandas de cDNA, além do seqüenciamento rápido dessas bandas, que podem ser clonadas e utilizadas como sondas para “Northern blot” ou “Southern blot”. Portanto, esta metodologia apresenta uma vantagem em relação à hibridização diferencial por ser mais sensível e rápida na obtenção dos resultados finais (Liang e Pardee, 1992). Entretanto, nossos experimentos de DDRT-PCR não foram bem sucedidos gerando muitos clones falso positivos, o que já tinha sido mencionado na literatura (Liang e cols, 1995).

Um aspecto importante que deve ser lembrado é que na época em que se iniciou o presente trabalho, não havia sido determinada a identidade da proteína receptora de PrPc. No entanto, como o peptídeo complementar apresentava atividade biológica (Martins e cols., 1997), este foi utilizado em vários experimentos realizados pelo grupo. Posteriormente, quando identificamos a proteína STI 1 como o receptor ou ligante de PrPc, descobrimos que o peptídeo real de STI 1 desencadeia os mesmos efeitos em relação a sinalização e a neuroproteção que o peptídeo complementar, entretanto necessita-se uma dose cem vezes maior do último peptídeo para que se tenha o mesmo efeito biológico de STI 1 (Chiarini e cols., 2002; Zanata e cols., 2002). As concentrações de peptídeo complementar usadas nos experimentos realizados neste trabalho estão dentro da dose que desencadeia resposta biológica. Portanto, o uso do peptídeo complementar no lugar do peptídeo de STI 1 não deve ter colaborado para o insucesso dos resultados obtidos.

Por outro lado, podemos pensar que quanto maior for o número de genes recuperados a partir do gel de DDRT-PCR, maior a chance de encontrar

o gene diferencialmente expresso confirmado por “northern blot”. No entanto, nestes experimentos, foram recuperadas poucas bandas diferentes por gel. Isto sugere que a interação de PrPc com o peptídeo complementar regula a expressão de poucos genes ou que os genes regulados estão fora do limite de detecção desta técnica. Desta forma, estes fatores podem ter contribuído para o insucesso desta abordagem.

Os animais utilizados nestes experimentos possuem um “background” genético misto, uma vez que eles foram gerados a partir de um cruzamento de linhagens diferentes, SV129 e C57. Isso pode contribuir para a variabilidade da expressão gênica entre animais. Assim, podemos sugerir que a maior expressão de SNAP25, observada no camundongo “knockout” de PrPc utilizado no experimento de DDRT-PCR (figura 3) e no primeiro ensaio de “Northern blot” (figura 4), seria uma característica específica daquele animal e independente de PrPc.

Desta forma, a abordagem de DDRT-PCR que era mais factível no início deste trabalho, não se mostrou adequada e sensível para detectar os genes regulados pela sinalização resultante da interação PrPc – receptor ou aqueles modulados pela retirada de PrPc das células. Uma opção mais recente, mas que ainda oferece limitações é a técnica de cDNA microarray.

5.2 Regulação da expressão de PrPc

Sabendo que o PrPc participa do mecanismo de replicação de PrPsc, o estudo da regulação da expressão de PrPc pode gerar informações importantes a respeito do controle da infecção. Vários experimentos foram realizados na literatura na tentativa de regular a expressão de PrPc (Saeki e cols., 1996; Doetzlhofer e cols, 1999). Recentemente, mostramos que a única droga eficiente neste controle é tricostatina A, um inibidor de histona deacetilase, que leva a desorganização da cromatina e a exposição de elementos de resposta a fatores de transcrição na região promotora do gene (Yoshida e cols., 1990). Um fato interessante é que apesar da droga aumentar a expressão de mRNA de PrPc em aproximadamente 10 vezes, a quantidade da proteína aumenta apenas 2 a 3 vezes (Cabral e cols., 2002). No presente

trabalho, mostramos que o ácido caínico é capaz de modular positivamente a expressão do mRNA e da proteína PrPc. Este efeito ocorre após 30 minutos de tratamento e portanto, é bastante rápido para envolver a transcrição do gene. Especulamos que o mecanismo deva envolver o aumento da estabilidade do mRNA.

Mostramos que PrPc participa dos processos de neuroproteção junto com STI1 (Chiarini e cols, 2002; Zanata e cols, 2002) e sabe-se que os animais “knockout” de PrPc são mais sensíveis à agentes convulsivantes (Walz e cols., 1999). Alguns estudos mostraram que o PrPc possui a atividade enzimática similar a Superóxido dismutase 1 (SOD-1) propiciando a resistência celular ao estresse oxidativo (Brown e cols., 1999) e que PrPc é uma proteína anti-apoptótica (Kuwahara e cols., 1999; Bounhar e cols., 2001). Portanto, o aumento de PrPc pode ser um efeito protetor contra a toxicidade do ácido caínico.

Além disso, uma das propostas feitas na literatura é que o ácido caínico degrada a laminina através da indução de plasmina (Chen e Strickland, 1997) e o nosso grupo mostrou que PrPc interage especificamente com a laminina contribuindo para plasticidade neuronal (Graner e cols., 2000a e b). Assim, podemos sugerir ainda que o aumento da expressão de PrPc seria um mecanismo de compensar a perda do ligante (laminina), pelo aumento de seu receptor celular (PrPc).

5.3 Sinalização de cálcio desencadeada pela interação PrPc – laminina

Nos últimos anos, o nosso grupo tem mostrado o importante papel da interação de PrPc com a laminina na neuritogênese (Graner e cols., 2000a e b) e na formação de memória de curta e de longa duração (Coitinho e cols., submetido). Sabemos ainda que a sinalização de cálcio é um evento importante nos processos neuronais e que as células de animais “knockout” de PrPc apresentam alteração na homeostase de cálcio (Herms e cols., 2000). Tendo essas evidências, nesta parte do trabalho, estudamos o padrão de sinalização de cálcio desencadeado pela interação de PrPc com a laminina.

A laminina é uma macromolécula de aproximadamente 900 kDa que está envolvida na adesão, migração e diferenciação dos neurônios. Os principais receptores celulares que desencadeiam os sinais gerados pela laminina são as integrinas que são heterodímeros compostos por subunidades α e β (Powell e Kleinman, 1997), porém, existem outras proteínas que fazem o papel de receptor de laminina, tais como, LBP 110 (Laminin binding protein 110kDa; Kleinman e cols., 1991) e o receptor de 32/67 kDa (Laurie e cols., 1991). Cada integrina ou proteínas que foram identificadas como o receptor de laminina interage em sítios diferentes da laminina transduzindo sinais para diferentes processos neuronais (Tomaselli e cols., 1990; Choi e cols., 1994; Nomizu e cols., 1997). Entretanto, não foi descrito nenhum receptor que liga ao mesmo domínio de laminina, onde PrPc se liga: o decapeptídeo (RNIAEIIKDI) da cadeia $\gamma 1$. Estes dados são confirmados pelo fato de que anticorpos anti-PrPc inibirem totalmente o crescimento de neuritos sobre o peptídeo $\gamma 1$ da laminina (Graner e cols., 2000a). É importante ressaltar que o peptídeo $\gamma 1$ é capaz de ligar-se a PrPc assim como a molécula inteira de laminina (Lopes, dissertação de mestrado). Desta forma, o uso de peptídeo do domínio carboxi-terminal da cadeia $\gamma 1$ de laminina nos experimentos de medida de cálcio intracelular garante uma resposta celular mais específica.

