

Fabiana Andrade Caetano

**Internalização e Tráfego da Stress
Inducible Protein-1 (STI-1), um ligante da
proteína prion celular**

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular
Belo Horizonte
Outubro de 2006**

Fabiana Andrade Caetano

**Internalização e Tráfego da Stress
Inducible Protein-1 (STI-1), um ligante da
proteína prion celular**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas: Farmacologia e Bioquímica Molecular

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Máximo Prado

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Neurofarmacologia do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, com o auxílio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)
- Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer

Aos meus queridos pais Angela e Francisco e meu irmão Felipe por todo amor e apoio,

Ao meu companheiro de todos os momentos, Ricardo, pelo amor, respeito e incentivo.

Agradecimentos

Em primeiro lugar eu agradeço a Deus por ter me conduzido em todo esse trabalho, pela força e pelo cuidado que tenho recebido todos os dias.

Ao meu orientador, Marco Antônio Prado, pela confiança, pelos conselhos e pelo esforço de proporcionar aos seus alunos todas as condições físicas para a realização de pesquisa com qualidade.

A Professora Vânia Prado, pela atenção, orientação e pelo seu esforço em nos proporcionar uma boa formação acadêmica.

Ao Professor Marcus Vinícius Gomez, do laboratório de Neurofarmacologia, pelo laboratório tão completo, pelos conselhos, pelas aulas que tanto nos acrescenta.

A Doutora Vilma Regina Martins e suas alunas Marilene, Gláucia e Camila, pelo apoio científico, respeito e pela confiança.

Ao Professor André Massensini pelo apoio científico.

As queridas minhas amigas, Cristina Martins, Grace Schenatto, Luciene Bruno, Ana Cristina Magalhães, Melissa, Regina, pelas inúmeras contribuições e sobretudo pela amizade.

As minhas amigas Lucimar e Ana Cristina do Nascimento pelos conselhos, pela amizade sincera e por toda compreensão.

A dupla sertaneja mais famosa do ICB, Bráulio e Célio, por alegrar nosso laboratório e por todo apoio científico.

Aos novos amigos Cristiane, Magda, Vinícius e Alessandra que chegaram a tão pouco tempo mas já me ajudaram tanto!

As alunas de Iniciação Científica Mônica e Belissa por todo apoio, pela paciência e pela amizade.

Aos meus amigos queridos do laboratório de Neurofarmacologia, Allan, Bernardo, Bruno Rezende, Daniela Valadão, Karen, Juliara, Janice, Livia, Paulo e Renan pelos momentos agradáveis no laboratório.

A Adriana, pelo enorme esforço de manter o laboratório em ordem, pela eficiência e sobretudo pela amizade.

Aos meus amigos do laboratório de Neurobiologia Molecular, Diane, Danuza, Diogo, Rodrigo, Cíntia, Patrícia, Andréia, Bruno, Iaci, pela amizade e prestatividade.

Aos meus pais, Angela e Francisco, e meu irmãozinho Felipe, pelo amor, pelo esforço, pela compreensão nos momentos difíceis, pela confiança e companheirismo. Amo vocês!!

Ao meu doce Ricky, meu amor e meu companheiro, pelo apoio, pela força, pelos ensinamentos, por me compreender e me amar em todos os momentos, sobretudo nos mais difíceis, e por me fazer tão feliz. Te Amo!

ÍNDICE

Lista de Figuras e Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas	x
Resumo	xii
Abstract	xiii
1 – INTRODUÇÃO	01
1.1 Doenças Priônicas	02
1.2 Proteína Prion Celular (PrP ^c)	05
1.3 Funções da Proteína Prion Celular	08
1.4 Internalização de Proteínas	11
1.5 Tráfego de proteínas após endocitose	16
1.6 Internalização e Tráfego de PrP ^c e PrP ^{sc}	23
1.7 STI-1 (Stress Inducible Protein1)	26
1.8 STI-1 como ligante de PrP ^c	30
1.9 Fatores Neurotróficos	32
2 - OBJETIVOS	36
2 Objetivo geral	37
2.1 Objetivos específicos	37
3 – MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Construções	39
3.2 Cultura de células	39
3.3 Transfecção	40
3.4 Preparo da STI-1	40
3.5 Marcação de STI-1 com Alexa Fluor 488 e 568	41
3.6 Ensaio de interação da STI-1 com células SN56	41
3.7 Ensaio de Competição	42

3.8	Marcação de organelas em células SN56 com Transferrina e Lysosensor	42
3.9	Análise de interação entre STI-1 AF568 e clatrina, Rab7Q67L e Rab5-GFP	43
3.10	Aquisição de Imagens	44
3.11	Análise de Co-localização	44
4-	RESULTADOS	45
4.1	Interação de STI-1 com células SN56	46
4.2	Avaliação da especificidade de internalização	51
4.3	Papel da clatrina na internalização de STI-1	54
4.4	Localização intracelular de STI-1	59
4.5	Análise quantitativa da co-localização	72
5 -	DISCUSSÃO	73
6 -	CONCLUSÕES	83
7 -	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
8 -	ANEXO	100

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1a:	Estrutura primária da proteína PrP ^c de camundongo	7
Figura 1b:	Localização de PrP ^c na membrana celular	7
Figura 2:	Mecanismos de endocitose	12
Figura 3:	Endocitose pela via clássica	21
Figura 4:	Vias de endocitose independentes de clatrina	22
Figura 5:	Vias de endocitose propostas para PrP ^c	25
Figura 6a:	Domínios estruturais da STI-1	29
Figura 6b:	Estrutura gênica da Hop humana	29
Figura 7:	Interação da STI-1 fluorescente com células SN56	47
Figura 8:	Avaliação da auto-fluorescência das células SN56	49
Figura 9:	Interação da STI-1 AF568 com células SN56	51
Figura 10:	Ensaio de competição	53
Figura 11:	Avaliação do papel da clatrina na internalização de STI-1	55
Figura 12:	Avaliação do papel da clatrina na internalização de STI-1	56
Figura 13:	Avaliação da co-localização entre clatrina-GFP e STI-1 AF568	58
Figura 14:	Análise da co-localização entre STI-1 AF568 e Transferrina AF488	60
Figura 15:	Análise da co-localização entre STI-1 AF568 e Transferrina AF488	62
Figura 16:	Análise da co-localização entre STI-1 AF568 e Rab5-GFP	63
Figura 17:	Análise da co-localização entre STI-1 AF568 e Rab5-GFP	64
Figura 18:	STI-1 se co-localiza com vesículas acídicas	66
Figura 19:	Valores de pH luminal de organelas da via secretória e endocítica	68
Figura 20:	Presença de STI-1 em endosomas/lisosomas	70
Figura 21:	Presença de STI-1 em endosomas/lisosomas	71

Tabela 1:	Alguns exemplos de Doenças Priônicas	4
Tabela 2:	Comprimento de onda de absorção e emissão dos marcadores fluorescentes utilizados	43
Tabela 3:	Porcentagem de co-localização entre marcadores de organelas intracelulares e STI-1	7

Lista de Abreviaturas

aa	Aminoácidos
AF	Alexa Fluor
AP	Proteína adaptadora
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado de Cérebro
BSE	Bovine Spongiform Encephalopathy
cAMP	Adenosina Monofosfato cíclico
CCV	Vesículas cobertas por Clatrina
CJD	Creutzfeldt-Jakob Disease
CTxB	Subunidade B da Cholera Toxina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ED	Endosoma de Distribuição
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
ER	Endosoma de Reciclagem
ET	Endosoma Tardio
FFI	Fatal Familiar Insomnia
GFP	Proteína fluorescente verde
GPCR	Receptores acoplados à proteína G
GPI	Glicosil-fosfatidilinositol
GSS	Gertmann-Straussler Syndrome
Hop	"Human Heat Shock cognate Protein"
Hsp70	Proteína de Choque Térmico de 70 kDa
Hsp90	Proteína de Choque Térmico de 90 kD
iCJD	Iatrogenic CJD
kDa	kiloDalton
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógenos
MVBs	Corpos Multivesiculares
NGF	Fator de Crescimento Nervoso
NT	Neurotrofina
PBS	Phosphate-buffered Solution

pH	Potencial de hidrogênio
PK	Proteinase K
PKA	Proteína Quinase dependente de AMP cíclico
PKC	Proteína Quinase C
PRNP	Gene que codifica para a proteína prion celular
PrP ^c	Proteína prion celular
PrP ^{sc}	Proteína prion scrapie
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotações por minuto
sCJD	Sporadic CJD
SDS – PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido Dismutase
STI-1	Stress Inducible Protein 1
SV40	Simians Virus 40
TBS	Tris-Buffered Saline
TGN	Rede Trans-Golgi
TPR	Tricopeptídeos Repetidos
Trk	Receptores de Cinases relacionados à tropomiosina
TSE	Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis
vCJD	Nova variante da doença de Creutzfeld-Jakob
5-HT	Serotonina

Resumo

A proteína prion celular (PrP^c) é uma glicoproteína ligada à membrana plasmática por uma âncora de GPI (glicosilfosfatidilinositol). A sua isoforma anormal (PrP^{sc}) é uma molécula infecciosa envolvida na patogênese das doenças priônicas. A identificação de vários ligantes que interagem com PrP^c tem auxiliado no entendimento das funções fisiológicas desta proteína. Um destes ligantes é a STI-1 (stress inducible protein 1), cuja interação com PrP^c induz a neuroproteção e neuritogênese por distintas vias de sinalização. A STI-1 é uma co-chaperona que também pode atuar como um fator neurotrófico solúvel. Para melhor compreender as funções fisiológicas de PrP^c e STI-1, estudamos a interação celular e o tráfego de STI-1. Neste trabalho caracterizamos a interação da STI-1 recombinante com células SN56, e mostramos que esta interação ocorre através de um sítio de ligação saturável e específico. Observamos que a interação da STI-1 com as células SN56 leva à internalização de STI-1. Experimentos de dupla marcação utilizando STI-1 fluorescente e clatrina-GFP mostraram que a principal via de internalização de STI-1 é independente de clatrina. Avaliamos também se a STI-1 era direcionada para endosomas primários após sofrer endocitose. Para isso utilizamos os marcadores de endosomas primários Transferrina e Rab5-GFP. Os resultados dos experimentos de co-localização entre STI-1 fluorescente e transferrina Alexa Fluor488 ou Rab5-GFP sugerem que a STI-1 não é direcionada para endosomas primários após ser internalizada. A partir deste resultado, avaliamos a presença de STI-1 em vesículas acídicas através de experimentos de dupla marcação utilizando Lysosensor Green. Os resultados mostraram alta co-localização entre STI-1 e Lysosensor, sugerindo o direcionamento de STI-1 para vesículas acídicas. Para identificarmos a identidade destas vesículas utilizamos o mutante constitutivamente ativo Rab7Q67L como marcador de endosomas tardios/lisosomas. Os experimentos de co-localização mostraram que a maior parte das vesículas positivas para STI-1 eram positivas para Rab7Q67L, sugerindo o direcionamento de STI-1 para endosomas tardios/lisosomas. Conjuntamente, os resultados deste trabalho fortemente sugerem que a STI-1 interage com um sítio específico na membrana plasmática, sendo internalizada principalmente por uma via independente de clatrina e direcionada para endosomas tardio/lisosomas sem passar por endosomas primários.

Abstract

The cellular prion protein (PrP^c) is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored plasma membrane glycoprotein. The PrP^c abnormal isoform, PrP^{Sc}, is an infectious form involved in the prion disease pathogenesis. Identification of ligands that interact with PrP^c can help in the understanding the physiological function of this protein. The STI-1 (stress inducible protein 1) is a specific PrP^c ligand that promotes neuroprotection and neuritogenesis by distinct signaling pathways. STI-1 is a co-chaperone that can act as a soluble neurotrophic factor. In order to understand possible physiological functions of STI-1 and PrP^c we investigated the cellular interactions and intracellular trafficking of STI-1. In this work, we characterized the interaction of recombinant STI-1 with SN56 cells and showed that this interaction is mediated by a specific and saturable binding site in SN56 cells. We observed that the interaction between STI-1 and SN56 cells promotes STI-1 internalization. Double labeling experiments using fluorescent STI-1 and clathrin-GFP indicated that the major endocytic pathway to the STI-1 internalization is clathrin independent. Next, our aim was to evaluate whether the STI-1 was targeted to early endosomes after endocytosis. To test this hypothesis, we used two markers of early endosomes: Transferrin and Rab5-GFP. The experiment of co-localization between STI-1 and Alexa Fluor 488-Transferrin or Rab5-GFP suggested that STI-1 is not targeted to early endosomes after endocytosis. As STI-1 was not found in early endosomes, we decided to evaluate if STI-1 is found in acidic vesicles. To this purpose we used Lysosensor Green labelling. The result indicated strong co-localization between STI-1 and Lysosensor, suggesting that STI-1 is target to acidic vesicles. To identify these vesicles, we used the constitutively active mutant Rab7Q67L, a late endosome/lysosome marker. The co-localization studies showed that the most STI-1 positive vesicles were positives to Rab7Q67L-positives suggesting that STI-1 is targeted to late endosomes/lysosomes. Taken together, our results indicate that STI-1 binds to cells in a saturable and specific way, it is internalized by a clathrin independent pathway and is targeted to late endosomes/lysosomes bypassing therefore early endosomes.

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇAS PRIÔNICAS

As doenças priônicas, também conhecidas como encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSE), são desordens neurodegenerativas fatais que afetam humanos e outros animais (Mallucci and Collinge, 2005). Este grupo de doenças inclui o Kuru, a doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), a síndrome de Gerstmann-Straussler (GSS) e a Insônia Familiar Fatal (IFF) em humanos, bem como o Scrapie em ovelhas e cabras, a Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE) em gado e encefalopatias em outros animais como gatos e alces (Gajdusek, 1996; Prusiner, 1996). Cada uma dessas doenças apresenta suas particularidades clínicas, mas de modo geral estas desordens se caracterizam por demência, disfunções motoras como ataxia cerebelar (Harris, 1999) e um longo período de incubação, que pode variar de 1,5 a 40 anos (Will et al, 2004). As características neuropatológicas incluem neurodegeneração espongiforme, perda neuronal, ativação glial e acúmulo de agregados amilóides – mais proeminentes na GSS e no Kuru (Mabbot and MacPherson, 2006).

Os primeiros casos de CJD foram descritos na década de 20 por Creutzfeldt, (1920) e Jakob (1921). Em 1950, Carleton Gajdusek e colaboradores descreveram o kuru em uma tribo da Nova Guiné, observando que a doença era transmitida entre os membros do grupo através de rituais canibalistas (Gajdusek and Zigas, 1957). Desde que Willian Hadlow apontou para as similaridades neuropatológicas entre o Kuru e o scrapie, primeira doença priônica a ser descrita, os pesquisadores passaram a procurar pelo agente etiológico destas encefalopatias. Vários dados demonstravam que a infectividade por scrapie poderia ser reduzida por procedimentos que hidrolizavam ou modificavam proteínas, mas era resistente a procedimentos que alteravam ácidos nucleicos (revisto por Prusiner, 1998). Estes dados levaram Prusiner em 1982 a propôr o termo prion, derivado do inglês **proteinaceous and infectious**, para denotar partículas infecciosas que eram resistentes aos tratamentos que modificavam os ácidos nucleicos (Prusiner, 1982). Logo depois, a partir da purificação de prions em cérebro de hamster infectado com scrapie, identificou-se uma proteína com massa molecular de 27 a 30 KDa. Esta proteína foi identificada apenas nos animais infectados, porém outros estudos demonstraram que os níveis de mRNA da proteína prion eram similares em tecidos infectados e não infectados

(revisto por Prusiner, 1998), levando aos pesquisadores a propôr a existência de uma proteína prion endógena. Mais tarde o gene para esta proteína foi identificado, mostrando que a proteína prion **scrapie**, PrP^{sc}, é codificada no genoma do próprio hospedeiro dando origem a uma isoforma normal denominada proteína prion **celular**, PrP^c.