Os resultados gerados neste trabalho mostram que o peptídeo $\gamma 1$ provoca um aumento rápido e transitório de cálcio intracelular nas células SN56 e nos neurônios derivados de hipocampus de embriões de camundongos normais, sendo que a resposta decresce rapidamente mesmo na presença contínua de peptídeo $\gamma 1$. Este padrão de resposta é bastante semelhante ao da sinalização de cálcio associada aos fenômenos fisiológicos que controlam a ativação de proteína quinases, a regulação de transcrição, a motilidade e a morfologia neuronal (Gu e Spitzer, 1997). Além disso, esta resposta foi específica para o peptídeo $\gamma 1$, pois o tratamento com o peptídeo “scrambled” $\gamma 1$ não foi capaz de alterar a concentração de cálcio intracelular.

Como o PrPc é único ligante deste domínio descrito até o momento, podemos sugerir que a resposta gerada pelo tratamento com o peptídeo $\gamma 1$ nas

células SN56 é mediada por PrPc da superfície celular. Apesar disso, confirmamos esta hipótese usando as culturas primárias derivadas de camundongos normais e “knockout” de PrPc. Foi observado que o peptídeo $\gamma 1$ gera o mesmo padrão de sinais nas células de animais normais e nas células SN56 enquanto que as células “knockout” de PrPc não foram capazes de responder ao tratamento com o peptídeo $\gamma 1$. Assim, esses resultados indicam que o peptídeo $\gamma 1$ em solução mimetiza a laminina desencadeando uma sinalização fisiológica através da molécula de PrPc.

Outro aspecto interessante destes resultados é a porcentagem dos neurônios hipocâmpais derivados de animais normais que responderam ao peptídeo $\gamma 1$. Pode-se observar que em torno de 40% das células responderam ao peptídeo $\gamma 1$. Quando as mesmas células foram semeadas sobre o peptídeo $\gamma 1$ adsorvido na placa de cultura, apenas 30 a 40 % delas emitiram neuritos em 12 a 16 horas (Graner e cols., 2000a). Portanto, a porcentagem de células que respondem ao peptídeo $\gamma 1$ é semelhante à das células que emitem neuritos sobre o mesmo substrato. Assim, poderíamos especular que a sinalização de cálcio mediada pela interação PrPc – laminina pode estar intimamente relacionada com o estágio de desenvolvimento de cada neurônio ou ainda que a sinalização por cálcio pode induzir o processo de neuritogênese. De fato, foi mostrado que a expressão de diferentes tipos de canais de cálcio varia com o desenvolvimento (Scholz e Miller, 1995) e que as culturas mantidas por mais tempo (mais diferenciadas) apresentaram a maior porcentagem de resposta ao estímulo (Zhukareva e cols., 1997).

Kristensson e colaboradores mostraram que a bradicinina provoca um aumento de cálcio intracelular nas células N2a e no cérebro de hamster usando fontes de cálcio intra e extracelular. No entanto, a infecção por prion reduz esta resposta bloqueando tanto o influxo como o efluxo de cálcio (Kristensson e cols., 1993). Este achado sugere que o PrPc participa tanto no recrutamento de cálcio a partir de estoques intracelulares como do meio extracelular. Apesar de que os nossos dados são mais qualitativos, geralmente, observamos uma diferença nas intensidades do aumento da concentração de cálcio induzido por

peptídeo $\gamma 1$ na presença e na ausência de cálcio extracelular sugerindo que esta sinalização mediada pela interação PrPc – laminina depende das fontes intra e extracelular. Este fato deverá ser confirmado pelo uso de indicadores de cálcio que permitem calcular a concentração exata de cálcio intracelular.

Recentemente, foi mostrado que as células granulares do cerebelo de camundongos “knockout” para PrPc apresentam menor concentração de cálcio intracelular livre respondendo com a menor intensidade à despolarização da membrana plasmática (Herms e cols., 2000). Além disso, vários estudos mostraram que a infecção por prion modifica as respostas celulares de cálcio (Kristensson e cols., 1993; Wong e cols., 1996). Desta forma, os dados da literatura mostram que a falta de PrPc ora pela modificação genética ora pela infecção por prion altera a homeostase de cálcio intracelular indicando que PrPc é uma molécula importante para sinalização de cálcio. Os nossos resultados sugerem que a laminina pode ser uma das moléculas mediadoras que usam PrPc na superfície celular para gerar a sinalização por cálcio.

Tendo essas evidências, a ausência de resposta à segunda perfusão de peptídeo $\gamma 1$ nas células SN56 procedida dentro de 10 minutos torna-se uma questão interessante que ainda deve ser abordada. PrPc demora aproximadamente 60 minutos para uma reciclagem completa saindo da membrana plasmática e voltando à superfície celular (Shyng e cols., 1993). Assim, podemos associar a ausência da resposta na segunda perfusão do peptídeo $\gamma 1$ com a internalização de PrPc ou ainda com sua inativação transitória na superfície. O uso de proteínas recombinantes, GFP-PrPc ou RFP-PrPc, associadas ao marcador de cálcio seria uma estratégia que permitiria responder esta questão.

Além disso, o nosso grupo mapeou o domínio de ligação de laminina na molécula de PrPc entre os resíduos dos aminoácidos 173 a 180. Assim, uma das abordagens deste trabalho era expressar GFP-PrPc nas células “knockout” de PrPc na tentativa de restaurar a capacidade das células responderem ao peptídeo $\gamma 1$ enquanto que a expressão do mutante de deleção GFP-PrPc $\Delta 173$ -180 não deveria mudar o comportamento dessas células. Isto poderia confirmar mais uma vez que a sinalização de cálcio desencadeada pelo tratamento com

o peptídeo $\gamma 1$ é devida a interação de PrPc com a laminina. Infelizmente, o mutante GFP-PrPc $\Delta 173-180$ mostrou uma distribuição celular diferente do selvagem, onde quase não se observa a proteína na membrana plasmática (figura 27). Desta forma, este mutante não poderá ser usado neste tipo de abordagem.