De acordo com a hipótese de prion, PrP^{sc} induz alterações conformacionais na proteína prion celular (PrP^c), levando a geração de novas moléculas de PrP^{sc} em uma reação autocatalítica (revisto por Harris, 1999). Apesar de ter sido intensamente criticada quando proposta, existem hoje fortes evidências de que esta idéia é correta. Recentes trabalhos já demonstraram a produção in vitro de prions infecciosos de mamíferos, corroborando a hipótese (Legname et al., 2004; Castilla et al., 2005). Dessa forma as doenças priônicas representam um novo mecanismo patogênico baseado na auto-propagação de alterações conformacionais de uma proteína.

Apesar dos mecanismos de propagação destas encefalopatias não serem completamente esclarecidos, sabe-se que as doenças priônicas podem ser causadas por mutações no gene da proteína prion humana (PRNP), por infecção (através da inoculação ou ingestão de PrP^{sc}) ou por raros eventos esporádicos que levam à formação de PrP^{sc} (Wadsworth et al, 2003). Os conhecidos agentes das TSEs, as doenças que eles causam e as espécies que eles afetam estão listados na Tabela 1.

Tabela 1: Alguns exemplos de Doenças Priônicas :

Doença	Espécie afetada	Rota de transmissão
Variante de Creutzfeldt-Jakob (vCJD)	Humanos	Ingestão de carne contaminada com BSE. Dois casos associados com transfusão de sangue
Creutzfeldt-Jakob esporádica	Humanos	Desconhecida. Mutações somáticas ou conversão espontânea de PrP ^c em PrP ^{sc} ?
Creutzfeldt-Jakob iatrogênica	Humanos	Exposição médica acidental a tecidos contaminados com CJD ou produtos de tecidos
Creutzfeldt-Jakob familiar	Humanos	Associadas com mutações no gene PRNP
Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker	Humanos	Associadas com mutações no gene PRNP
Insônia Familiar Fatal	Humanos	Associadas com mutações no gene PRNP
Kuru	Humanos	Ritual canibalista
Scrapie	Ovelhas, cabras	Adquirida (pela ingestão), transmissão horizontal, transmissão vertical não esclarecida
Encefalopatia Bovina Espongiforme (BSE)	Gado	Ingestão de carne contaminada com BSE ou farinha feita de ossos
Doença Crônica enfraquecedora	Cervos, cervo de cauda branca, alce	Adquirida (pela ingestão), transmissão horizontal, transmissão vertical não esclarecida
Encefalopatia Espongiforme Felina	Gatos domésticos e de zoológicos	Ingestão de alimentos contaminados com BSE
Encefalopatia transmissível de marta	Marta	Adquirida (ingestão); fonte desconhecida

Adaptada de Mabbott e MacPherson, 2006.

1.2 PROTEÍNA PRION CELULAR (PrP^c)

A proteína prion celular é constitutivamente expressa em vários tecidos, como linfócitos, células do estroma de órgãos linfóides, e mais pronunciadamente no cérebro de animais e humanos (revisto por Aguzzi and Polymenidou, 2004). No SNC de adultos os níveis de mRNA para PrP^c são altamente regulados durante o desenvolvimento, e são amplamente distribuídos com particular concentração em neurônios neocorticais e hipocampais, células cerebelares de Purkinje e neurônios motores espinhais (revisto por Harris, 1999).

O gene que codifica PrP^c (denominado de PRNP em humanos e Prnp em camundongos) contém 3 exons em camundongos, ratos, ovelhas e cabras e dois exons em humanos (cromossomo 20), sendo que toda fase de abertura de leitura está contida em um único exon, de modo que PRNP não sofre processamento alternativo (revisto por Prusiner, 1998).

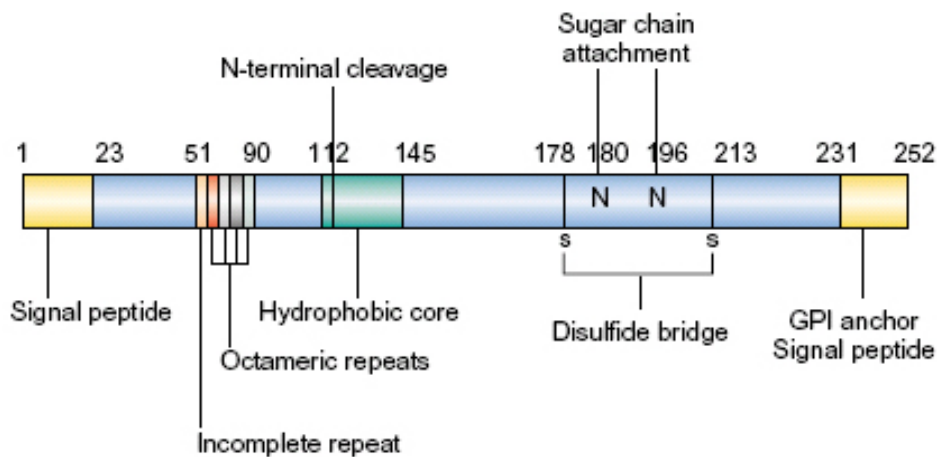
O gene de mamíferos codifica uma proteína de aproximadamente 250 aminoácidos que contém vários domínios distintos, incluindo um peptídeo sinal N-terminal, uma série de octapeptídeos repetidos, ricos em prolina e glicina, um segmento hidrofóbico central e uma região C-terminal que atua como sinal para adição de uma âncora de glicosil-fosfatidilinositol (GPI) (revisto por Harris, 1999). O precursor de PrP^c (Fig. 1a) é direcionado ao lúmen do retículo endoplasmático devido à presença do peptídeo sinal de 22 aminoácidos na região N-terminal. No retículo, ocorre a clivagem deste peptídeo sinal e de um outro contendo 23 aminoácidos localizado na extremidade C-terminal, permitindo a adição da âncora de GPI nesta região. A proteína é então direcionada para o Golgi onde sofre glicosilação dos resíduos de asparagina 180 e 196, bem como adição de ácido siálico nas cadeias oligossacarídicas, e formação de uma única ponte dissulfeto entre os aminoácidos 178 e 213, gerando a proteína madura com conformação adequada que será direcionada para membrana plasmática. A massa molecular de PrP^c pode variar de 18 a 33 Kda de acordo com o seu nível de glicosilação, ou seja, deglicosilada, mono ou diglicosilada (revisto por Brown, 2001).

Em relação à estrutura terciária, análises de cristalografia de Raio-X e espectroscopia de Resonância Magnética Nuclear (RMN) de PrP^c recombinante ou derivada do cérebro revelaram uma estrutura tri-dimensional formada por uma região N-terminal desordenada (resíduos 23-124) e uma região C-terminal (resíduos 125-

228) composta de 3 α -hélices e duas curtas folhas- β adjacentes à primeira α -hélice (revisto por Harris and True, 2006). Esta proteína madura localiza-se na superfície externa da membrana plasmática (Fig. 1b), em domínios ricos em colesterol e esfingomielina, conhecidos como lípidos rafts (Pinheiro, 2006).

Em relação à PrP^{sc}, apesar desta proteína possuir a mesma estrutura primária de PrP^c, exceto nos casos de prions derivados de mutações, sua estrutura terciária tem sido bem mais difícil de ser determinada. Já foi demonstrado que as duas isoformas são muito diferentes em relação à estrutura secundária, com PrP^{sc} contendo uma proporção muito maior de folhas- β do que PrP^c (45% comparado à 3% em PrP^c) (Prusiner, 1998). Entretanto ainda não foi possível resolver a estrutura terciária de PrP^{sc} sobretudo pela alta tendência desta proteína de formar agregados grandes e heterogêneos, que dificultam a análise por técnicas de alta resolução (Harris and True, 2006).

1a)



TRENDS in Neurosciences

1b)

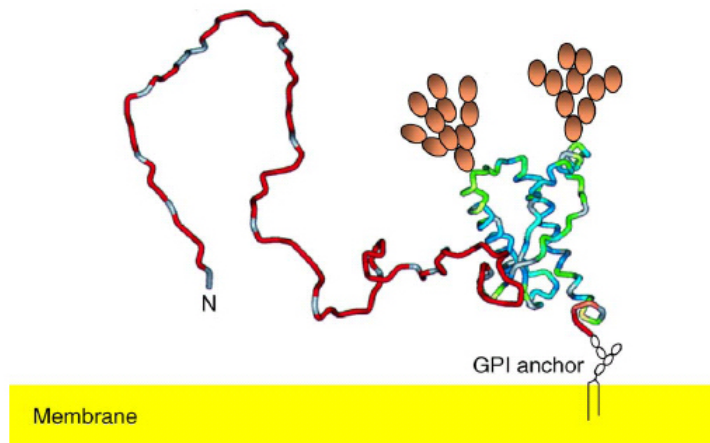


Fig. 1a: **Estrutura primária da proteína PrP^c de camundongo.** A proteína é ancorada por GPI, apresenta um peptídeo sinal para direcionar a entrada no retículo endoplasmático e um sinal para ligação de GPI. PrP^c pode ser glicosilada tanto na asparagina 180 como na 196. A proteína possui ainda um segmento bastante hidrofóbico (aas 112-145) e uma ponte dissulfeto. As quatro seqüências repetitivas (51-90) podem ligar íons cobre e a maioria dos mamíferos apresenta uma seqüência repetitiva extra incompleta (adaptado de Brown, 2001). **1b: Localização de PrP^c na membrana celular.** PrP^c é incorporado no lado externo da membrana plasmática através de sua âncora de GPI. A proteína madura possui um domínio C-terminal enovelado em α -hélices e folha- β anti-paralela (representadas em azul e verde respectivamente); o domínio N-terminal é desordenado, compreendendo quase metade da cadeia polipeptídica (representado em vermelho e cinza). As esferas alaranjadas representam os oligossacarídeos adicionados nos dois sítios de asparagina (adaptado de Pinheiro, 2006).

1.3 FUNÇÕES DA PROTEÍNA PRION CELULAR

A identificação de um estado sub-clínico da infecção por prion, no qual os animais apresentam altos níveis de infectividade sem manifestações clínicas tem levados os pesquisadores a questionarem se a neurodegeneração vista nestas encefalopatias é diretamente causada por PrP^{Sc}. Vários modelos experimentais parecem desacoplar a propagação de prion da neurotoxicidade; de fato, agentes terapêuticos que diminuem o acúmulo de PrP^{Sc} prolongam o período de incubação, mas não previnem a neurodegeneração e morte (Malluci and Collinge, 2005). Embora não se saiba exatamente qual é a forma neurotóxica de prion, sabe-se que a toxicidade e infecção só ocorrem na presença de PrP^C. Esse fato sugere que neurodegeneração por prion possa resultar da perda de função da proteína normal, PrP^C.

A alta homologia e conservação de PrP^C entre as espécies sugerem um papel fisiológico importante para esta proteína, e apesar da sua função não ser completamente esclarecida alguns aspectos da atividade normal de PrP^C já são conhecidos. Já foi demonstrado que PrP^C se liga a íons cobre através de quatro octarepetições peptídicas localizadas na região N-terminal (Brown et al., 1997). Esta capacidade de ligação a íons cobre sugere um papel na homeostasia destes íons e prevenção a danos oxidativos; de fato, já foram publicados trabalhos mostrando que PrP^C possui atividade antioxidante e que a ausência desta proteína torna as células mais susceptíveis ao stress oxidativo (revisto por Haigh and Brown, 2005).

Mouillet-Richard e colaboradores sugeriram que PrP^C possa atuar como uma proteína sinalizadora. Neste trabalho, os autores mostraram que PrP^C ativa a tirosina cinase Fyn em células 1C11 de murinos, de maneira dependente de caveolina-1 (Mouillet-Richard et al., 2000). Alguns anos depois o mesmo grupo mostrou que PrP^C atua como um modulador do acoplamento e “cross-talk” do receptor de serotonina (5-HT) em células serotoninérgicas 1C11^{5-HT}, sugerindo uma regulação da sinalização de receptores acoplados à proteína G (GPCR) por esta proteína (Mouillet-Richard et al., 2005).

Chiarini e colaboradores (2002) mostraram que PrP^C induz sinais neuroprotetores em explantes de retina através da ativação de vias dependentes de cAMP/PKA, mais uma vez implicando PrP^C como uma proteína sinalizadora. Neste trabalho os autores mostraram que a neuroproteção induzida por PrP^C foi mediada por sua interação com um peptídeo, denominado como peptídeo de ligação à PrP^C. Este ligante foi

descoberto por Martins e colaboradores em 1997, e foi posteriormente identificado como uma porção da proteína Stress inducible STI-1 (STI-1), uma co-chaperonina (Zanata et al., 2002). Lopes e colaboradores (2005) mostraram que a interação de PrP^c com a STI-1 induz neuritogênese e neuroproteção através da ativação das via cAMP/PKA e MAPK, respectivamente.

Outro trabalho mostrou que o “cross-linking” de PrP^c por anticorpos específicos causa deslocamento lateral e agregação de PrP^c com as proteínas reggie-1 e reggie-2 (ou flotilina-2 e flotilina-1, respectivamente) presentes em rafts. Este evento resulta no recrutamento de outras proteínas como tirosina cinase Fyn e Lck, aumento da fosforilação de proteínas e polimerização de F-actina. O aumento de cálcio intracelular e ativação de proteína cinase MAP também foram observados, e sugerem que PrP^c exerça um papel importante na transdução de sinal associado a proteínas reggie (Stuermer et al., 2004).

Recentes trabalhos mostraram que PrP^c pode induzir uma potencialização na liberação de acetilcolina em preparações de diafragma (Re et al., 2006) e também regula positivamente a proliferação de precursores neurais durante a neurogênese em mamíferos adultos e em desenvolvimento (Steele et al., 2006). Este trabalho sugere um importante papel de PrP^c na neurogênese e diferenciação neuronal.

Uma outra abordagem utilizada para estudar a função fisiológica de PrP^c foi a geração de camundongos nocautes para esta proteína. De modo geral, os camundongos nocautes para PrP^c são viáveis e saudáveis, e não apresentam defeitos óbvios nas funções bioquímicas e neurofisiológicas (Keshet et al., 1999; Mallucci et al., 2002). Algumas das linhagens geradas, após algumas semanas de vida, desenvolveram uma progressiva degeneração das células cerebelares de Purkinje com ataxia na idade mais avançada (Sakaguchi et al., 1996; Rossi et al., 2001; Moore et al., 1999). Esse fenótipo foi originalmente atribuído a ausência de PrP^c, entretanto, David Westaway's mostrou que na verdade a remoção de gene Prnp leva a uma expressão aumentada de um gene “downstream” a Prnp que codifica uma proteína neurotóxica, a proteína Doppel (Moore et al., 1999). O mais interessante, porém, é que a neurodegeneração dependente de Doppel é abolida em células que expressam PrP^c, indicando que estas duas proteínas podem competir por um comum ligante ou receptor envolvido na transdução de sinais neuroprotetores quando ligado a PrP^c (revisto por Mallucci and Collinge, 2005).

Desde então vários grupos de pesquisa se concentram na identificação de potenciais ligantes de PrP^c. Alguns já foram identificados, como por exemplo a laminina. Graner e colaboradores (2000) demonstraram que a interação entre PrP^c – laminina promove neuritogênese em células PC-12 e culturas primárias de neurônios hipocâmpais. Hajj e colaboradores (dados não publicados) mostraram que PrP^c interage com a vitronectina, uma proteína de matriz extracelular envolvida em processos de adesão, induzindo crescimento axonal no gânglio da raiz dorsal de embriões de camundongo. Um outro importante ligante descoberto é a Stress Inducible Protein 1 (STI-1), cuja interação com PrP^c induz a neuritogênese e neuroproteção, novamente sugerindo um importante papel de PrP^c na diferenciação neuronal (Lopes et al., 2005). Este ligante será posteriormente descrito com mais detalhes.

Vários estudos deverão ser desenvolvidos para esclarecer melhor o papel da proteína prion celular no organismo, mas todas as atividades relacionadas a esta proteína descritas anteriormente nos leva a pensar na possibilidade de que PrP^c exerça um papel chave nas doenças priônicas. Portanto o melhor entendimento destas funções é de fundamental importância para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

1.4 INTERNALIZAÇÃO DE PROTEÍNAS

A endocitose é caracterizada pela internalização de moléculas da superfície da membrana. Este processo tem um papel essencial no direcionamento de componentes de membrana, de ligantes associados a receptores e moléculas solúveis para destinos intracelulares específicos, com o objetivo de manter a homeostasia celular (Maxfield and McGraw, 2004).

Existem vários mecanismos de endocitose (Fig 2). Dentre eles, o processo mais bem caracterizado até hoje é o que envolve a internalização de receptores e seus ligantes por vesículas cobertas por clatrina (CCV). A unidade funcional destas vesículas é o triesqueleto, que é formado por três cadeias pesadas de clatrina (180 KDa cada cadeia), cada uma delas complexada a uma cadeia leve de 30-35 KDa (Mellman, 1996).

As proteínas adaptadoras (Aps) se ligam aos triesqueletos e também a motivos especializados no domínio citoplasmático de proteínas de membrana, dessa forma conectando a carga a ser endocitada com a clatrina (revisto por Maxfield and MacGraw, 2004). Existem vários adaptadores para clatrina e dentre eles os mais bem caracterizados são os complexos AP1 e AP2. Estes complexos são formados por quatro subunidades denominadas adaptinas. AP2 possui as cadeias α , β_2 , μ_2 e σ_2 , e está relacionado com complexos localizados na membrana plasmática. AP1 possui as cadeias γ , β_1 , μ_1 e σ_1 , e está relacionado com proteínas da rede trans-Golgi (TGN) que deixam o Golgi através de vesículas cobertas por clatrina (Mellman, 1996).

Além desses complexos existem outros adaptadores que medeiam a endocitose via clatrina, como por exemplo a Epsina, AP180, β -arrestina e outros (González-Gaitan and Stenmark, 2003). Os fosfolípidos também são muito importantes na endocitose via clatrina. Já foi demonstrado que o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PtdIns(4,5)P₂) e o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PtdIns(3,4,5)P₃) estão envolvidos na endocitose constitutiva e estimulada desta via. Além disso, muitas das proteínas adaptadoras interagem com estes lípidos, como a Epsina e Dab2, dessa forma, cinases lipídicas e fosfatases também têm um importante papel na formação de vesículas (revisto por Le Roy and Wrana, 2004; revisto por Mousavi et al., 2004).

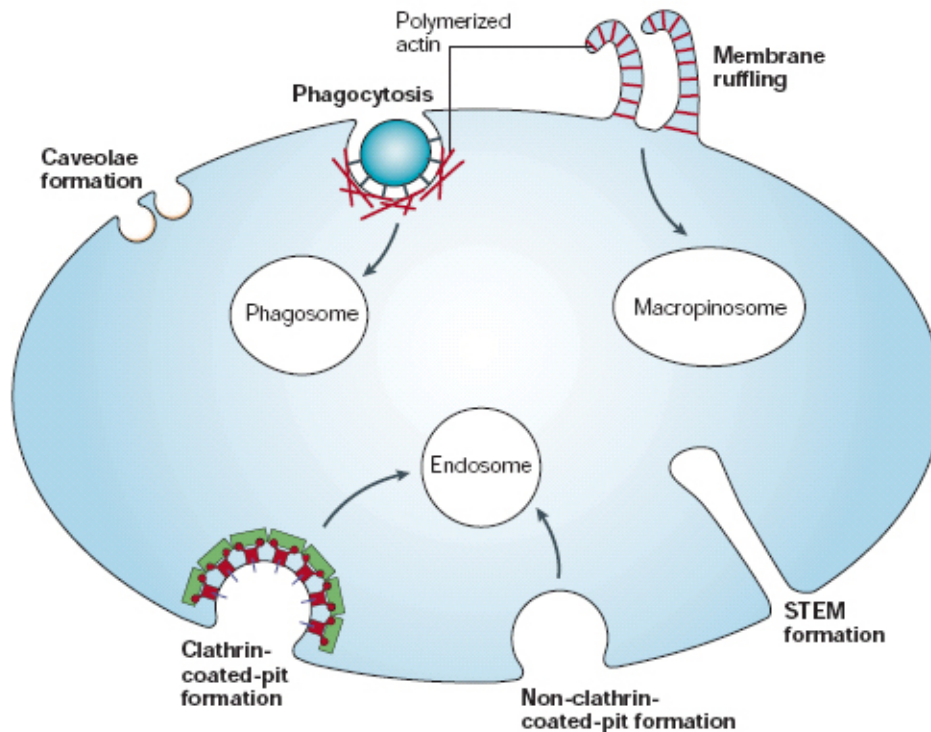


Figura 2: **Mecanismos de endocitose.** Existem várias vias de internalização, a mais bem caracterizada é a via dependente de clatrina, que leva à formação de vesículas cobertas através da interação de proteínas de membrana com adaptadores. As ondulações da membrana podem levar à formação de largos compartimentos endocíticos, os macropinosomos, em um processo inespecífico de internalização. A fagocitose ocorre através do englobamento de grandes partículas, sendo mais comum em células especializadas como os macrófagos. Nestas células também ocorre a formação do STEM (do inglês surface-connected tubules entering macrophages), que tem um papel na captação de grandes partículas de lipoproteínas. O caveolae consiste em um mecanismo independente de clatrina mas dependente de lípides rafts e dinamina. Além destes existem vias de endocitose independentes de clatrina, mas sem um marcador estabelecido (adaptado de Maxfield and MacGraw, 2005)

De modo geral, os receptores e outras proteínas de membrana que seletivamente se acumulam nas invaginações revestidas possuem motivos protéicos específicos em seus domínios citoplasmáticos que são reconhecidos pela maquinaria de endocitose via clatrina (revisto por Trowbridge et al, 1993). Dessa forma, através de interações proteína-proteína, esses motivos recrutam os complexos adaptadores, que por sua vez recrutam os esqueletos de clatrina formando as invaginações cobertas. Estas invaginações sofrem ação de uma GTPase (dinamina), que através de sua regulação dos filamentos de actina promove a fissão do “pescoço” dessas invaginações levando à liberação de vesículas cobertas por clatrina para o citoplasma (Damke et al., 1994).

Esta via é conhecida como via clássica de endocitose, sendo responsável também pela internalização de nutrientes, patógenos, antígenos e fatores de crescimento (revisto por Le Roy and Wrana, 2005). Mas vários trabalhos utilizando o bloqueio genético ou farmacológico da formação de CCVs mostraram que existem outras vias de endocitose, denominadas vias independentes de clatrina (revisto por Melman, 1996; Simons and Ikonen, 1997; Nichols et al., 2001; Puri et al., 2001; Pelkmans et al., 2001) (Fig2). Estas vias são sensíveis à depleção de colesterol, o que tem levado aos pesquisadores a sugerirem que sejam vias dependentes de lípidos “rafts” (Parton and Richards, 2003).

Propostos há mais de quinze anos atrás, os lípidos “rafts” foram originalmente definidos como sendo frações da membrana insolúveis em detergente Triton X-100 a 4 °C (Brown and Rose, 1992; revisto por Simons and Ikonen, 1997). Atualmente, sabe-se que estas estruturas formam microdomínios altamente dinâmicos na membrana plasmática, e estão envolvidos no tráfego e sinalização de diversas moléculas (revisto por Simons and Toomre, 2000). Uma das mais importantes propriedades dos lípidos “rafts” é a sua capacidade de excluir e incluir vários tipos de proteínas. Proteínas com afinidade por estes microdomínios incluem as proteínas ancoradas por GPI (Brown and Rose, 1992), tirosinas cinases duplamente aciladas como da família Src e subunidade α das proteínas G heterotriméricas (Resh, 1999), proteínas palmitoiladas como Hedgehog e outras (revisto por Simons and Toomre, 2000). Tem sido proposto que os lípidos “rafts” sejam fundamentais na endocitose independente de clatrina (revisto por Le Roy and Wrana, 2005).

Dentro das conhecidas rotas endocíticas independente de clatrina temos a fagocitose, a captação mediada por caveolae, a macropinocitose e a captação

constitutiva não-clatrina. Especula-se que estes mecanismos não utilizam interações proteína-proteína para concentrar receptores ou revestir vesículas; basicamente eles exploram diferenças na composição de lípidos e proteínas de membrana (revisto por Nichols and Lippincott-Schwartz, 2001).

A fagocitose é um processo no qual grandes partículas ($> 0.5 \mu\text{m}$) são internalizadas pelas células. A captação é tipicamente disparada pela ligação destas partículas a receptores de superfície celular capazes de transduzir um estímulo fagocítico. Este estímulo resulta na polimerização localizada de actina e subsequente extensão de pseudópodes que englobam a partícula ligada formando um fagossoma citoplasmático. Em mamíferos, esta via atua como uma primeira linha de defesa contra microorganismos, e também no processamento e apresentação de antígenos derivados de bactérias para linfócitos T, sendo portanto um importante componente da resposta imune humoral (Mellman, 1996; Nichols and Lippincott-Schwartz, 2001).

A macropinocitose envolve a internalização de extensas áreas da membrana plasmática junto com significantes quantidades de fluidos. Este tipo de captação parece refletir uma captura passiva de fluidos extracelulares, e ocorre quando ondulações da membrana plasmática ('ruffling') se fundem novamente com a mesma para gerar vesículas largas ($> 1 \mu\text{m}$) e irregulares denominadas macropinosomas. Estas ondulações da membrana são formadas por um extensivo rearranjo de actina, sendo independentes da atividade de dinamina, e são enriquecidas de lípidos rafts específicos e fosfoinosítídeos (Mellman, 1996; Kirkham and Parton, 2005). Além disso, estes prolongamentos são regulados pela GTPase ARF6, que induz uma produção localizada de fosfatidilinositol bifosfato ($\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$) por ativação da fosfatidilinositol 4-fosfato 5-cinase na membrana plasmática. Estes mediadores então exercem um papel regulatório na macropinocitose (revisto por Nichols and Lippincott-Schwartz, 2001). Por ser um processo inespecífico, esta via é utilizada por alguns vírus para entrarem dentro das células (revisto por Pelkmans and Helenius, 2003).

Caveolae são invaginações em forma de garrafa na membrana plasmática de muitos tipos celulares, como adipócitos, fibroblastos, células do músculo liso e endoteliais. Bioquimicamente estes domínios são caracterizados pelo acúmulo da proteína caveolina, que faz parte de uma família de proteínas de ligação ao colesterol (Mellman, 1996; Nichols and Lippincott-Schwartz, 2001). A expressão de caveolinas em células pode ser correlacionada com o aparecimento de caveolae, o que mostra a importância destas proteínas na formação e manutenção dos mesmos (Fra et al., 1995). A endocitose via caveolae compartilha algumas características com a via dependente de clatrina, como o processo de fissão, mas diferente da associação dinâmica de clatrina com a membrana plasmática; os caveolae formam associações estáveis e de lenta motilidade (Pelkmans and Helenius, 2003; revisto por Kirkham and Parton, 2005). Estudos da dinâmica do sistema caveolar mostraram que esta motilidade relativamente baixa dos caveolae é dependente dos filamentos de actina, mas existem vesículas positivas para caveolina de rápido movimento no citoplasma devido a atuação da rede de microtúbulos (Le Roy and Wrana, 2005). Esta via está envolvida na entrada de vírus não envelopados como o vírus SV40, e na endocitose de moléculas como a cólera toxina, o ácido fólico, o fator de motilidade autócrino, entre outras (Pelkmans et al., 2001; revisto por Rajendran and Simons, 2005).

Além dos caveolae existem outros mecanismos “não-clássico”, dependentes de lípidos “rafts” mas que são independentes de dinamina. Estes mecanismos ainda são pouco esclarecidos, mas parece ser uma via constitutiva envolvida no direcionamento de marcadores de lípidos rafts e lípidos da membrana plasmática para o aparato de Golgi (revisto por Nichols and Lippincott-Schwartz, 2001). Já foi demonstrado que proteínas como o receptor β de interleucina-2, a subunidade B da cólera toxina e proteínas ancoradas por GPI utilizam esta via endocítica (revisto por Le Roy and Wrana, 2005).

Recentemente, Glebov e colaboradores (2006) mostraram que a flotilina 1 (um marcador de lípidos “rafts”) está envolvida em uma via endocítica independente de clatrina, de caveolae e de dinamina. Neste trabalho os autores mostram, através de microscopia eletrônica, que a flotilina 1 está presente em regiões da membrana plasmática distintas daquelas contendo invaginações cobertas por clatrina. Além disso, o bloqueio da expressão de dinamina não alterou a endocitose de vesículas

positivas para flotilina. Com base nestes resultados, os autores propõem a existência de uma nova via endocítica dependente de flotilina-1.

1.5 TRÁFEGO DE PROTEÍNAS APÓS ENDOCITOSE

Uma vez endocitadas, as moléculas de superfície são direcionadas para organelas específicas. As principais organelas endocíticas são os endosomas de distribuição, os endosomas de reciclagem, os endosomas tardios e os lisosomas. Estas estruturas são extremamente dinâmicas de modo que é praticamente impossível identificá-las com base na sua morfologia ou posição no citoplasma (Mellman, 1996). Dessa forma a identificação destas estruturas é feita através de marcadores específicos, que normalmente são moléculas envolvidas nas funções desta organelas ou moléculas carregadas por elas.

Um importante grupo de marcadores são as proteínas Rab. Estas proteínas são GTPases envolvidas na biogênese, fusão e maturação endosomal, e regulam o transporte vesicular na endocitose e exocitose (Schimmoller et al, 1998). Mais de 60 tipos de Rab já foram identificados em células humanas (revisito por Pfeffer and Aivazian, 2004); cada uma delas pode estar associada à membrana de compartimentos distintos, o que permite a identificação destas organelas (Pfeffer, 2001).

Os endosomas primários (endosomas de distribuição e de reciclagem) são responsáveis pela separação física das moléculas e correta distribuição das mesmas para outras organelas. Eles representam um sítio comum a várias vias endocíticas, sendo nestas vias as primeiras organelas a receberem a carga internalizada (revisito por Mellman, 1996). Os endosomas de distribuição (ED) são estruturas túbulo-vesiculares localizadas periféricamente, com pH luminal de levemente ácido (~ 6.0) (Johnson et al., 1993). Como consequência de seu baixo pH luminal muitos ligantes são liberados de seus receptores nesta organela, e este constitui o primeiro passo do evento de distribuição (Murkerjee et al., 1997). Os receptores e as porções da membrana juntamente com suas proteínas que foram endocitados são direcionados para a região tubular destes endosomas, enquanto os ligantes permanecem na região vesicular (Maxfield and MacGraw, 2004). É importante ressaltar que esta distribuição é feita com base na geometria destas organelas e não depende de interações proteína-proteína. Estes endosomas se translocam ao longo dos

microtúbulos e durante este percurso eles direcionam seu conteúdo tubular para os endosomas de reciclagem e seu conteúdo vesicular para os endosomas tardios (Maxfield and McGraw, 2004). O principal marcador destes endosomas é a proteína Rab5, que juntamente com a proteína EEA1 (do inglês “early endosomal antigen 1”) auxiliam na fusão de vesículas endocíticas primárias (derivadas de vesículas cobertas) com endosomas de distribuição pré-existentes. Estas proteínas e seus efetores (complexo SNARE) também promovem a fusão homotípica destes endosomas, e já foram implicadas na regulação da endocitose dependente de clatrina e de fase fluida (revisito por Rodman and Wandinger-Ness, 2000; Galperin and Sorkin, 2003; Maxfiel and MacGraw, 2004). Rab4 é um outro marcador que controla o fluxo de proteínas que saem destes endosomas diretamente para a membrana plasmática. Esta Rab também regula a reciclagem de moléculas originadas dos endosomas de reciclagem (revisito por Rodman and Wandinger-Ness, 2000).