5.4. GFP-PrPc: uma nova ferramenta para estudos de tráfego de PrPc

Sabemos que a conversão de PrPc para PrPsc ocorre durante o processo de internalização (Arnold e cols., 1995). Contudo, pouco se conhece da relação deste processo com as funções celulares de PrPc. Portanto, para investigar detalhadamente a internalização e o tráfego de PrPc, construímos a proteína recombinante GFP-PrPc.

Até recentemente, este tipo de estudo havia sido feito por métodos bioquímicos, tais como marcação de proteínas com radioisótopos, imunoprecipitação e ensaios de “western blot” (Shyng e cols., 1995; Pauly e Harris, 1998; Sumudhu e cols., 2001). Com a descoberta da proteína fluorescente verde GFP extraída a partir de água-viva e o desenvolvimento de microscopia confocal, a biologia celular tornou-se uma ferramenta potente nos estudos de tráfego das proteínas e de membranas lipídicas. A principal vantagem do método de biologia celular sobre os métodos bioquímicos é poder visualizar e monitorar as moléculas de interesse nas células vivas em tempo real sem passar por etapas de purificação ou por um método de detecção com anticorpos. Desta forma, um tempo relativamente longo deste projeto foi dedicado à produção e a caracterização da proteína recombinante GFP-PrPc.

Como a proteína PrPc sofre modificação pós-traducional tanto na extremidade N quanto C-terminal, a construção de GFP-PrPc necessita mais cuidado do que a de outras proteínas, para que o GFP não seja clivado junto com os peptídeos sinais. Desta forma, o GFP-PrPc foi construído colocando-se o GFP entre o peptídeo sinal (aminoácidos 1 a 22) e o restante da molécula de PrPc. Esta construção permite que o GFP continue ligado ao restante da molécula de PrPc sem interromper a sua sequência, mesmo após as modificações pós-traducionais (Lee e cols., 2001).

Simultaneamente com o nosso grupo, outros tiveram a idéia de construir GFP-PrPc. Assim, Negro e colaboradores construíram o GFP-PrPc bovino inserindo o GFP entre resíduos de aminoácidos 42 e 43 (Negro e cols., 2001) enquanto que o grupo do David Harris fez o GFP-PrPc murino inserindo o GFP no códon 223 de PrPc (Ivanova e cols., 2001) e mais recentemente, Lorenz e colaboradores construíram GFP-PrPc murino inserindo GFP entre códon 39 e 40 (Lorenz e cols., 2002). Pode-se notar que em todas as construções citadas acima, o GFP está inserido dentro da molécula de PrPc interrompendo a sua seqüência. Apesar disso, todos mostraram que as respectivas construções possuem comportamento similar ao de PrPc endógeno em relação localização, glicosilação, adição de ancora de GPI, solubilidade em detergente e sensibilidade frente à digestão com proteinase K (Negro e cols., 2001; Ivanova e cols., 2001; Lorenz e cols., 2002).

O nosso grupo também mostrou que o GFP-PrPc possui uma localização similar a da proteína PrPc endógena e que está associado a membrana plasmática por ancora de GPI. Além disso, mostramos que GFP-PrPc é uma proteína funcional sendo mais internalizada na presença de íons cobre (Lee e cols., 2001) e capaz de interagir com STI 1 recombinante (Zanata e cols., 2002). Este foi um dos resultados mais relevantes para validar a utilização de GFP-PrPc nos estudos de tráfego de PrPc. Portanto, no presente trabalho, foi gerada uma ferramenta muito importante e útil que permite monitorar o movimento de PrPc em células vivas.

5.5 Caracterização da distribuição e o tráfego celular de PrPc

Os dados gerados no presente trabalho mostram que o GFP-PrPc está presente na superfície celular e em compartimentos intracelulares assim como PrPc endógeno. A localização de PrPc em compartimentos intracelulares já tinha sido descrito por DeArmond e colaboradores em 1987 pela técnica de imuno-histoquímica (DeArmond e cols., 1987). Contudo, a natureza e a organização celular desses compartimentos intracelulares foi melhor caracterizada no nosso trabalho pelo uso de GFP-PrPc combinado com marcadores específicos de organelas. Esses resultados sugerem que GFP-

PrPc trafega entre o complexo de Golgi, membrana plasmática e endossomos que estão envolvidos nas vias clássicas de endocitose, tais como a do receptor de transferrina. No entanto, diferentemente do receptor da transferrina, a presença de GFP-PrPc nos endossomos inicial é detectada somente quando perturbamos a sua endocitose com o mutante de Rab 5 (Magalhães e cols., 2002).

Sabemos que existe uma discordância quanto ao mecanismo de internalização de PrPc, podendo esta ser internalizada tanto por vesículas encapadas por clatrina (Shyng e cols., 1995) como por domínios de caveola (Vey e cols., 1996). Os estudos realizados recentemente mostram que o processo de endocitose independente da clatrina utiliza organelas distintas daquelas clássicas (Nichols, 2002). Por outro lado, a dinamina que participa do processo inicial da internalização de PrPc, pode mediar tanto a internalização dependente como independente da clatrina (Herskovits e cols., 1993; Damke e cols., 1994; Henley e cols., 1998; Oh e cols., 1998). PrPc é uma proteína capaz de se ligar às várias moléculas por domínios diferentes e algumas dessas interações poderiam estar relacionadas com a sua endocitose. Assim, esses resultados sugerem que o processo inicial da internalização de PrPc passa por uma etapa complexa que pode envolver mais de um mecanismo (Figura 29).

Figura 29: Esquema de endocitose de PrPc. PrPc está representado por um polígono verde. As setas vermelhas indicam as vias de endocitose dependente da clatrina e as setas amarelas indicam as vias independentes da clatrina (figura gentilmente cedida pelo Dr. Marco A. Prado, ICB, UFMG).

5.6 Domínios responsáveis pela distribuição celular de PrPc

Como foi mencionado na introdução, os camundongos “knockout” de PrPc são resistentes à infecção por PrPsc (Büller e cols., 1993). Na tentativa de determinar os domínios da molécula envolvidos na propagação das doenças prionicas, foram construídos animais transgênicos que expressam PrPc com deleções da região de aminoácidos 32 a 80 ou 69 a 84. Foi observado que esses animais são capazes de ser infectados por PrPsc, apesar do tempo de incubação ter sido um pouco maior que nos animais normais (Fischer e cols., 1996). Por sua vez, Shmerling e colaboradores construíram vários animais transgênicos re-introduzindo o gene de PrPc com uma série de deleções nos camundongos “knockout” de PrPc (Shmerling e cols., 1998). Inesperadamente, verificaram que os animais com “background knockout” de PrPc que expressam PrPc transgênicos com deleções nos aminoácidos 32 a 121 ou 32 a 134 apresentaram sérios sintomas neurológicos como ataxia, dentro de dois a três meses de vida enquanto que os animais que possuem deleções menores ($\Delta 32-89$, $\Delta 32-93$, $\Delta 32-106$) desenvolveram-se normalmente (Shmerling e cols., 1998). Apesar dos autores deste trabalho mencionarem que estas proteínas truncadas são encontradas na membrana plasmática, decidimos estudar detalhadamente a localização e a distribuição celular

desses mutantes comparando-os com GFP-PrPc íntegro. Assim, verificamos que ambos os mutantes (GFP-PrPc $\Delta 32-121$ e GFP-PrPc $\Delta 32-134$) apresentam as mesmas características diferindo da proteína selvagem por acumularem-se mais na membrana plasmática e menos na região perinuclear (Lee e cols., 2001). Em 1995, Shyng e colaboradores mostraram que a deleção do domínio N-terminal da molécula de PrPc de galinha diminui a endocitose (Shyng e cols., 1995). Assim, os resultados do presente trabalho foram coerentes com os dados anteriores sugerindo que a porção N-terminal de PrPc murino também é importante para a internalização de PrPc e que a falta deste domínio pode causar defeitos na endocitose constitutiva.

De fato, a deleção do N-terminal inclui pelo menos dois domínios importantes que estão relacionados com a internalização de PrPc, a região de ligação ao íon cobre nos aminoácidos 51 a 90 que estimula a internalização de PrPc (Lee e cols., 2001, Pauly e Harris, 1998; Sumudhu e cols., 2001) e a região 114 a 129 de PrPc murino cuja ausência do sítio homólogo em PrPc de galinha diminui a endocitose de PrPc (Shyng e cols., 1995). Além disso, os aminoácidos 105 a 128 de PrPc compreendem a região mais conservada da molécula entre as espécies e contem os sítios de ligação a STI 1 e a vitronectina. Desta forma, para caracterizar melhor os domínios responsáveis pela internalização de PrPc, construímos os mutantes de deleção GFP-PrPc $\Delta 51-90$ e GFP-PrPc $\Delta 105-128$. Inesperadamente, os dois mutantes não apresentaram nenhuma alteração significativa na sua distribuição entre os compartimentos celulares.

Para verificar definitivamente se o domínio de ligação aos íons cobre e a região mais conservada participa ou não na endocitose de PrPc, geramos um mutante de PrPc com deleção dupla GFP-PrPc $\Delta 51-90/\Delta 105-128$. Esse mutante apresentou uma distribuição celular diferente de GFP-PrPc quando transfectado em células SN56, acumulando-se mais na membrana plasmática e menos na região perinuclear. No entanto, a diferença observada entre GFP-PrPc e o mutante de deleção dupla foi menor que a diferença encontrada entre GFP-PrPc e o mutante de deleção de N-terminal (32-134), mostrando que o GFP-PrPc $\Delta 51-90/\Delta 105-128$ possui um comportamento intermediário entre GFP-PrPc e GFP-PrPc $\Delta 32-134$ em termos de acúmulo da proteína na superfície.

Desta forma, vários domínios da porção N-terminal parecem contribuir na endocitose de PrPc num efeito somatório de tal forma que quando uma região pequena é deletada como nos casos de GFP-PrPc Δ 51-90 ou GFP-PrPc Δ 105-128, seu efeito é discreto e pode ser mascarado pelas endocitoses mediadas por outros domínios. Portanto, esses resultados sugerem que o sítio de ligação ao cobre e a região de aminoácidos mais conservados entre espécie estão envolvidos na internalização de PrPc, mas outros domínios da região N-terminal também devem participar deste evento.

De fato, foi mostrado recentemente que o glicosaminoglicano é capaz de ligar aos resíduos de aminoácidos 23 a 35 de PrPc e que essa interação resulta na redução de quantidade de PrPc na superfície celular (Pan e cols., 2002). Além disso, a mutação no aminoácido 101 de camundongos estimula a produção de uma proteína transmembrânica truncada que se acumula na superfície celular (Mishra e cols., 2002). Também foi mostrado que a proteína recombinante de PrPc humano contendo somente resíduos 91 a 231 possui alta afinidade pelo íon cobre mesmo na ausência de sítio de ligação deste íon (51 a 90) e que pelo menos dois aminoácidos 96 e 111 estão participando na coordenação de mais um íon cobre (Hasnain e cols., 2001).

Recentemente o nosso grupo identificou STI 1 como ligante de PrPc com a idéia inicial de procurar o receptor de PrPc que mediasse a sua internalização (Martins e cols., 1997; Zanata e cols., 2002). Apesar do presente trabalho ter mostrado que o domínio de ligação de STI 1 que está localizado nos resíduos 113-128 de PrPc participa parcialmente na internalização de PrPc, não foi obtida ainda uma prova definitiva do envolvimento de STI 1 na endocitose de PrPc. Elucidar esta questão será uma das tarefas futuras do nosso grupo.

Ao contrário dos mutantes de deleção dos domínios contidos na extremidade N-terminal, aqueles da região C-terminal, GFP-PrPc Δ 144-173 e GFP-PrPc Δ 173-180 apresentaram uma localização completamente diferente de GFP-PrPc. Esses mutantes não foram encontrados na membrana plasmática apresentando uma marcação intensa em compartimentos intracelulares e uma marcação difusa no citosol. Uma vez que PrPc é uma proteína da membrana plasmática, é evidente que o tráfego desta entre os compartimentos celulares deve ser efetuado dentro das

bicamadas lipídicas como foi mencionado na introdução. No entanto, recentemente, foi mostrado que o PrPc pode ser enviado para o citosol por transporte retrógrado e que este evento dá-se pelo processo normal de controle de qualidade das proteínas exercido pelas próprias células, degradando aquelas mal enoveladas ou ubiquitinadas (Ma e Lindquist, 2001). Assim, foi mostrado que a molécula de PrPc com mutação no resíduo de aminoácido 177 (substituição de aspartato por asparagina) acumula mais no citosol (Ma e Lindquist, 2001). Sabemos que a parte N-terminal da molécula de PrPc (aminoácidos 23 a 124) não possui uma estrutura bem definida enquanto que a região C-terminal é rica em estruturas α -hélices (Zahn e cols., 2000). Desta forma, as mutações já descritas na literatura que ocorrem na região C-terminal de PrPc apresentam mais possibilidade de causar um enovelamento errôneo da proteína, a qual será rejeitada pelo sistema de controle de qualidade (Ellgaard e cols., 1999), retida do retículo endoplasmático e endereçada para o citosol para posterior degradação em proteassomos (Ma e Lindquist, 2001). Por outro lado, o acúmulo dessas proteínas mal enoveladas no citosol pode causar a formação das moléculas de prion resistentes a protease e insolúvel em detergente (Ma e Lindquist, 2002). Este evento poderia explicar as doenças prionicas causadas por fatores hereditários ou esporádicos.