Os endosomas de reciclagem (ER) são constituídos por várias organelas tubulares de aproximadamente 60 nm de diâmetro que estão associadas com microtúbulos (Maxfiel and MacGraw, 2004). A distribuição destes compartimentos varia de acordo o tipo celular, mas já foi demonstrado que parte destas estruturas estão próximas à membrana plasmática, e parte é translocada ao longo dos microtúbulos para regiões perinucleares (revisito por Mellman, 1996). Estes endosomas podem direcionar as moléculas recebidas para vários destinos diferentes, mas a maior partes delas retorna para a membrana plasmática. Um importante destino é o direcionamento de algumas proteínas como o TGN38 para a rede trans-Golgi (Maxfiel and MacGraw, 2004). Os ERs também paticipam da reciclagem de lípidos de volta à membrana plasmática, auxiliando assim na manutenção da mesma. O principal marcador desta população de endosomas é proteína Rab11. Esta proteína se acumula nos ERs e parece ter um papel na homeostase dos mesmos, além de controlar a saída de vesículas para a membrana plasmática e também o tráfego de vesículas originadas no Golgi com passagem por estes endosomas (revisito por Somsel Rodman and Wandinger-Ness, 2000).

Apesar dos endosomas primários serem considerados como uma estação inicial de distribuição de proteínas endocitadas, Lakadamyali e colaboradores (2006) mostraram recentemente a existência de estruturas que precendem a formação destes endosomas, denominadas pré-endosomas primários. Neste trabalho os

autores mostraram que algumas proteínas destinadas à degradação são direcionadas para endosomas primários mais dinâmicos e de mais rápida maturação; enquanto as proteínas destinadas à reciclagem são direcionadas principalmente para endosomas primários mais estáticos e de maturação mais lenta. Diante deste resultado, novos estudos deverão ser realizados para melhor caracterizar estas organelas da via endocítica

Os endosomas tardios (ET) são mais comumente formados a partir do amadurecimento dos endosomas de distribuição. Este amadurecimento é caracterizado pela diminuição do pH luminal e o bloqueio da fusão dos EDs com vesículas recém endocitadas (Maxfiel and MacGraw, 2004). Dessa forma, os ETs são normalmente formados 4-30 minutos após a captação endocítica em células de mamíferos (Piper and Luzio, 2001). Vistos através de microscopia eletrônica, os ETs são mais esféricos que os EDs e se localizam na região perinuclear, sendo concentrados próximos ao centro de organização dos microtúbulos (Piper and Luzio, 2001). Além disso, eles são diferenciados dos endosomas primários por seu pH luminal mais baixo, pela diferente constituição protéica e associação com outras proteínas Rab (revisado por Rodman and Wandinger-Ness, 2000). Estas organelas recebem proteínas da TGN, que normalmente são enzimas constituintes do compartimento lisosomal. Como os ETs sofrem fusão heterotípica com lisosomos, eles entregam eficientemente estas enzimas e também a carga destinada à degradação para estas organelas (Luzio et al., 2000; Mullins and Bonifacino, 2001).

Uma característica importante dos endosomas tardios é a presença de membranas internas. Por esta razão, estas organelas também são referidas como corpos multivesiculares (MVBs). É sugerido que o acúmulo de membranas internas se inicia nos endosomas primários, e continua ao longo do processo de maturação (Piper and Luzio, 2001). Como descrito anteriormente, a maior parte dos ETs ou MVBs se fundem com lisosomas pré-existentes para degradar seus conteúdos. Porém os MVBs podem se fundir com a membrana plasmática, liberando vesículas para o meio extracelular. Estas vesículas foram denominadas como exosomos, e sua secreção foi observada inicialmente em reticulócitos, células apresentadoras de antígenos, células do epitélio intestinal e tumorais (Fevrier and Raposo, 2004; They et al., 2002). Fauré e colaboradores (2006) mostraram que exosomos são liberados por neurônios e células gliais, propondo que estas estruturas possam exercer um papel regulatório nas sinapses e atuar na comunicação celular.

Um interessante trabalho mostrou que células gliais são capazes de secretar PrP^c e PrP^{sc} em associação com exossomos, e que os exossomos contendo PrP^{sc} são infecciosos (Frevier et al., 2004). Rajendran e colaboradores (2006) mostraram que os MVBs secretam peptídeos A β via exossomos, e que proteínas exossomais acumularam-se em placas no cérebro de pacientes com Alzheimer. Portanto, estas estruturas podem estar envolvidas na formação da placa amilóide e consequentemente na propagação desta patologia no SNC.

Em relação aos marcadores dos ETs, algumas proteínas Rab como a Rab9 e Rab7 são extremamente importantes para estas organelas, porém elas também são comuns a outras estruturas. A Rab9 está presente nos endossomas tardios e também na TGN, sendo responsável pelo transporte de vesículas dos ETs para o Golgi (Bucci et al., 2000). A Rab7 controla a agregação e fusão de endossomas tardios e lisosomas, sendo essencial para manutenção e biogênese do compartimento lisosomal (Bucci et al., 2000). Além destas, outras proteínas como Igp e lamps, são marcadores comuns a ETs e lisosomas; sendo somente o receptor de manose-6-fosfato (MPR) independente de cátion presente apenas nos endossomas tardios (revisado por Mellman, 1996). Dessa forma, os lisosomas podem ser distinguidos pela ausência de MPR independente de cátion e por sua mais alta densidade em gradiente de percol. Eles constituem o sítio final de acumulação de moléculas internalizadas destinadas à degradação, e possuem várias enzimas, sobretudo hidrolases ácidas, que requerem um baixo pH luminal (revisado por Mellman, 1996).

Além destas, outras organelas foram identificadas recentemente, juntamente com as novas vias endocíticas as quais estão relacionadas (Pelkmans et al., 2001; Nichols, 2002; Glebov et al., 2006; Lakadamyali et al., 2006). Portanto, apesar de algumas organelas clássicas serem comuns a diferentes vias, o destino final das moléculas internalizadas dependerá da via endocítica utilizada pelas mesmas.

De modo geral as proteínas internalizadas via clatrina, como transferrina e seu receptor, são primeiramente direcionadas para endossomas de distribuição. Proteínas de membrana e os receptores presentes nestas organelas são direcionados para membrana plasmática de forma direta ou passando primeiro pelos endossomas de reciclagem. Os ligantes do conteúdo vesicular são direcionados para endossomas tardios e daí para o Golgi ou para lisosomas onde serão degradados (Maxfield and McGraw, 2004) (Fig. 3).

Já as proteínas ou lípidos internalizados por vias independentes de clatrina, mas dependentes de lípidos “rafts”, podem ser direcionados para organelas comuns da via clássica, como endosomas primários ou de reciclagem, e/ou para organelas específicas (Pol et al., 2000; Pelkmans et al., 2004) (Fig. 4).

No caso de moléculas internalizadas via caveolae, algumas delas como o vírus SV40, podem ser entregues para caveossomos, e então direcionadas para o retículo endoplasmático (revisto por Rajendran and Simons, 2005). Outras, como a CTxB, são endocitadas por estruturas positivas para caveolina1 e direcionadas para o complexo de Golgi (Nichols, 2002). E outras, como o TGF β R, vão para as organelas da via clássica a partir dos caveolae. Nas vias dependentes de rafts mas independentes de dinamina, proteínas como as proteínas ancoradas por GPI, podem ser entregues para os GEECs (compartimentos endosomais primários enriquecidos com proteínas ancoradas por GPI) e então direcionadas para os endosomas de reciclagem e conseqüentemente para a membrana plasmática. Esta via acumula também marcadores da fase fluida como o Dextran e o receptor de folato (revisto por Rajendran and Simons, 2005).

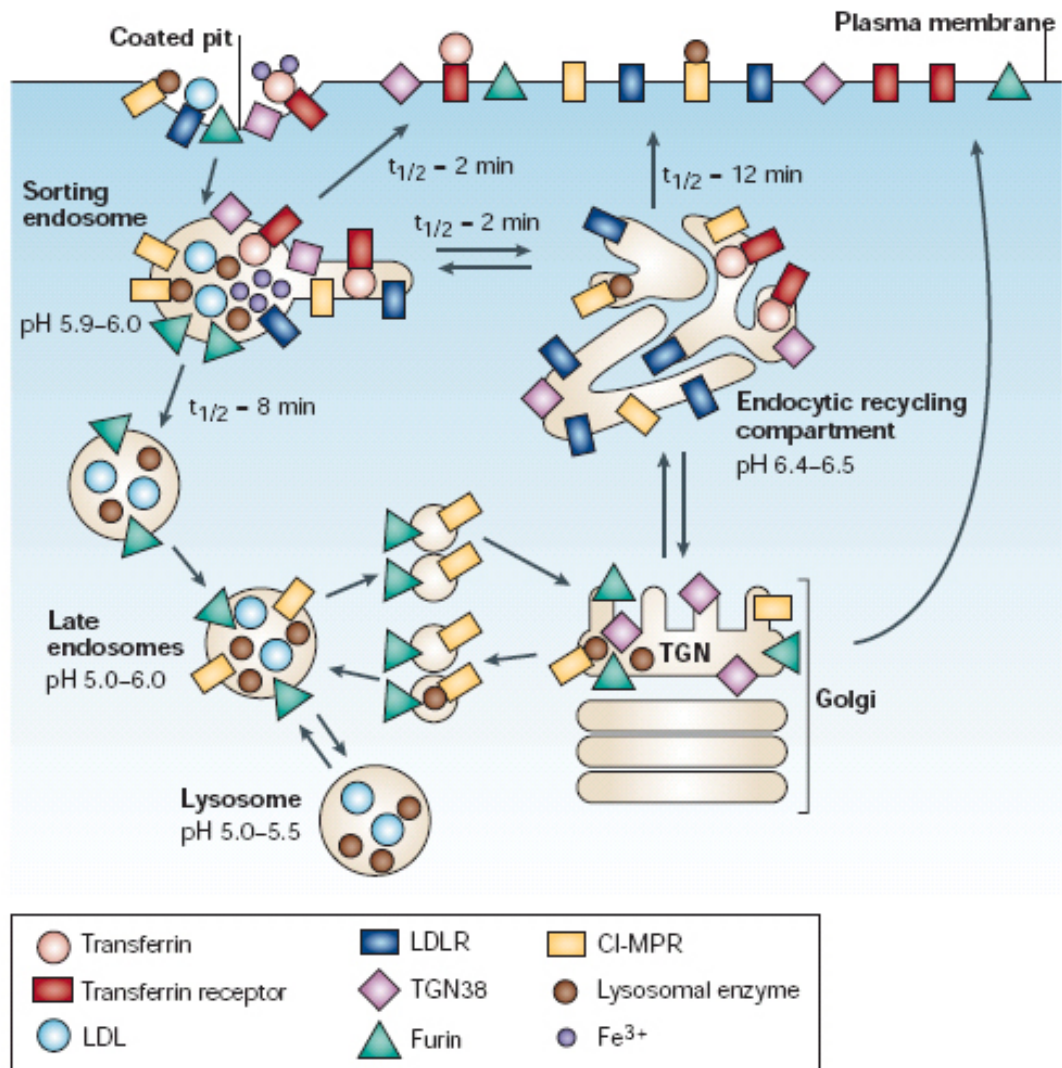


Figura 3: **Endocitose pela via clássica.** Proteínas como receptor de transferrina, receptor de lipoproteína de baixa densidade e o receptor de manose-6-fosfato ao serem ativados por seus ligantes, são concentrados em vesículas cobertas por clatrina e inicialmente entregues para endosomas de distribuição. As proteínas de membrana são então direcionadas para os endosomas de reciclagem (ERC) ou voltam diretamente para a membrana. A partir dos endosomas de distribuição, os ligantes são direcionados para endosomas tardios, enquanto dos ERCs essencialmente todos os receptores voltam para a membrana plasmática. A partir dos endosomas tardios e dos ERCs algumas moléculas podem ser conduzidas para a rede trans Golgi (TGN), como furina e TGN38 respectivamente. Outras moléculas são direcionadas aos lisosomas para serem degradadas. Os valores de $t_{1/2}$ são aproximados e dependentes do tipo celular (adaptado de Maxfield and MacGraw, 2004).

Na fagocitose, o conteúdo da maior parte dos fagosomos se funde com endosomos e/ou lisosomos. E na macropinocitose, o conteúdo dos macropinosomos são entregues para lisosomos ou são reciclados (revisado por Mellman, 1996).

Todos estes exemplos ilustram a complexidade das vias endocíticas, que ainda estão longe de serem completamente entendidas. Mas tendo em vista a relevância fisiológica e patológica da endocitose, grandes esforços estão sendo aplicados para o melhor entendimento deste processo. A endocitose reflete o comportamento celular frente ao meio externo, e a compreensão deste processo implica em uma melhor compreensão da comunicação celular.

1.6 INTERNALIZAÇÃO E TRÁFEGO DE PrP^c E PrP^{sc}

O mecanismo pelo qual PrP^c é endocitado pela célula ainda é alvo de debate. Sabe-se que PrP^c cicla constitutivamente entre compartimentos intracelulares e a membrana plasmática, porém o papel biológico de sua internalização é desconhecido (Campana et al., 2005).

Proteínas ancoradas por GPI, como PrP^c, se associam com lípidos rafts, residindo nestes domínios na membrana plasmática (Mayor and Riezman, 2004). Já foi demonstrado que estas proteínas podem ser endocitadas via clatrina se elas forem capazes de se ligar a receptores transmembrana que possuem os motivos protéicos necessário para recrutamento desta maquinaria (Nykjaer et al., 1992; Conese et al., 1995; Czekay et al., 2001). Um exemplo clássico é a interação entre o receptor de urocina (uPAR, que é ancorado por GPI), e a proteína relacionada ao receptor da lipoproteína de baixa densidade (que é uma proteína transmembrana que interage com adaptadores), que induz a endocitose via clatrina (Nykjaer et al., 1994). Além desta possibilidade, já foi demonstrado que proteínas ancoradas por GPI podem ser internalizadas por vias independentes de clatrina (Mayor and Riezman, 2004). Também foi proposta uma via específica para estas proteínas (Sabharanjak et al., 2002).

No caso de PrP^c, Sunyach e colaboradores (2003) mostraram que a internalização desta proteína não é determinada pela presença da âncora de GPI. De acordo com este trabalho, PrP^c deixa os domínios "rafts" e é deslocado para regiões

da membrana sem “rafts”, sendo endocitada por vesículas cobertas de maneira dependente da região N-terminal. Taylor e colaboradores (2005) confirmaram estes resultados, mostrando que íons cobre se ligam aos octapeptídeos repetidos de PrP^c, promovendo sua dissociação dos lípidos rafts, ao mesmo tempo que a região polibásica N-terminal se associa com um adaptador transmembrana promovendo sua endocitose pela via dependente de clatrina. Outros experimentos utilizando PrP^c-GFP mostraram que esta proteína é internalizada por uma via dependente de dinamina, sendo direcionada para endosomas primários Rab5 positivos (Magalhães et al., 2002). Conjuntamente, estes resultados sugerem que PrP^c é internalizado pela via clássica (Fig 5).