Em 2001, Gauczynski e colaboradores mostraram que o receptor (p67) de laminina seria também o receptor de PrPc e é responsável pela internalização deste (Gauczynski e cols., 2001). Entretanto, nossos dados mostram que a deleção do domínio de PrPc que interage com o receptor da laminina (aminoácidos 144-173) altera o seu endereçamento correto e não a sua internalização.

A internalização das proteínas ancoradas por GPI é um evento celular complicado, uma vez que estas não possuem os domínios citoplasmáticos que desencadeiam os sinais de internalização ou que interagem com as proteínas adaptadoras que medeiam a internalização. Nichols e colaboradores construíram uma proteína recombinante GFP que contém somente os sinais de adição de ancora de GPI com a finalidade de estudar o mecanismo da internalização de proteínas ancoradas por GPI. Este estudo mostrou que a GFP-GPI trafega entre a membrana plasmática e o complexo de Golgi sem passar por organelas clássicas, tais como endossomos iniciais e de reciclagem, sugerindo que esta é a via básica

seguida por proteínas ancoradas por GPI (Nichols e cols., 2001; Magalhães e cols., 2002). No entanto, sabemos que outras proteínas ancoradas por GPI, como receptor de folato, atravessam os endossomos de reciclagem (Nichols e cols., 2001; Rijnboutt e cols., 1996). Portanto, as seqüências que antecipam a ancora GPI apresentam um importante papel na determinação da trajetória tomada por estas proteínas. Este fato é observado também no tráfego de PrPc, uma vez que os resultados gerados neste trabalho indicam que quase toda a seqüência de PrPc contribui para a distribuição celular e o tráfego de PrPc.

Desta forma, a determinação de alguns aspectos da regulação de expressão de PrPc, a caracterização de sinalização por cálcio mediada pela interação PrP-laminina e o mapeamento da distribuição e o tráfego de PrPc fazem parte de um estudo bastante importante que tem elucidado as funções fisiológicas de PrPc.

6. Conclusões

- A expressão de PrPc no hipocampo de camundongo é aumentada por ácido cáínico num tempo curto sugerindo que PrPc pode participar no mecanismo de proteção a insultos.
- Verificamos que a interação de PrPc com a laminina desencadeia uma resposta celular aumentando transitoriamente as concentrações de cálcio intracelular. Esta sinalização ocorre mesmo na ausência de cálcio do meio extracelular.
- Construímos a proteína recombinante GFP-PrPc que possui um comportamento similar ao PrPc endógeno em termos da localização, dos processamentos pós-traducionais e da sua endocitose na presença de íons cobre. Portanto, GFP-PrPc é uma ferramenta bastante útil para o estudo de tráfego de PrPc.
- PrPc trafega entre o complexo de Golgi, a membrana plasmática, endossomos iniciais e endossomos de reciclagem.
- As deleções do domínio N-terminal de PrPc alteram o padrão de endocitose enquanto que as deleções dos domínios da região C-terminal causam o endereçamento errôneo da proteína.

7. Referências Bibliográficas

- Arnold J.E., Tipler C., Laszlo L., Hope J., Landon M., Mayer R.J.. The abnormal isoform of the prion protein accumulates in late-endosome-like organelles in scrapie-infected mouse brain. *J. Pathol.* **176(4)**: 403-11, 1995.
- Barbosa J.Jr., Massensini A.R., Santos M.S., Meireles S.I., Gomez R.S., Gomez M.V., Romano-Silva M.A., Prado V.F., Prado M.A.. Expression of the vesicular acetylcholine transporter, proteins involved in exocytosis, and functional calcium signaling in varicosities and soma of a murine septal cell line. *J Neurochem* **73(5)**:1881-93, 1999.
- Baron G.S., Wehrly K., Dorward D.W., Chesebro B., Caughey B.. Conversion of raft associated prion protein to the protease-resistant state requires insertion of PrP-res (PrP(Sc)) into contiguous membranes. *EMBO J* **21(5)**:1031-40, 2002.
- Barrow P.A., Holmgren C.D., Tapper A.J., Jefferys J.G.. Intrinsic physiological and morphological properties of principal cells of the hippocampus and neocortex in hamsters infected with scrapie. *Neurobiol Dis* **6(5)**:406-423, 1999.
- Beranger F., Mange A., Goud B., Lehmann S.. Stimulation of PrPC Retrograde Transport toward the Endoplasmic Reticulum Increases Accumulation of PrPSc in Prion-infected Cells. *J Biol Chem* **277(41)**: 38972-38977, 2002.
- Berridge M.J.. Neuronal calcium signaling. *Neuron* **21(1)**:.13-26, 1998.
- Bounhar Y., Zhang Y., Goodyer C.G., LeBlanc A.. Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *J Biol Chem* **276(42)**:.39145-39149, 2001.
- Brown D.R., Qin K., Herms J.W., Madlung A., Manson J., Strome R., Fraser P.E., Kruck T., von Bohlen A., Schulz-Schaeffer W., Giese A., Westaway D., Kretzschmar H.. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* **390**: 684-7, 1997.
- Brown D.R., Wong B.S., Hafiz F., Clive C., Haswell S.J., Jones I.M.. Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem. J.* **344 Pt 1**:1-5, 1999.
- Brown, D.R. Prion and prejudice: normal protein and the synapse. *Trends Neurosci* **24**:85-90, 2001.
- Bueler H., Aguzzi A., Sailer A., Greiner R.A., Autenried P., Aguet M., Weissmann C.. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73 (7)**: 1339-47, 1993.
- Bueler H., Fischer M., Lang Y., Bluethmann H., Lipp H.P., DeArmond S.J., Prusiner S.B., Aguet M., Weissmann C.. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356 (6370)**: 577-582, 1992.

- Cabral A.L., Lee K.S., Martins V.R.. Regulation of the cellular prion protein gene expression depends on chromatin conformation. *J Biol Chem* **277 (7)**: 5675-5682, 2002.
- Calhoun B.C., Lapierre L.A., Chew C.S., Goldenring J.R.. Rab11a redistributes to apical secretory canaliculus during stimulation of gastric parietal cells. *Am J Physiol* **275(1 Pt 1)**:C163-170, 1998
- Caughey B.W., Dong A., Bhat K.S., Ernst D., Hayes S.F., Caughey W.S.. Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* **30(31)**:7672-80, 1991
- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression *Science* **263(5148)**:802-805, 1994
- Chen Z.L., Strickland S.. Neuronal Death in the Hippocampus is promoted by Plasmin-Catalyzed Degradation of Laminin. *Cell* **91**: 917-925, 1997.
- Chesebro B., Race R., Wehrly K., Nishio J., Bloom M., Lechner D., Bergstrom S., Robbins K., Mayer L., Keith J.M., e cols.. Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* **315(6017)**:331-333, 1985.
- Chiarini L.B., Freitas A.R.O., Zanata S.M., Brentani R.R., Martins V.R. e Linden R.. Cellular Prion Protein Transduces neuroprotective signals. *EMBO J.* **21**:3317-3326, 2002
- Chiesa R., Harris DA.. Prion Disease: What Is the Neurotoxic Molecule? *Neurobiology of Disease* **8** 743-763, 2001
- Choi E.S., Rettig W.J., Wayner E.A., Srour M.L., Clegg D.º. Functional identification of integrin laminin receptors that mediate process outgrowth by human SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurosci Res* **37(4)**:475-488, 1994
- Clague M.J.. Molecular aspects of the endocytic pathway. *Biochem J* **336 (Pt 2)**:271-282, 1998
- Coitinho A.S., Freitas A.R.O., Roesler R., Walz R., Minettin A. Graner E., Mercadante A.F., Zanata S.M., Rotta L., Choi H., Silva TD., Vinade E., Martins VR., Izquierdo I., Brentani RR.. Cellular Prion Interaction with Laminin is involved in memory formation through PKA and MAPK pathway. *Submeitado*.
- Damke H., Baba T., Warnock D.E., Schmid S.L.. Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J Cell Biol* **127(4)**:915-934, 1994
- DeArmond S.J., Mobley W.C., DeMott D.L., Barry R.A., Beckstead J.H., Prusiner S.B.. Changes in the localization of brain prion proteins during scrapie infection. *Neurology* **37(8)**:1271-80, 1987

- Doetzlhofer A, Rotheneder H, Lagger G, Koranda M, Kurtev V, Brosch G, Wintersberger E, Seiser C. Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1. *Mol Cell Biol* **19(8)**: 5504-5511, 1999
- Dunn K.W., McGraw T.E., Maxfield F.R.. Iterative fractionation of recycling receptors from lysosomally destined ligands in an early sorting endosome. *J Cell Biol* **109(6 Pt 2)**:3303-3314, 1989
- Ellgaard L., Molinari M., Helenius A. .Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* **286(5446)**:1882-8, 1999
- Ellis V., Daniels M., Misra R., Brown D.R.. Plasminogen activation is stimulated by prion protein and regulated in a copper-dependent manner. *Biochemistry* **41(22)**:6891-6, 2002
- Fischer M., Rulicke T., Raeber A., Sailer A., Moser M., Oesch B., Brandner S, Aguzzi A, Weissmann C.. Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J* **15(6)**:1255-64, 1996
- Forloni, G.; Angeretti, N.; Chiesa, R.; Manzani, E.; Salmona, M.; Bugiani, O. e Tagliavini, F. Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* **362**: 543-546, 1993.
- Gauczynski S., Peyrin J.M., Haik S., Leucht C., Hundt C., Rieger R., Krasemann S., Deslys J.P., Dormont D., Lasmezas C.I. e Weiss S. The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *EMBO J* **20(21)**: 5863-5875, 2001
- Ghosh RN, Mallet WG, Soe TT, McGraw TE, Maxfield FR. An endocytosed TGN38 chimeric protein is delivered to the TGN after trafficking through the endocytic recycling compartment in CHO cells. *J Cell Biol* **142(4)**:923-936, 1998
- Gonzalez-Iglesias R, Pajares MA, Ocal C, Espinosa JC, Oesch B, Gasset M. Prion protein interaction with glycosaminoglycan occurs with the formation of oligomeric complexes stabilized by Cu(II) bridges. *J Mol Biol* **319(2)**:527-40, 2002.
- Graner E., Mercadante A.F., Zanata S.M., Forlenza O.V., Cabral, A.L.B, Veiga S.S., Juliano, M.H., Roesler, R., Walz, R., Minetti, A., Isquierdo, I. Martins, V.R., & Brentani, R.R. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Molecular Brain Research* **10**;76: 85-92, 2000a.
- Graner E., Mercadante A.F., Zanata S.M., Martins V.R., Jay D.G. e Brentani R.R. Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. *FEBS Lett* **482(3)**:257-60, 2000b.
- Griffiths G, Back R, Marsh M. A quantitative analysis of the endocytic pathway in baby hamster kidney cells. *J Cell Biol* **109(6 Pt 1)**:2703-2720, 1989
- Gu X, Spitzer NC. Breaking the code: regulation of neuronal differentiation by spontaneous calcium transients. *Dev Neurosci* **19(1)**:33-41, 1997

- Hajj GNM., Mercadante AF., Lopes MH., Veiga SS., Juliano MA., Jachieri SG., Zanata SM, Martins VR. Cellular prion protein is a new receptor for vitronectin which promotes axonal growth in dorsal root ganglia. *Submetido*.
- Hasnain S.S., Murphy L.M., Strange R.W., Grossmann J.G., Clarke A.R., Jackson G.S., Collinge J. XAFS study of the high-affinity copper-binding site of human PrP(91-231) and its low-resolution structure in solution. *J Mol Biol* **311(3)**:467-73, 2001
- Haugland RP, Michelle TZ, Johnson ID Handbooks of Fluorescent Probes and Research Chemical. Sexta edição, Molecular Probe, 1996
- Hegde RS, Mastrianni JA, Scott MR, DeFea KA, Tremblay P, Torchia M, DeArmond SJ, Prusiner SB, Lingappa VR. A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* **279(5352)**:827-834, 1998
- Henley JR, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA. Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol* **141(1)**:85-99, 1998
- Herms, J.W., Korte, S., Gall, S., Schneider, I., Dunker, S., Kretzschmar, H.A. Altered intracellular calcium homeostasis in cerebellar granule cells of prion protein-deficient mice. *J Neurochem* **75**:1487-1492, 2000.
- Herskovits JS, Burgess CC, Obar RA, Vallee RB. Effects of mutant rat dynamin on endocytosis. *J Cell Biol* **122(3)**:565-5678, 1993
- Hope J., Morton L.J., Farquhar C.F., Multhaup G., Beyreuther K. and Kimberlin R.H. 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**:2591-7, 1986
- Hopkins CR, Gibson A, Shipman M, Miller K Movement of internalized ligand-receptor complexes along a continuous endosomal reticulum. *Nature* **346(6282)**:335-339, 1990
- Hoewich AL., Weissman JS.. Deadly Conformations – Protein Misfolding in Prion Disease. *Cell* **89**: 499-510, 1997
- Ivanova L, Barmada S, Kummer T, Harris DA. Mutant prion proteins are partially retained in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **276(45)**:42409-21, 2001
- Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* **68(3)**:285-316, 1997
- Jackson DE, White MM, Jennings LK, Newman PJ. A Ser162-->Leu mutation within glycoprotein (GP) IIIa (integrin beta3) results in an unstable alphaIIb beta3 complex that retains partial function in a novel form of type II Glanzmann thrombasthenia. *Thromb Haemost* **80(1)**:42-8, 1998