Magalhães, na sua tese de Doutorado (2005) mostrou que a co-transfecção de células SN56 com PrP^c-GFP e um mutante dominante negativo de dinamina altera a distribuição de PrP^c-GFP e prejudica a internalização desta proteína induzida por cobre. Já a co-transfecção com AP180-C (um inibidor específico da endocitose mediada por clatrina), não altera a distribuição de PrP^c-GFP, e diminui apenas parcialmente sua endocitose induzida por cobre. Estes resultados sugerem que outras vias independentes de clatrina estão envolvidas na internalização de PrP^c, possivelmente alguma outra via dependente de dinamina, como os caveolae.

Foi demonstrado que PrP^c é encontrado em domínios do tipo caveolae em células N2a, embora a expressão de caveolina nestas células seja controversa. Em células CHO (do inglês Chinese hamster ovary cells) que expressam caveolina, também foi demonstrado que PrP^c é internalizado através de uma via endocítica dependente de caveolae, e se localiza com marcadores de endosomas tardios e lisosomas (Peters et al., 2003) (Fig. 5).

Apesar destes dados sugerirem os caveolae como uma via constitutiva para a endocitose de PrP^c, eles são questionáveis. Já foi demonstrado que proteínas ancoradas por GPI, que não são constitutivamente encontradas em caveolae, podem ser deslocadas para estes domínios na presença de fixadores (Mayor and Riezman, 2004). Além disso, tendo em vista que os caveolae não são expressos em neurônios em mamíferos adultos, esta pode ser uma via irrelevante para o tráfego de prions nestas células (Morris et al., 2006). Portanto, novos estudos deverão ser desenvolvidos para validar a utilização desta via por PrP^c, e avaliar sua relevância fisiológica sobretudo em células gliais, que expressam estes domínios.

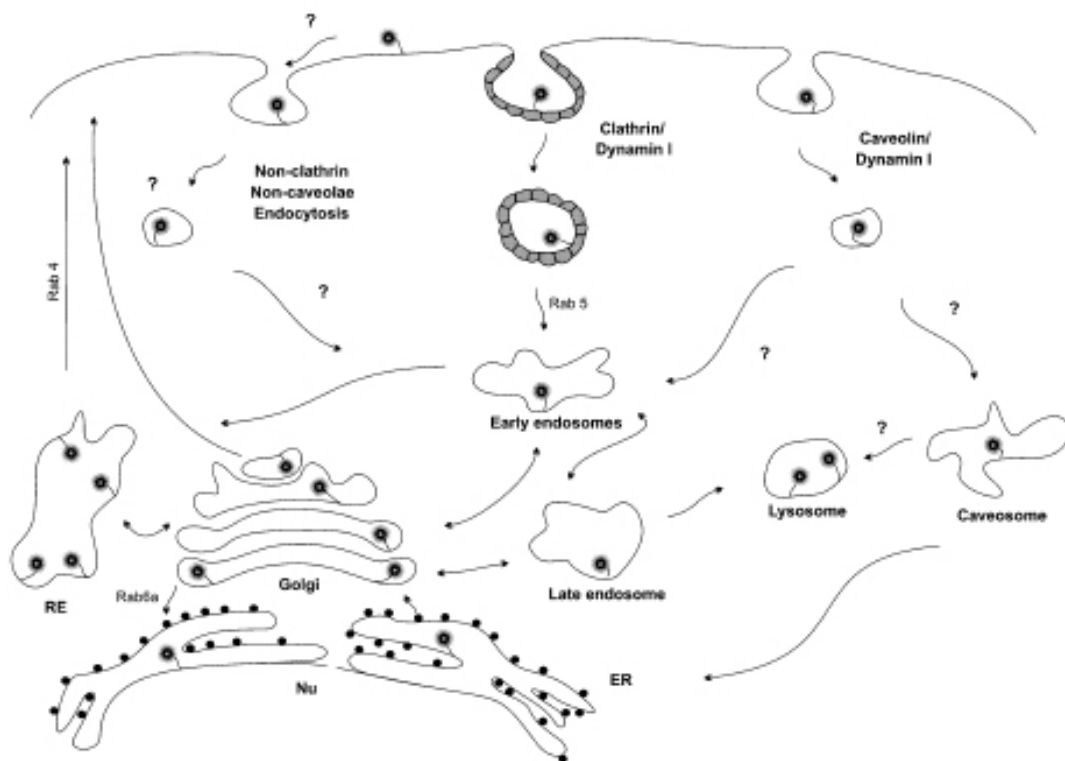


Figura 5: **Endocitose e localização subcelular de PrP^c.** É proposto que PrP^c siga a mesma via biossintética que as outras proteínas ancoradas por GPI, sendo direcionada do ER (retículo endoplasmático) para o Golgi e deste para membrana plasmática. Da membrana, PrP^c pode ser constitutivamente internalizado através de vias dependentes e independentes de clatrina. Em neurônios, já foi demonstrado a presença de PrP^c em endosomas positivos para Rab5 e Golgi, e a presença de PrP^{sc} em endosomas tardios/lisossomas. A conversão de PrP^{sc} em PrP^c parece ser influenciada pelas GTPases Rab6a, envolvida no transporte retrógrado para o ER, e Rab4, envolvida na reciclagem de PrP^c para a membrana, representadas no esquema acima (adaptado de Prado et al., 2004).

Em relação à PrP^{Sc}, estudos em células de neuroblastoma infectados com scrapie mostraram que esta proteína é encontrada na superfície celular ou em endosomas, podendo ser sequestrada por lisosomas (Caughey and Raymond, 1991; Caughey et al., 1991; McKinley et al., 1991; Borchelt et al., 1992). Outros estudos mostraram que PrP^{Sc} é localizada em estruturas do tipo caveolae, em endosomas tardios e lisosomas, no retículo endoplasmático e no núcleo (Caughey et al., 1991; Harris, 1999; revisto por Pimpinelli et al., 2005).

Um trabalho recente utilizando PrP^{Sc} marcado com corante fluorescente mostrou que os agregados infecciosos foram internalizados por células SN56 e neurônios em cultura primária. Estes agregados internalizados foram direcionados para endosomas tardios e lisosomas, sendo transportados ao longo dos neuritos. A ausência de PrP^{Sc} em endosomas primários associada à alta colocalização com marcadores de endocitose de fase fluida, sugeriram que a internalização desta proteína infecciosa ocorra por um mecanismo inespecífico como a macropinocitose (Magalhães et al., 2005).

Pimpinelli e colaboradores (2005) também mostraram que PrP^{Sc} segue uma rota endocítica diferente de PrP^C. Neste trabalho os autores mostraram que em células neuronais GT1-7 PrP^{Sc} é encontrado em vesículas positivas para Flotilina 1, e não passa por endosomas primários. Algumas destas vesículas também foram positivas para o marcador de endosomas tardios/lisosomas LAMP-1, sugerindo que estes compartimentos estejam diretamente envolvidos com o tráfego de PrP^{Sc}.

Várias especulações têm sido feitas a respeito dos locais envolvidos na conversão de PrP^C a PrP^{Sc}. A caracterização da exata localização intracelular de PrP^{Sc}, PrP^C bem como de seus ligantes, é importante para a identificação de compartimentos intracelulares e moléculas envolvidos na formação de prion.

1.7 STI-1 (STRESS INDUCIBLE PROTEIN 1)

A STI-1 é uma co-chaperona homóloga a proteína organizadora da HSP70 e HSP90 -(Hop)- em humanos, envolvida no enovelamento de proteínas recém formadas.

As chaperonas são proteínas que atuam no enovelamento e estabilização de polipeptídeos recém sintetizados. Além disso, elas também atuam no direcionamento de proteínas mal enoveladas para degradação (McClellan et al., 2005). A principal família de chaperonas moleculares são as proteínas de choque térmico (Hsps) que são classificadas de acordo com sua massa molecular em kDa. A proteína de choque térmico de 70 KDa (HSP70) reconhece curtas extensões de polipeptídeos hidrofóbicos que estão em uma conformação linear, auxiliando-os a adotar e manter conformações nativas (Young et al., 2004). Ela também atua durante alguns processos celulares nos quais as proteínas estão parcialmente enoveladas, como transporte através da membrana, e protege as células do stress por prevenir a agregação de proteínas (Song and Masison, 2005). Desde leveduras a mamíferos, a proteína de choque térmico de 90 KDa (HSP90) atua no enovelamento de diversos grupos de proteínas como fatores de transcrição, cinases regulatórias entre outras.

A atividade do complexo HSP70-HSP90 é modulada por um grande número de outras proteínas, que interagem diretamente e especificamente com uma ou com as duas chaperonas (Young et al., 2004). Dentre estes co-fatores, chamados co-chaperonas, está a Hsp40, que interage com as proteínas 'clientes' direcionando-as para HSP70. Em seguida, a STI-1 ou Hop se liga simultaneamente à HSP70 e HSP90 aproximando estas duas chaperonas para que o substrato seja transferido e o enovelamento completado (revisto por Song and Masison, 2005).

Hsp70 e HSP90 interagem respectivamente nas regiões N-terminal e C-terminal de STI-1, através de motivos específicos de tetratricopeptídeos repetidos (TPR) (Fig. 6a). Estes motivos TPRs são domínios formados por sequências repetidas de 34 aminoácidos degenerados, presentes em um grande número de proteína (Young et al., 2004). Proteínas que contém motivos TPR participam do controle do ciclo celular, transcrição, auxiliam na conformação protéica, transporte e translocação, transdução de sinal, metabolismo de glicose, liberação de neurotransmissor e "splicing" de RNA (Blatch et al., 1999; Das et al., 1998). Estudos de modelagem e cristalografia revelaram que a STI-1 humana contém 9 motivos TPR arranjados em

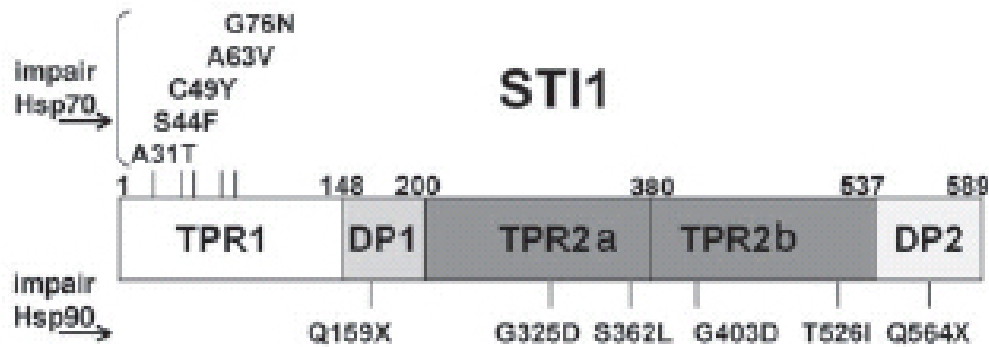
três domínios, os quais foram denominados TPR1, TPR2A e TPR2B, sendo que cada um compreende três motivos TPR (Schfler et al., 2000; van der et al., 2000)

Além destes domínios a STI-1/Hop contém regiões menores onde são encontrados conservados resíduos de aspartato e prolina adjacentes a TPR1 (designado DP1) e a TPR2B (designado DP2) (Fig. 6a). Estes domínios estão envolvidos na regulação da atividade de HSP70 e HSP90 e na ativação de receptores esteróides (Young et al., 2004).

O genoma humano contém uma cópia do gene que codifica STI-1 no cromossomo 11q13.1 e este contém 14 exons (Fig 6b). Já no genoma murino este gene está localizado no cromossoma 19, também contendo 14 exons. O transcrito de STI-1 humano, assim como o murino, contém aproximadamente 2,079 pares de bases que codificam uma sequência de 543 aminoácidos resultando em uma proteína de peso molecular de 66 KDa (Fig 6b).

A importância das chaperonas e co-chaperonas na promoção e manutenção da conformação nativa de proteínas celulares é ressaltada pelas consequências tóxicas das proteínas mal enoveladas, que tendem a agregar. Em várias desordens neurodegenerativas como a doença de Parkinson e de Huntington, o acúmulo de agregados protéicos estão associados com morte neuronal em regiões específicas do cérebro, que resulta em sintomas neurológicos irreversíveis. Como as chaperonas e co-chaperonas são defesas naturais do organismo contra esta toxicidade, um entendimento mais completo da atuação das mesmas, tanto individualmente quanto como parte de um sistema integrado, é essencial para a compreensão destas desordens (Young, et al., 2004).

6a)



6b)

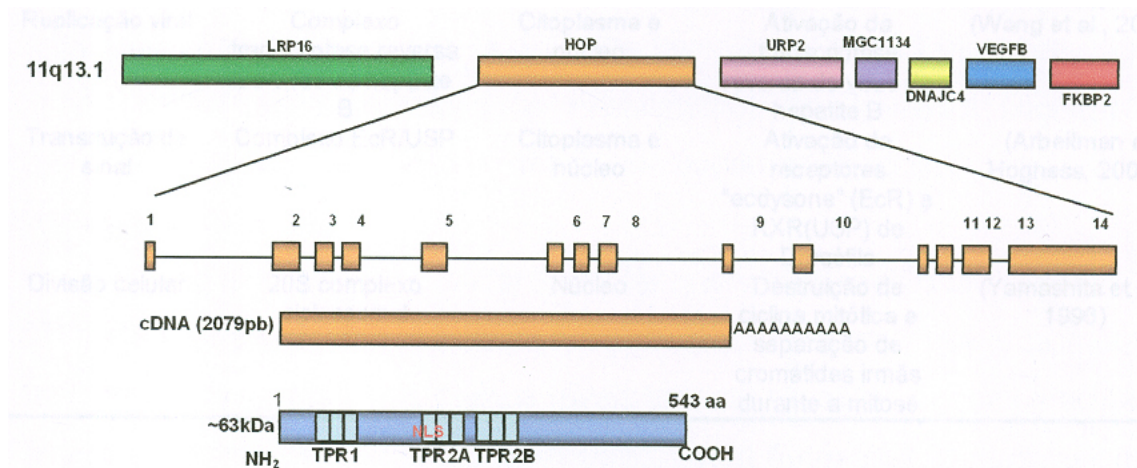


Figura 6a: **Domínios estruturais da STI-1.** A STI-1 possui domínios de ligação às chaperonas HSP70 e HSP90, formados por tetratricopeptídeos repetidos (TPR), e domínios de ativação a receptor esteróide, ricos em aspartato e prolina (DP). Estão representados as substituições em aminoácidos que prejudicam a capacidade de STI-1 regular HSP70 (acima) e HSp90 (abaixo da representação dos domínios) (adaptado de Song and Masison, 2005). Figura 6b: **Estrutura gênica da Hop humana.** O gene da Hop está localizado no cromossomo 11q13.1 e é flanqueado por outros genes como LRP16 e URP2. Este gene contém 14 exons (1-14 barras verticais), separados por introns (barras horizontais). O fragmento de c-DNA (2097 pb) codifica para uma proteína de 543 aminoácidos (aa) (Adaptado de Lopes, 2004).

1.8 STI-1 COMO LIGANTE DE PrP^c

Como citado anteriormente, o estudo dos ligantes de PrP^c é importante para o entendimento de suas funções fisiológicas. Em 1997, Martins e colaboradores propuseram um receptor para PrP^c com base na teoria de hidropaticidade complementar. Esta teoria propõe que peptídeos codificados por fitas complementares do DNA são capazes de interagir entre si. Este grupo sintetizou um peptídeo que era complementar a região no DNA que codifica para os resíduos 114-129 da proteína prion de humanos. Esta região foi escolhida como molde porque o peptídeo codificado por ela era capaz de reproduzir os efeitos patológicos da proteína prion intacta. O peptídeo complementar foi utilizado para imunizar camundongos e os resultados do “immuno-blotting” mostraram que os anticorpos resultantes foram capazes de reconhecer uma proteína de 66 KDa em extratos de membrana de cérebro de camundongos. Este peptídeo foi capaz de se ligar à PrP^c *in vitro* e bloquear os efeitos neurotóxicos mediados pelo peptídeo 106-126 da proteína prion de humanos (considerado como peptídeo neurotóxico por dados anteriores) (Martins et al., 1997).

Chiarini e colaboradores (2002) analisaram o efeito da interação entre PrP^c e seu peptídeo complementar sobre a apoptose em explantes de retina. Os autores mostraram que esta interação previne a morte celular induzida por anisomicina nestes explantes, e que estes sinais neuroprotetores ocorrem por ativação de vias dependentes de cAMP/PKA. Nesse mesmo ano, este grupo de pesquisa mostrou que o peptídeo de ligação à PrP^c descrito em 1997 corresponde a proteína STI-1, utilizando eletroforese em gel bidimensional e espectrometria de massas. Neste trabalho eles sugeriram que PrP^c e STI-1 interagem fortemente *in vivo*, e mostraram que esta interação induz sinais neuroprotetores em retina (Zanata et al., 2002).

Na busca pela relevância fisiológica desta interação foi publicado um trabalho em 2005 mostrando que a interação de PrP^c e STI-1 promove neuritogênese e neuroproteção em culturas de hipocampo, por distintas vias de sinalização. A neuritogênese induzida por esta interação é mediada pela via das MAP cinases enquanto a neuroproteção foi mediada pela via da Proteína Cinase A (PKA) (Lopes et al., 2005). Outros grupos também mostraram que a STI-1 está envolvida na ativação da Superóxido dismutase dependente de PrP^c, e conseqüentemente na modulação da sobrevivência neuronal (Sakudo et al., 2005). Juntos, estes dados

fortemente sugerem um importante papel de PrP^c na sobrevivência e diferenciação neuronal.

Os mecanismos envolvidos na neurogênese e neuroproteção induzidos pela interação PrP^c - STI-1 não estão completamente esclarecidos. Os experimentos que mostraram estas atividades foram realizados utilizando uma STI-1 recombinante, o que mimetizaria uma STI-1 secretada. Porém, sabe-se que a STI-1 é encontrada principalmente no citoplasma, com apenas 6% de sua fração total presente na membrana plasmática (Martins et al., 1997). Por sua vez, PrP^c é uma proteína de membrana só sendo encontrada no citoplasma em casos patológicos ou na presença de um inibidor de proteasoma (revisto por Zanata et al., 2002), o que levanta a questão de onde realmente ocorre a interação PrP^c - STI-1.

Já foi demonstrado que a STI-1 é liberada por algumas linhagens de células tumorais (Eustace and Jay, 2004), por células gliais e em menor quantidade por neurônios em cultura (Lima et al., dados não publicados). Portanto, é possível que astrócitos ou neurônios secretem STI-1, e que esta possa atuar como um fator parácrino ou autócrino na diferenciação e sobrevivência neuronal através de sua interação com PrP^c na membrana celular ou em alguma organela intracelular comum. O estudo da interação de STI-1 secretada com células neuronais e seu tráfego intracelular pode esclarecer esta hipótese e auxiliar no entendimento dos mecanismos envolvidos.

1.9 FATORES NEUROTRÓFICOS

Descobertos na década de 50, os fatores neurotróficos são importantes reguladores da sobrevivência, desenvolvimento, função e plasticidade neuronal (revisto por Huang and Reichardt, 2001). Os fatores neurotróficos incluem proteínas de várias famílias como fator β de crescimento transformante (TGF- β), fator de crescimento do tipo insulina (IGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento de fibroblasto (FGF), interleucina-6, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), proteína morfogenética óssea (BMP), fatores neurotróficos derivados da glia, neurotrofinas e outros (Lessmann et al, 2003). Entre estes fatores, a família das neurotrofinas tem considerável importância devido a sua ampla expressão no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP), e devido à sua atuação na sobrevivência neuronal, no processo de crescimento e na regulação da plasticidade sináptica (revisto por Huang and Reichardt, 2001).

O fator de crescimento nervoso (NGF) foi a primeira neurotrofina descoberta (Cohen and Levi-Montalcini, 1956). Duas décadas após a sua identificação, Barde e colaboradores (1982) isolaram um outro fator de sobrevivência neuronal em cérebro de porcos, que foi denominado fator neurotrófico derivado de cérebro (BDF). Desde então, quatro novas neurotrofinas já foram identificadas: neurotrofina 3 (NT-3), neurotrofina 4/5 (NT-4/5), neurotrofina seis (NT-6) e sete (NT-7) (revisto por Lessmann et al., 2003).

Cada uma destas neurotrofinas possui funções distintas e são essenciais para o desenvolvimento neuronal. O NGF, por exemplo, promove a diferenciação *in vitro* e *in vivo* de precursores simpatoadrenais em neurônios simpáticos (Anderson, 1993). Além disso, o NGF também atua na manutenção da viabilidade e diferenciação de neurônios sensoriais (Levi-Montalcini, 1987). O BDNF, a NT-3 e NT-4 atuam na diferenciação de precursores de neurônios hipocámpais (Vicario-Abejón, et al., 1995). Também foi demonstrado que as duas primeiras neurotrofinas atuam na regulação do desenvolvimento de sinapses formadas entre fibras aferentes e neurônios motores em roedores (Seebach et al., 1999).

As funções citadas acima, assim como as atuações de outros fatores neurotróficos são mediadas pela interação com receptores específicos. No caso das neurotrofinas, seus efeitos são mediados pela interação com dois diferentes grupos

de receptores: receptores de cinases relacionados à tropomiosina (Trk) e receptores de neurotrofina (p75^{NTR} ; Arévalo and Wu, 2006).

As vias de sinalização ativadas pelas neurotrofinas através dos receptores Trk induzem diferentes respostas, tais como sobrevivência celular, diferenciação, formação de sinapse, plasticidade e crescimento axonal (Arévalo and Wu, 2006). Entre as vias de sinalização mediadas por estes receptores estão as vias Shc-Ras-MAPK e Rap-MAPK, implicadas na sobrevivência e diferenciação neuronal (Barnabé-Heider and Miller, 2003), PI3K-Akt, envolvida na sobrevivência neuronal (Atwal et al., 2000; Barnabé-Heider and Miller, 2003) e PLC γ -proteína cinase C (PKC), implicada na potencialização da sensibilidade termal em neurônios sensoriais (Chuang et al, 2001).

Em relação aos receptores p75^{NTR} , a ativação dos mesmos por neurotrofinas induz sobrevivência, aumento do crescimento de neuritos e da proliferação celular, diferenciação neuronal e mielinização (Du et al., 2005).

Todas estas atividades são dependentes do nível de expressão das neurotrofinas bem como de seus receptores. De modo geral, essa expressão é regulada ao longo do desenvolvimento, ocorrendo em regiões distintas (Lessmann et al., 2003). Várias neurotrofinas são expressas no neocórtex e hipocampo durante o desenvolvimento, e sua expressão continua em animais adultos, sugerindo importantes funções destas proteínas além do período inicial de desenvolvimento (revisto por Huang and Reichardt, 2001).

Os fatores neurotróficos são então produzidos por células específicas em regiões distintas do SNC e em períodos determinados do desenvolvimento, podendo ou não continuar a serem produzidos ao longo da vida adulta (revisto por Lessmann et al., 2003). Entre as conhecidas fontes de secreção destes fatores estão os órgãos simpáticos e sensoriais no SNP, que secreteam NGF, (revisto por Korsching, 1993), macrófagos, que liberam citocinas induzindo a produção de NGF por células de Schwann, neurônios e células gliais (revisto por Huang and Reichardt, 2001).

Tradicionalmente considerados como células suporte, os astrócitos são abundantes no SNC de adultos, atuando também como sensores e reguladores do microambiente local (Nedergaard et al., 2003). Já foi demonstrado que astrócitos derivados de cérebro de camundongos neonatos induzem o aumento da neurogênese em precursores neuronais em cultura (Lim and Alvarez-Buylla, 1999), sugerindo um importante papel destas células no desenvolvimento neuronal. Outros

trabalhos mostraram que os astrócitos secretam moléculas associadas à membrana, incluindo citocinas, fatores de crescimento e neurotransmissores, em resposta a estímulos fisiológicos e patológicos (Ridet et al., 1997; Lafon-Cazal, et al., 2003).

Dentre os fatores neurotróficos, os astrócitos são conhecidos por secretar NGF (Holgatte et al., 1989), as interleucinas IL-1 β e IL-6, proteína 6 de ligação ao fator de crescimento do tipo insulina (IGFBP6) e decorina (Barkho et al., 2006), entre outros. Lima e colaboradores (dados não publicados) mostraram que a STI-1 é secretada por cultura de astrócitos através de duas vias sendo uma utilizando exossomos (Arantes et al., dados não publicados), sugerindo que esta proteína atue como um fator neurotrófico. Apesar desta proteína ser uma co-chaperona, cujas funções são exercidas intracelularmente, vários trabalhos recentes mostram que as chaperonas podem ser secretadas (Guzhova et al., 2001) e que algumas delas atuam como fatores neurotróficos (Robinson et al., 2005). Um interessante trabalho mostrou que a Hop (proteína humana homóloga a STI-1) é secretada por células de fibrosarcoma HT-1080, juntamente com a chaperona Hsp90 α (Eustace e Jay, 2004).

A atuação de chaperonas como fatores neurotróficos é uma importante descoberta, tendo em vista que a expressão de algumas destas proteínas é aumentada em condições de injúria, como o “stress” metabólico (Kiang and Tsokos, 1998). Guzhova e colaboradores (2001) mostraram que a Hsp70 é liberada por modelo de células gliais, sendo essa liberação aumentada após o choque térmico. Este trabalho também mostrou que o modelo neuronal alvo (células de neuroblastoma) foram mais resistentes à apoptose induzida por choque térmico e estaurosporina, na presença da Hsp70 secretada, sugerindo assim uma função neuroprotetora para esta chaperona. Recentemente, Robinson e colaboradores (2005) mostraram que a Hsp70 exógena ou superexpressa pela medula espinhal promove a sobrevivência de motoneurônios *in vivo* durante o período natural de morte celular programada em embriões de galinha, novamente apontando uma chaperona como fator neurotrófico.

Se a STI-1 realmente atua como um fator neurotrófico *in vivo*, e quais os mecanismos envolvidos neste processo são questões que deverão ser esclarecidas.

Um interessante trabalho mostrou que os níveis de expressão de PrP^c se correlacionam com a diferenciação neuronal de precursores neurais multipotentes *in vitro*. E também que PrP^c aumenta significativamente a proliferação celular *in vivo* nas regiões do giro dentado e da zona subventricular (Steele, et al., 2006). O padrão

de expressão neuronal de PrP^C durante o desenvolvimento fortemente sugere que esta proteína tem um papel contínuo e ativo na neurogênese ao longo da vida. Estes resultados somados àqueles que mostram que a STI-1 é secretada por astrócitos (Lima et al., dados não publicados) e que a interação desta proteína com PrP^C induz neuritogênese em cultura de hipocampo, reforçam a hipótese de que estas duas proteínas atuem na regulação do desenvolvimento neuronal.

Estudos sobre a secreção de STI-1, sua interação e tráfego em células alvo bem como as vias de sinalização e ligantes ativados são de fundamental importância para o esclarecimento desta hipótese.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Avaliar a interação, a endocitose e o tráfego intracelular de STI-1 em células SN56.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Avaliar a especificidade de interação de STI-1 com células SN56.
- 2- Avaliar a cinética de internalização de STI-1 em células SN56.
- 3- Determinar a(s) via(s) de endocitose utilizada(s) por STI-1.
- 4- Determinar a localização subcelular de STI-1 após endocitose.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CONSTRUÇÕES

A His6-STI foi produzida no Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer por Marilene H. Lopes e Vilma R. Martins. O vetor de expressão utilizado foi o pTrc-A His (Invitrogen). A proteína recombinante foi purificada em coluna de Ni-NTA-agarose, coletada em tampão TBS 1X (50 mM de Tris pH 7,5; 150 mM de NaCl) e guardada a -20 °C.

As demais construções usadas no projeto nos foram gentilmente cedidas por outros grupos. A cadeia leve da clatrina em fusão à GFP (green fluorescent protein) foi fornecida pelo Dr. James Keen (Thomas Jefferson University). Rab5-GFP foi cedida pelo Professor Marc G. Caron (Department of Cell Biology, Duke University and Howard Hughes Medical Institute), e a construção Rab7Q67L-GFP foi cedida pelo Dr. Stephen S. G. Ferguson (J. P. Robarts Research Institute and Department of Physiology, University of Western Ontario).

3.2 CULTURA DE CÉLULAS

Células SN56 foram gentilmente cedidas pelo Prof. Bruce Wainer, Department of Pathology, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA. Estas células foram mantidas em DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco Life Technologies) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco Life Technologies) e 2 mM de glutamina (meio completo), em garrafas de cultura de 50 ml em estufa a 37°C com atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂. As células foram diferenciadas neste mesmo meio, porém desprovido de soro fetal bovino (meio de diferenciação) e suplementado com 1 mM de dibutilil cAMP (Sigma) por dois dias. O meio das células foi trocado a cada dois dias, exceto durante a diferenciação, quando era trocado a cada 24 horas.

3.3 TRANSFECCÃO

Quarenta e oito horas antes da transfecção as células SN56 foram plaqueadas, numa densidade de 7×10^4 células por lamínula de 22x22 mm, e mantidas em meio completo.

A transfecção foi realizada utilizando Effectene (Quiagen), seguindo-se as instruções do fabricante. As células foram transfectadas com 1 μg de DNA e 10 μl de efectene e incubadas por seis horas a 37°C em meio completo. Após as seis horas de incubação, lavou-se as células 2X com meio de diferenciação e acrescentou-se 1 mM de dibutilil cAMP. As células transfectadas foram diferenciadas por dois dias e então visualizadas por microscopia confocal.

3.4 PREPARO DA STI-1

Como citado anteriormente a STI-1 recombinante produzida no Instituto Ludwig de Pesquisa nos foi fornecida em TBS 1X. Para que esta proteína pudesse ser eficientemente marcada foi necessário trocar este tampão, uma vez que tampões contendo aminas primárias livres interferem na reação de complexação com o corante fluorescente. Esta troca foi feita aplicando-se 1.0 ml da STI-1 em uma coluna contendo uma resina de exclusão por tamanho, Bio-Rad BioGel P-30, e eluindo-se com tampão PBS 1X (58 mM de Na_2HPO_4 , 17 mM de NaH_2PO_4 e 68 mM de NaCl). Foram coletadas cerca de 15 frações de 500 μl , sendo as duas primeiras descartadas (referentes ao tampão TBS). As demais frações foram mantidas no gelo e a concentração de STI-1 presente em cada uma delas foi determinada em duplicata pelo método de Bradford, utilizando uma curva padrão de albumina bovina e 3,0 μl de cada amostra. Juntou-se aquelas frações com maior concentração de STI-1 e em seguida marcou-se com o corante fluorescente.