- Jefferys JG, Empson RM, Whittington MA, Prusiner SB. Scrapie infection of transgenic mice leads to network and intrinsic dysfunction of cortical and hippocampal neurones. *Neurobiol Dis* **1(1-2)**:25-30, 1994
- Kaneko K, Vey M, Scott M, Pilkuhn S, Cohen FE, Prusiner SB. COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94(6)**:2333-8, 1997
- Kleinman HK, Weeks BS, Cannon FB, Sweeney TM, Sephel GC, Clement B, Zain M, Olson MO, Jucker M, Burrous BA. Identification of a 110-kDa nonintegrin cell surface laminin-binding protein which recognizes an A chain neurite-promoting peptide. *Arch Biochem Biophys* **290(2)**:320-5, 1991
- Kristensson K, Feuerstein B, Taraboulos A, Hyun WC, Prusiner SB, DeArmond SJ. Scrapie prions alter receptor-mediated calcium responses in cultured cells. *Neurology* **43(11)**:2335-41, 1993
- Kushmerick C., Kalapothakis E., Beirao P.S., Penaforte C.L., Prado V.F., Cruz J.S., Diniz C.R., Cordeiro M.N., Gomez M.V., Romano-Silva M.A., Prado M.A.. Phoneutria nigriventer toxin Tx3-1 blocks A-type K⁺ currents controlling Ca²⁺ oscillation frequency in GH3 cells. *J Neurochem* **72(4)**:1472-81, 1999
- Kuwahara C., Takeuchi A.M., Nishimura T., Haraguchi K., Kubosaki ^a, Matsumoto Y., Saeki K., Matsumoto Y., Yokoyama T., Itohara S., Onodera T.. Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* **400(6741)**:225-6, 1999.
- Laurie GW, Stone CM, Yamada Y. Elevated 32-kDa LBP and low laminin mRNA expression in developing mouse cerebrum. *Differentiation* **46(3)**:173-9, 1991
- Le Borgne R, Hoflack B. Mechanisms of protein sorting and coat assembly: insights from the clathrin-coated vesicle pathway. *Curr Opin Cell Biol* **10(4)**:499-503, 1998
- Lee HJ, Hammond DN, Large TH, Wainer BH. Immortalized young adult neurons from the septal region: generation and characterization. *Brain Res Dev Brain Res* **52(1-2)**:219-28, 1990
- Lee K.S., Magalhaes A.C., Zanata S.M., Brentani R.R., Martins V.R., Prado M.A.. Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. *J Neurochem* **79(1)**:79-87, 2001
- Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257(5072)**:967-71, 1992
- Liang P. and Pardee A.B.. Recent advances in differential display. *Curr Opin Immunol* **7(2)**:274-80, 1995
- Liu T, Li R, Pan T, Liu D, Petersen RB, Wong BS, Gambetti P, Sy MS. Intercellular transfer of the cellular prion protein. *J Biol Chem* [epub ahead of print], 2002

- Lorenz H, Windl O, Kretzschmar HA. Cellular phenotyping of secretory and nuclear prion proteins associated with inherited prion diseases. *J Biol Chem* **277**(10):8508-16, 2002
- Ma J, Lindquist S. Conversion of PrP to a Self-Perpetuating PrP^{Sc}-like Conformation in the Cytosol. *Science* [epub ahead of print], 2002
- Ma J., Lindquist S.. Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**(26):14955-60, 2001
- Magalhaes AC, Silva JA, Lee KS, Martins VR, Prado VF, Ferguson SS, Gomez MV, Brentani RR, Prado MA. Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. *J Biol Chem* **277**(36):33311-8, 2002
- Marsh M, McMahon HT. The structural era of endocytosis. *Science* **285**(5425):215-220, 1999
- Marti E., Blasi J., Gomez De Aranda I., Ribera R., Blanco R., Ferrer I. Selective early induction of synaptosomal-associated protein (molecular weight 25,000) following systemic administration of kainate at convulsant doses in the rat. *Neuroscience* **90**(4):1421-32, 1999
- Martins V.R., Graner E., Garcia-Abreu J., de Souza S.J., Mercadante A.F., Veiga S.S., Zanata S.M., Neto V.M. and Brentani R.R. Complementary hydropathy identifies a cellular prion protein receptor. *Nat Med* **3**:1376-82, 1997
- Martins VR, Linden R, Prado MA, Walz R, Sakamoto AC, Izquierdo I, Brentani RR. Cellular prion protein: on the road for functions. *FEBS Lett* **512**(1-3):25-8, 2002
- Martone ME, Zhang Y, Simpliciano VM, Carragher BO, Ellisman MH. Three-dimensional visualization of the smooth endoplasmic reticulum in Purkinje cell dendrites. *J Neurosci* **13**(11):4636-46, 1993
- McKinley M.P., Taraboulos A., Kenaga L., Serban D., Stieber A., DeArmond S.J., Prusiner S.B., Gonatas N.. Ultrastructural localization of scrapie prion proteins in cytoplasmic vesicles of infected cultured cells. *Lab. Invest.* **65**(6):622-30, 1991
- McLauchlan H, Newell J, Morrice N, Osborne A, West M, Smythe E. A novel role for Rab5-GDI in ligand sequestration into clathrin-coated pits. *Curr Biol* **8**(1):34-45, 1998
- McNiven MA, Kim L, Krueger EW, Orth JD, Cao H, Wong TW. Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape. *J Cell Biol* **151**(1):187-98, 2000
- Meggio F, Negro A, Sarno S, Ruzzene M, Bertoli A, Sorgato MC, Pinna LA. Bovine prion protein as a modulator of protein kinase CK2. *Biochem J* **352** Pt 1:191-6, 2000

- Mishra RS, Gu Y, Bose S, Verghese S, Kalepu S, Singh N. Cell surface accumulation of a truncated transmembrane prion protein in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease P102L. *J Biol Chem* **277(27)**:24554-61, 2002
- Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, Laplanche JL, Lehmann S, Launay JM, and Kellermann O. Signal Transduction through Prion Protein. *Science* **289**: 1925-1928, 2000.
- Negro A, Ballarin C, Bertoli A, Massimino ML, Sorgato MC. The Metabolism and Imaging in Live Cells of the Bovine Prion Protein in Its Native Form or Carrying Single Amino Acid Substitutions. *Mol Cell Neurosci* **17**:521-538, 2001
- Nichols BJ, Kenworthy AK, Polishchuk RS, Lodge R, Roberts TH, Hirschberg K, Phair RD, Lippincott-Schwartz J. Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. *J Cell Biol* **153(3)**:529-41, 2001
- Nichols BJ. A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex. *Nat Cell Biol* **4(5)**:374-8, 2002
- Nomizu M, Kuratomi Y, Song SY, Ponce ML, Hoffman MP, Powell SK, Miyoshi K, Otaka A, Kleinman HK, Yamada Y. Identification of cell binding sequences in mouse laminin gamma1 chain by systematic peptide screening. *J Biol Chem* **272(51)**:32198-205, 1997
- Novick P, Zerial M. The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr Opin Cell Biol* **9(4)**:496-504, 1997
- Oesch, B.; Westaway, D.; Walchli, M.; McKinley, M.P.; Kent, S.B.H.; Aebersold, R.; Barry, R.A.; Tempst, P.; Teplow, D.B.; Hood, L.E.; Prusiner, S.B. e Weissmann, C. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* **40**: 735-746, 1985.
- Oh P, McIntosh DP, Schnitzer JE. Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol* **141(1)**:101-14, 1998
- Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, et al. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90(23)**:10962-6, 1993
- Pan T, Wong BS, Liu T, Li R, Petersen RB, Sy MS. Cell surface prion protein interacts with glycosaminoglycans *Biochem J* [epub ahead of print] 2002.
- Pauly P.C. & Harris D.A. Copper Stimulates Endocytosis of the Prion Protein. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 33107-33110, 1998
- Powell SK, Kleinman HK. Neuronal laminins and their cellular receptors. *Int J Biochem Cell Biol* **29(3)**:401-14, 1997