3.5 MARCAÇÃO DE STI-1 COM ALEXA FLUOR 488 E 568

Incubou-se 1 mg de STI-1 recombinante com o corante fluorescente (Alexa Flúor 488 ou Alexa Flúor 568 – Molecular Probes) por 1 hora à temperatura ambiente e posteriormente à 4°C “over night” sob agitação constante. Após a reação de conjugação, a mistura foi purificada através da resina de exclusão por tamanho Bio-Rad BioGel P-30 com o objetivo de separar a proteína conjugada do corante livre. A proteína conjugada purificada foi guardada a 4°C.

Os experimentos realizados para confirmar a marcação de STI-1 e avaliar a funcionalidade da proteína conjugada foram feitos no Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer. Nestes experimentos, a marcação da STI-1 com Alexa Flúor 488 e 568 foi confirmada através de Western Blotting. O produto purificado da reação de marcação foi submetido à SDS PAGE e transferência e então incubado com anticorpo específico para STI-1 (produzido no próprio Instituto). As bandas fluorescentes referentes à STI-1 marcada foram fotografadas em uma câmara de CCD (Anexo).

A funcionalidade foi avaliada através da ativação da Proteína Cinase A (PKA) pela STI-1 conjugada, comparada com a ativação obtida com a proteína não conjugada (Anexo).

3.6 ENSAIO DE INTERAÇÃO DA STI-1 COM CÉLULAS SN56

As células SN56 foram plaqueadas numa densidade de 5×10^4 células por lamínula de 22x22 mm e diferenciadas por dois dias com 1 mM de dibutilil cAMP. Após a diferenciação estas células foram incubadas com 1 μ M de STI-1 marcada com corante fluorescente Alexa Flúor (STI-1 AF568 ou AF488) durante 10, 20 ou 40 minutos à 37°C em estufa com atmosfera de CO₂. Após o período de incubação, as células foram lavadas 2x com meio DMEM sem soro e sem antibiótico (meio incompleto), perfundidas com este mesmo meio e analisadas por microscopia confocal.

Outro experimento de interação da STI-1 com células SN56 também foi realizado incubando-se as células SN56, plaqueadas e diferenciadas como citado anteriormente, com 1 μ M de STI-1 AF568 durante 40 minutos a 4°C. Após a

incubação estas células foram lavadas 2x com meio incompleto mantido a 4°C e analisadas por microscopia confocal.

A avaliação da autofluorescência das células SN56 foi realizada através da incubação das mesmas apenas com o meio incompleto, por 40 minutos a 37°C.

3.7 ENSAIO DE COMPETIÇÃO

As células SN56 plaqueadas e diferenciadas como citado anteriormente foram incubadas com 10 μ M de STI-1 em meio incompleto durante 1 hora a 4°C. Após esta incubação adicionou-se às mesmas placas 1 μ M de STI-1 AF568, também diluída em meio incompleto, e incubou-se a 37°C em estufa com atmosfera de CO₂ durante 30 minutos. As células foram lavadas com o mesmo meio e analisadas no microscópio confocal. Como controle deste ensaio, realizamos o mesmo experimento porém pré-incubando as células SN56 com 10 μ M de Albumina bovina (Sigma) durante 1 hora à 4°C, e em seguida com 1 μ M de STI-1 AF568 por 30 minutos à 37°C.

3.8 MARCAÇÃO DE ORGANELAS EM CÉLULAS SN56 COM TRANSFERRINA E LYSOSENSOR

Para a marcação de endosomas, as células SN56 foram diferenciadas por dois dias na ausência de soro e incubadas com 40 μ g/ml de transferrina-alexa flúor 488 (Molecular Probes) em meio incompleto durante 20 minutos a 37°C. As células SN56 foram incubadas simultaneamente com 1 μ M de STI-1 AF568. Após 20 minutos de incubação, as células foram lavadas 3x com PBS 1X e fixadas em paraformaldeído (3% p/v em tampão fosfato) por 20 minutos a temperatura ambiente e posteriormente mantidas em PBS 1X para visualização no microscópio confocal. O mesmo experimento foi realizado porém incubando as células por 40 minutos com os marcadores citados.

A marcação de organelas ácidas foi feita incubando as células SN56 por 1 hora a 37°C com 1 μ M de LysoSensor Green DND-189 (Molecular Probes) e 1 μ M de

STI-1 AF568 em meio incompleto. Após a incubação, as células foram lavadas com este meio e visualizadas por microscopia confocal.

Os comprimentos de onda de absorção e emissão dos marcadores fluorescentes utilizados neste trabalho estão listados na tabela 2.

Tabela 2: Comprimento de onda de absorção e emissão dos marcadores fluorescentes utilizados:

Marcador fluorescente	Absorção (nm)	Emissão (nm)
Alexa-568	578	603
Alexa-488	495	519
EGFP	484	510
Green DND-189	443	505

3.9 ANÁLISE DE INTERAÇÃO ENTRE STI-1 AF568 E CLATRINA, RAB7 E RAB5-GFP

Após 48 horas de transfecção com as construções rab5 ou rab7Q67L-GFP, as células SN56 foram incubadas com a STI-1 AF568 por 20 ou 40 minutos em meio incompleto à 37°C. Terminada a incubação, as células foram lavadas 2X com este meio e analisadas por microscopia confocal.

Após 48 horas de transfecção com a construção clatrina-GFP, as células SN56 foram incubadas com a STI-1 AF568 por 10, 20 ou 40 minutos em meio incompleto à 37°C. Após a incubação, as células foram lavadas 2X com este mesmo meio e analisadas no microscópio confocal.

3.10 AQUISIÇÃO DE IMAGENS

Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente (20-25°C). Lamínulas de 22x22 mm eram transferidas para câmara de perfusão onde um banho

de 400 μ l é formado. As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência confocal, Bio-Rad MRC 1024, utilizando o Software LASERSHARP 3.0 acoplado a um microscópio Zeiss (Axiovert 100), com objetivas de imersão em água (40X) e óleo (100X) e (63X). Para excitar as preparações foram utilizados laser UV de argônio (488 nm) ou laser de argônio/kriptônio (através das linhas de 488 nm ou 568 nm), e a luz emitida foi selecionada com os filtros 522/35 para GFP, HQ598/40 para Alexa 568. As imagens obtidas foram posteriormente processadas e analisadas utilizando os programas Confocal Assistant, Adobe Photoshop e Metamorph.

3.11 ANÁLISE DE CO-LOCALIZAÇÃO

A quantificação da co-localização entre os marcadores utilizados e a STI-1 fluorescente foi feita com o auxílio do programa Metamorph. O limiar de fluorescência foi definido e a quantidade de estruturas fluorescentes, vermelho para STI-1 e verde para os demais marcadores, foi automaticamente e independentemente detectada pelo programa. Posteriormente, as imagem dos marcadores em verde e vermelho foram sobrepostas, e a quantidade de pixels onde houve co-localização foi calculada.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 INTERAÇÃO DE STI-1 COM CÉLULAS SN56

A STI-1 é uma co-chaperonina que auxilia no enovelamento de proteínas através da sua interação com as chaperonas Hsp90 e Hsp70 (SONG et al., 2005). Além dessa função, alguns autores têm especulado que a STI-1 também possa atuar como um fator neurotrófico solúvel (CHIARINI et al, 2002), sendo liberada por células gliais e atuando em uma população distinta de neurônios (Lima et al.; Arantes et al., dados não publicados). Tendo em vista que os efeitos mediados pelos fatores neurotróficos ocorrem através de sua interação com receptores presentes nas células alvo (Arévalo and Wu, 2006), decidimos analisar a interação da STI-1 com células neuronais. Para isto, utilizamos a STI-1 recombinante marcada com os corantes fluorescentes Alexa Fluor 488 (STI-1 AF488) ou Alexa Fluor 568 (STI-1 AF568).

O grupo de pesquisa da Dra. Vilma R. Martins no Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer realizou alguns experimentos preliminares mostrando que a STI-1 recombinante foi eficientemente marcada com os corantes fluorescentes (Anexo). A funcionalidade da proteína conjugada foi avaliada através da sua capacidade de ativação da proteína cinase A (PKA), que é uma atividade induzida por STI-1 durante o processo de neuroproteção mediado por esta proteína (Lopes, et al., 2005). Os resultados deste experimento mostraram que a STI-1 conjugada ativa PKA na mesma proporção que a proteína não marcada, sendo portanto, funcional (Anexo).

As células SN56, utilizadas neste trabalho como modelo celular neuronal, foram incubadas com a STI-1 recombinante fluorescente. A incubação foi realizada à 37 °C (temperatura fisiológica) durante três tempos diferentes: 10, 20 e 40 minutos. Após a incubação as células foram analisadas por microscopia confocal, de modo que cada imagem obtida corresponde a uma fatia ótica que melhor representa a região da membrana plasmática. Os resultados estão mostrados na figura 7.

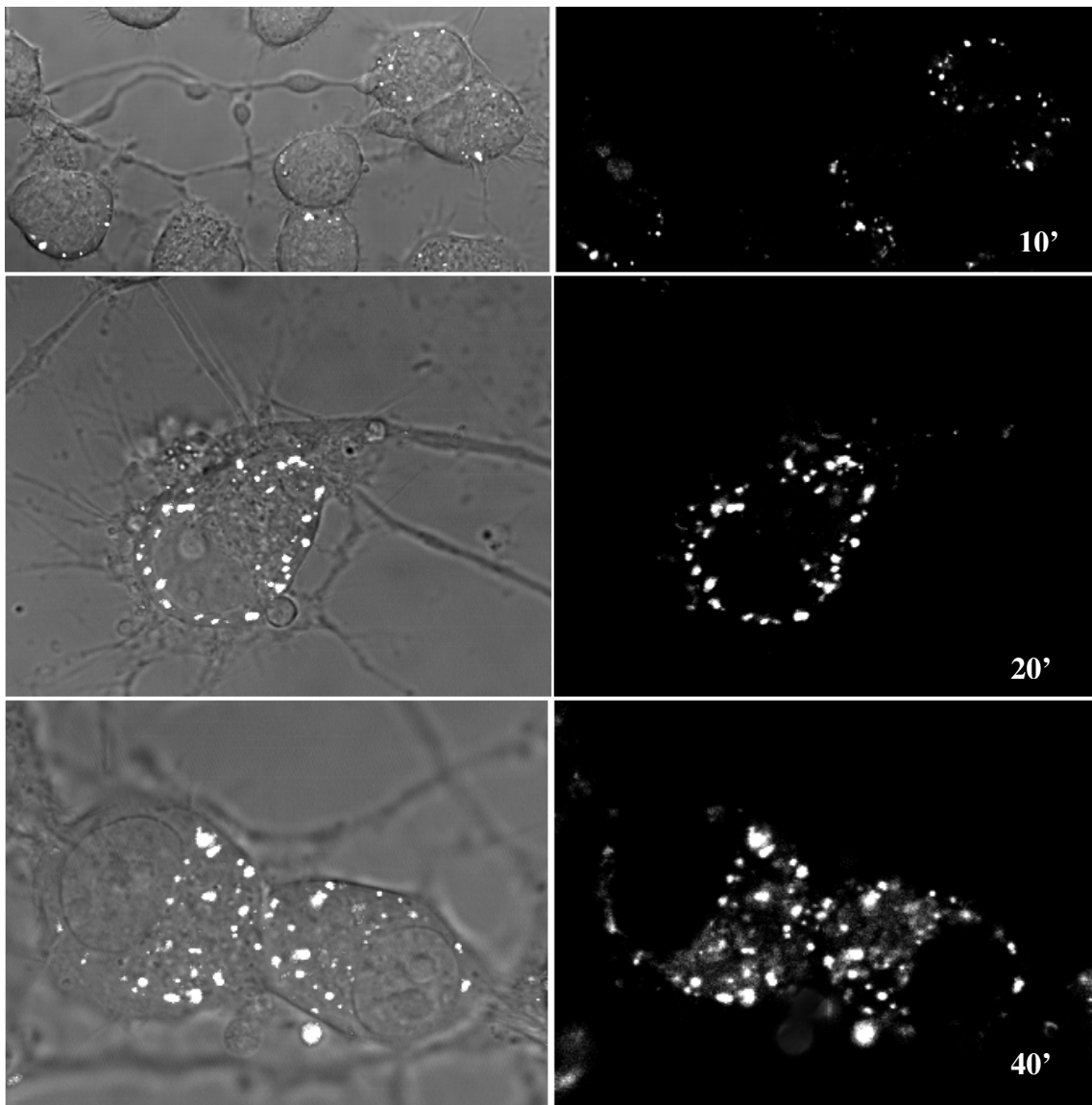


Figura 7: Interação da STI-1 fluorescente com células SN56. Estas células foram incubadas com $1\mu\text{M}$ de STI-1 AF488 durante 10, 20 ou 40 minutos à 37°C . Nos 10 primeiros minutos de incubação nota-se que a STI-1 AF488 começa a interagir com as células SN56. Após 20 minutos, a proteína foi endocitada por estas células localizando-se próximo às regiões da membrana plasmática. Após 40 minutos de incubação, a STI-1 AF568 foi completamente internalizada sendo distribuída por todo o citoplasma. Estes resultados correspondem a imagens representativas de três experimentos independentes.

No caso da STI-1 após 10 minutos de incubação nota-se que esta proteína começa a interagir com as células SN56, localizando-se próximo à região da membrana plasmática (Fig. 7). Quando a incubação ocorre por 20 minutos, a STI-1 AF488 é completamente internalizada pelas células SN56 mas ainda permanece nas regiões mais próximas da membrana plasmática. Após 40 minutos de incubação, nota-se que a STI-1 AF488 encontra-se distribuída por todo o citoplasma (Fig. 7). É possível que nos primeiros minutos de interação com as células SN56, a STI-1 esteja presente em fossas endocíticas na membrana plasmática. Esta proteína deve então ser internalizada através de vesículas formadas a partir da membrana, que migram ao longo do citoplasma, resultando no padrão de distribuição visto após 20 e 40 minutos de incubação.

Foram realizados diversos experimentos controle para melhor caracterizar o mecanismo de interação da STI-1 com células SN56. No primeiro experimento, incubamos estas células apenas com o meio incompleto, e analisamos por microscopia confocal (Fig. 8). O objetivo deste controle era avaliar se a auto-fluorescência emitida por estas células seria detectável com os parâmetros de aquisição de imagem utilizados nos experimentos. A realização deste controle baseou-se no fato de que a maior parte das células contém moléculas que se tornam fluorescentes quando excitadas por radiação UV/VIS de adequado comprimento de onda. Essa emissão de fluorescência surge de fluoróforos endógenos, que são normalmente encontrados nas mitocôndrias e lisosomos. Um importante exemplo de fluoróforo endógeno é o NADPH (Monici, 2005).

O resultado apresentado na figura 8 mostra que a auto-fluorescência das células SN56 não é detectável com os parâmetros de aquisição de imagem utilizados. Dessa forma, a auto-fluorescência destas células não interfere nos demais experimentos realizados com as mesmas sob estes parâmetros.