- Press W.H., Flannery B.P., Teukolsky S.A. e Vetterling W.T. Numerical Recipes, pp818. Cambridge, Cambridge University Press. 1986
- Prusiner SB, Bolton DC, Groth DF, Bowman KA, Cochran SP, McKinley MP. Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry* **21(26)**:6942-6950, 1982
- Prusiner SB. Molecular biology of prion diseases *Science* **252(5012)**:1515-1522, 1991
- Prusiner SB. Prions. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 13363-13383, 1998
- Rijnboutt S, Jansen G, Posthuma G, Hynes JB, Schornagel JH, Strous GJ. Endocytosis of GPI-linked membrane folate receptor-alpha. *J Cell Biol* **132(1-2)**:35-47, 1996
- 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. 1996
- Sales N, Hassig R, Rodolfo K, Di Giamberardino L, Traiffort E, Ruat M, Fretier P, Moya KL. Developmental expression of the cellular prion protein in elongating axons. *Eur J Neurosci* **15(7)**:1163-77, 2002
- Schatzl HM, Da Costa M, Taylor L, Cohen FE, Prusiner SB. Prion protein gene variation among primates. *J Mol Biol* **245(4)**:362-74, 1995
- Schmitt-Ulms G, Legname G, Baldwin MA, Ball HL, Bradon N, Bosque PJ, Crossin KL, Edelman GM, DeArmond SJ, Cohen FE, Prusiner SB. Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. *J Mol Biol* **314(5)**:1209-25, 2001
- Scholz KP, Miller RJ. Developmental changes in presynaptic calcium channels coupled to glutamate release in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurosci* **15(6)**:4612-7, 1995
- Sheff DR, Daro EA, Hull M, Mellman I. The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions. *J Cell Biol* **145(1)**:123-39, 1999
- Shmerling D, Hegyi I, Fischer M, Blattler T, Brandner S, Gotz J, Rulicke T, Flechsig E, Cozzio A, von Mering C, Hangartner C, Aguzzi A, Weissmann C. Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell* **93(2)**:203-214, 1998
- Shyng S. L., Moulder K.L. Laesco A. & Harris D.A. The N-terminal domain of a glycolipid-anchored prion protein is essential for its endocytosis via clathrin-coated pits. *J. Biol Chem.* **270**: 14793-14800, 1995
- Shyng SL, Huber MT, Harris DA. A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J Biol Chem* **268(21)**:15922-8, 1993
- Simpson PB, Challiss RA, Nahorski SR. Neuronal Ca²⁺ stores: activation and function. *Trends Neurosci* **18(7)**:299-306, 1995

- Spielhauer C, Schatzl HM. PrPC directly interacts with proteins involved in signaling pathways. *J Biol Chem* **276(48)**:44604-12, 2001
- Stahl N, Baldwin MA, Teplow DB, Hood L, Gibson BW, Burlingame AL, Prusiner SB. Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry* **32(8)**:1991-2002, 1993
- Sumudhu W., Perera S. e Hooper N.M. Ablation of the metal ion-induced endocytosis of prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**: 519-523, 2001
- Terasaki M, Slater NT, Fein A, Schmidek A, Reese TS. Continuous network of endoplasmic reticulum in cerebellar Purkinje neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91(16)**:7510-4, 1994
- Tomaselli KJ, Hall DE, Flier LA, Gehlsen KR, Turner DC, Carbonetto S, Reichardt LF. A neuronal cell line (PC12) expresses two beta 1-class integrins-alpha 1 beta 1 and alpha 3 beta 1-that recognize different neurite outgrowth-promoting domains in laminin. *Neuron* **5(5)**:651-62, 1990
- Vey M., Pilkuhn S., Wille H., Nixon R., DeArmond S.J., Smart E.J., Aderson R.G.W., Taraboulos A. and Prusiner S.B., Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion protein in caveolae – like membranous domains. *Proc. Natl. Sci. USA* **93**: 14945 – 14949, 1996
- Walz R., Amaral O.B., Rockenbach I.C., Roesler R., Izquierdo I., Cavalheiro E.A., Martins V.R., Brentani R.R.. Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. *Epilepsia* **40(12)**:1679-82, 1999
- Wong K, Qiu Y, Hyun W, Nixon R, VanCleave J, Sanchez-Salazar J, Prusiner SB, DeArmond SJ. Decreased receptor-mediated calcium response in prion-infected cells correlates with decreased membrane fluidity and IP3 release. *Neurology* **47(3)**:741-750, 1996
- Yamashiro DJ, Maxfield FR. Acidification of endocytic compartments and the intracellular pathways of ligands and receptors. *J Cell Biochem* **26(4)**:231-246, 1984;
- 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)**:17174-17179. 1990
- Zahn R, Liu A, Luhrs T, Riek R, von Schroetter C, Lopez Garcia F, Billeter M, Calzolari L, Wider G, Wuthrich K. NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97(1)**:145-150, 2000
- Zanata S.M., Lopes M.H., Mercadante A.F., Hajj G., Freitas A.R.O., Chiarini L.B., Cabral A.L.B., Nomizo R., Lee K.S., Juliano M.A., Oliveira E., Jachieri S.G., Burlingame A., Huang L., Linden R., Brentani R.R. & Martins V.R.. Stress-Inducible Protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J.* **21**: 3307-3316, 2002.

- Zhukareva V.V., Chernevskaya N., Pimenta A., Nowycky M., Levitt P. Limbic System-Associated Membrane Protein (LAMP) Induces Neurite Outgrowth and Intracellular Ca^{2+} Increase in Primary Fetal Neurons. *Mol Cell Neurosci* **10(1/2)**:43-55, 1997