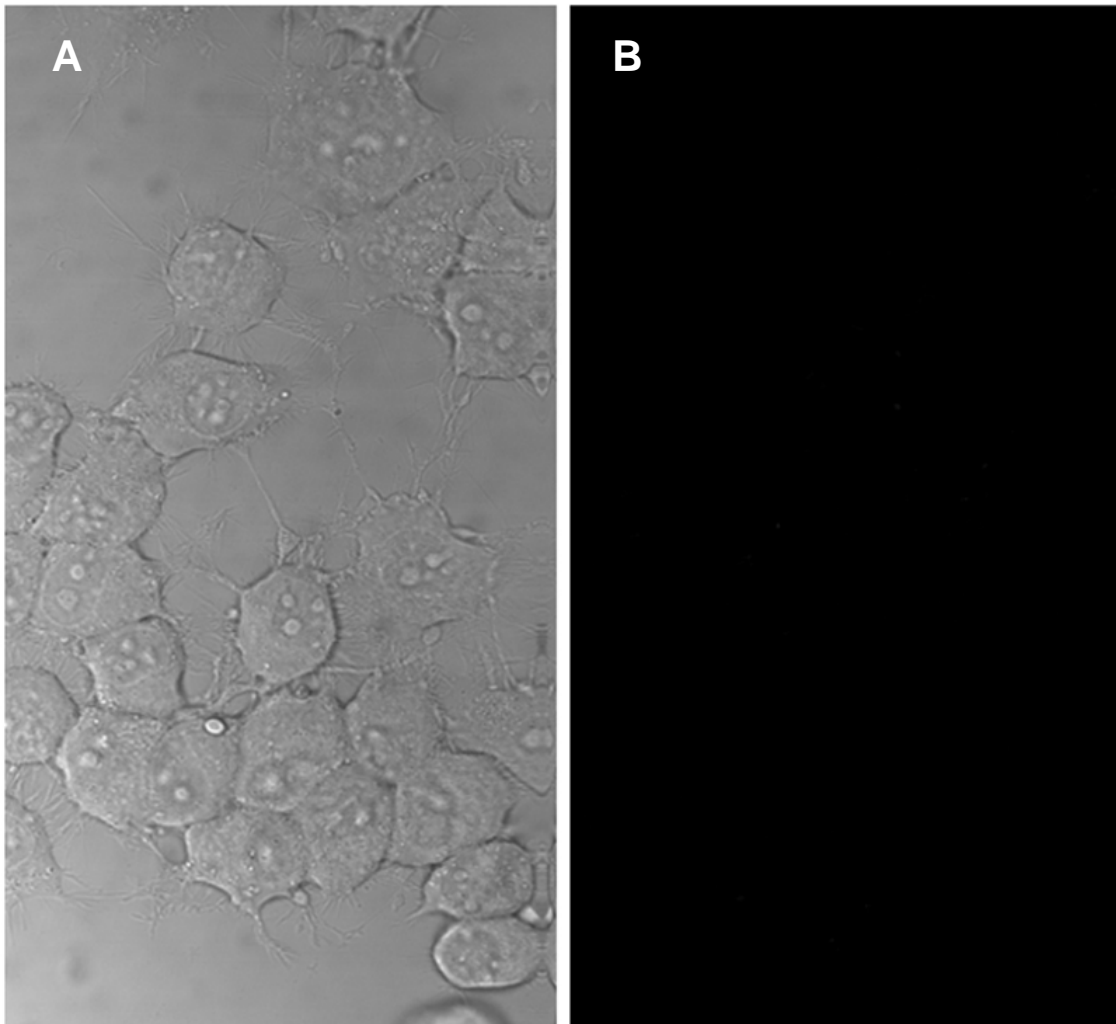


Figura 8: Avaliação da auto-fluorescência das células SN56. Estas células foram incubadas com meio de cultura sem soro e analisadas por microscopia confocal sob os mesmos parâmetros de aquisição de imagem utilizados para os outros experimentos. A imagem mostra que a auto-fluorescência destas células não é perceptível com os parâmetros utilizados. O primeiro painel refer-se à imagem de luz transmitida (DIC).

Um outro experimento controle foi realizado incubando-se as células SN56 com a STI-1 AF568 durante 40 minutos a 4°C. Sabe-se que nesta temperatura praticamente todos os processos fisiológicos estão bloqueados. Em relação aos processos endocíticos, a maior parte dos experimentos de captação e internalização de moléculas são realizados a 37°C (Pelkmans et al., 2001; Nichols, 2002; Glebov et al., 2006), tendo em vista que nesta temperatura todas as vias endocíticas estão ativas. Mas apesar dessas vias estarem inoperantes à 4°C, já foram descritos peptídeos capazes de sofrer endocitose nesta temperatura (Vivès et al., 1997; Torchilin et al., 2001). Vivès e colaboradores (1997) mostraram que um peptídeo derivado da proteína Tat (uma proteína envolvida na replicação do vírus HIV) é internalizado por células HeLa GH através de um processo independente de vias endocíticas, tendo em vista que não foi observada inibição da captação à 4°C.

Dessa forma, a incubação de células SN56 com STI-1 AF568 à 4°C teve como objetivo avaliar se a internalização desta proteína ocorre independente de vias endocíticas. O resultado deste experimento mostrou que à 4°C a STI-1 AF568 não consegue ser internalizada pelas células SN56 (fig. 9), sugerindo que a internalização desta proteína dependa de alguma via endocítica. Nota-se a presença de alguns aglomerados de STI-1 AF568 do lado de fora das células, na região da membrana plasmática, que não foram removidos pelas lavagens com o meio incompleto. Esta observação sugere a existência de algum sítio de interação na membrana plasmática o qual a STI-1 se liga. Vários trabalhos têm demonstrado que à 4°C, apesar das vias endocíticas estarem bloqueada, a interação entre ligantes e moléculas alvo na membrana continua ocorrendo, porém com uma cinética diminuída (Habich et al., 2002; Pelkmans et al., 2001).

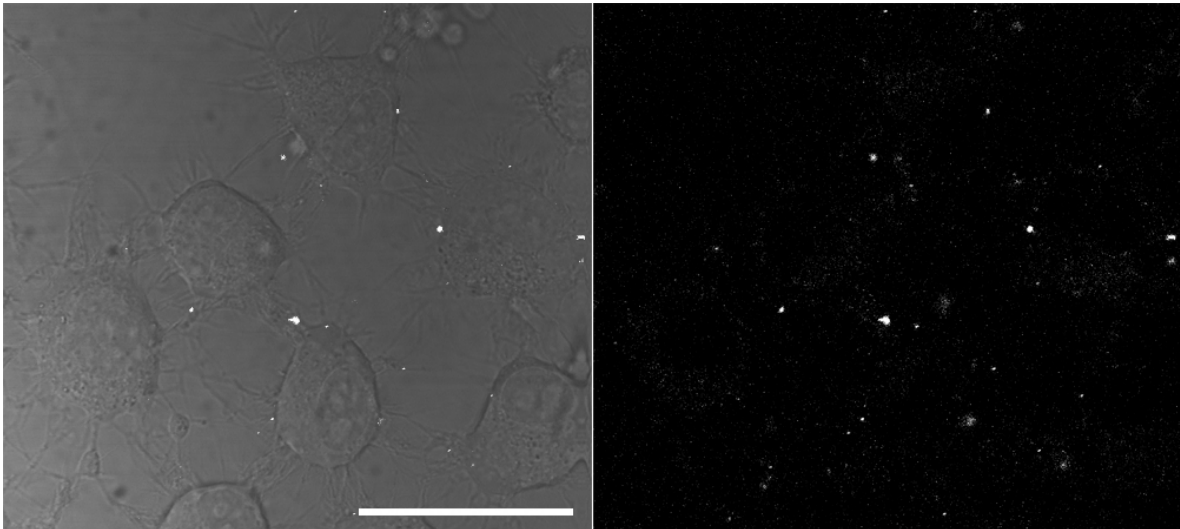


Figura 9: Interação da STI-1 AF568 com células SN56. As células foram incubadas com 1 μ M de STI-1 AF568, durante 40 minutos a 4 °C e analisadas por microscopia confocal. A imagem corresponde a uma fatia ótica representativa de três experimentos independentes, e mostra que a STI-1 liga-se à superfície das células nesta temperatura, mas não é internalizada. O primeiro painel refere-se à imagem de luz transmitida (DIC). Barra: 20 μ m.

4.2 AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DE INTERNALIZAÇÃO

A endocitose é caracterizada pela internalização de moléculas da superfície celular para dentro de compartimentos alvo (Roy and Wrana, 2005). Moléculas externas podem ser internalizadas por diferentes mecanismos, sejam eles dependentes ou independentes de alguma via endocítica (Vivèst et al., 1997). O mecanismo de endocitose mais bem caracterizado envolve a internalização de receptores e seus ligantes via clatrina, através da formação de fossas cobertas na membrana plasmática e posterior brotamento de vesículas que migram ao longo do citoplasma (Mousavi et al., 2004; Maxfield and McGraw, 2004). Outras vias endocíticas têm sido estudadas (Pelkmans et al., 2001; Nichols, 2002; Pelkmans and Helenius, 2003; Glebov et al., 2006) mas a principal dificuldade para caracterizá-las é a falta de marcadores específicos destas vias.

Dentre as conhecidas vias de endocitose, existem aquelas cuja internalização de moléculas é mediada por receptores, como a endocitose via clatrina (Le Roy and

Wrana, 2005), e aquelas que são independentes de receptores, como a macropinocitose (Swanson and Watts, 1995).

Em relação à STI-1, o resultado anterior mostrou a presença desta proteína na membrana plasmática quando incubada a 4°C, sugerindo a existência de um sítio específico de ligação. Para abordarmos esta questão, nós realizamos um ensaio de competição entre a proteína marcada e não marcada. Este ensaio já foi utilizado em outros trabalhos (Gekle et al, 1995; Habich et al., 2002), e baseia-se no bloqueio da internalização de uma proteína marcada através do pré-bloqueio de seus receptores com excesso da mesma proteína não marcada.

Neste experimento, as células SN56 foram pré-incubadas com excesso de STI-1 não conjugada (10 μ M) a 4°C. Após 30 minutos de incubação, adicionamos a estas células 1 μ M da proteína conjugada e incubamos à 37 °C (Fig. 10 A). O resultado deste experimento mostra que a pré-incubação das células com a STI-1 não conjugada bloqueia a internalização da STI-1 conjugada. Este resultado sugere que a endocitose desta proteína seja mediada por um receptor saturável.

Uma observação interessante é que aproximadamente 20 minutos após o início da aquisição das imagens, a STI-1 marcada começa a ser internalizada (dados não mostrados). Esta observação sugere a possibilidade de que o proposto receptor para STI-1 recicle constitutivamente para a membrana plasmática, sobretudo tendo em vista que a aquisição de imagens é realizada com as células vivas à temperatura ambiente, onde os processos endocíticos estão ativos. A reciclagem de proteínas é um processo celular muito comum para moléculas residentes na membrana plasmática. No caso dos receptores, eles são continuamente reciclados de volta à membrana através de endosomas de reciclagem (revisito por Maxfield and MacGraw).

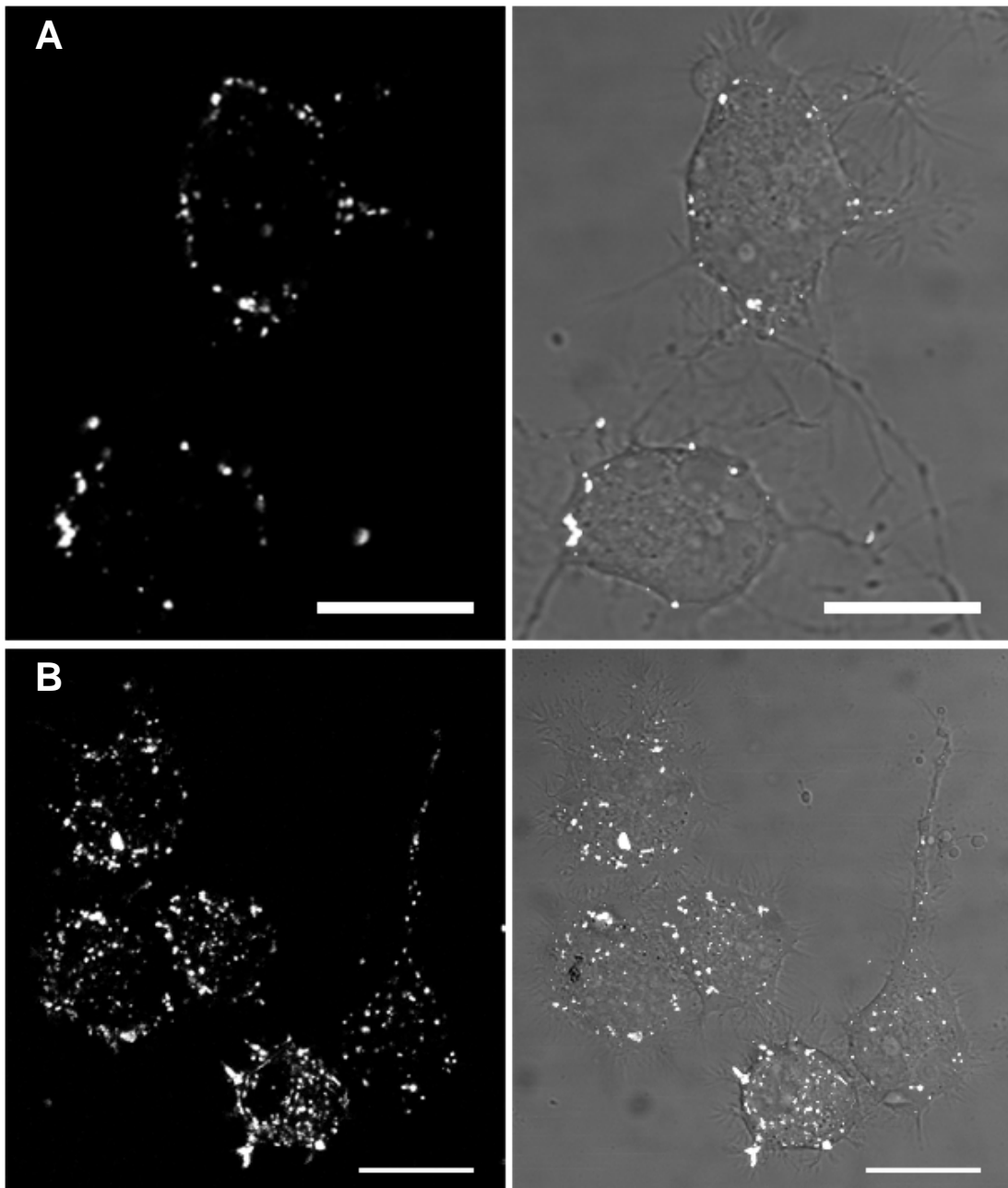


Figura 10: Ensaio de competição. **A** – células SN56 foram pré-incubadas com 10 μM de STI-1 não conjugada durante 30 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$, e em seguida incubadas com 1 μM de STI-1 AF568 por 1 hora à 37 $^{\circ}\text{C}$. O bloqueio da internalização sugere a presença de sítios específicos de ligação. **B** – repetiu-se o mesmo procedimento descrito em A, porém pré-bloqueando-se com 10 μM de albumina. Observa-se que a internalização de STI-1 AF568 ocorreu normalmente. Barra = 20 μm .

Como controle do ensaio de competição, as células SN56 foram pré-incubadas com 10 μ M de albumina à 4°C e após 30 minutos, elas foram incubadas com 1 μ M de STI-1 AF568 à 37°C (Fig. 10B). A albumina é uma proteína de 69 Kda envolvida no transporte de moléculas hidrofóbicas no plasma (revisito por Gekle, 2005). Já foi demonstrado que sua endocitose é mediada por receptores, sendo a via dependente de clatrina uma das vias envolvidas (Gekle, 1995). A pré-incubação das células SN56 com a albumina teve como objetivo avaliar se a internalização de STI-1 é mediada por um receptor específico para esta proteína ou se esse processo é mediado por um receptor inespecífico capaz de internalizar proteínas da ordem de 60 KDa.

O resultado deste experimento mostra que a pré-incubação com albumina não bloqueou a endocitose da STI-1, reforçando a hipótese de que a internalização desta proteína seja mediada por um receptor específico.

Conjuntamente, os resultados do ensaio de competição sugerem que a internalização de STI-1 pelas células SN56 seja mediada por um receptor específico e saturável.

4.3 PAPEL DA CLATRINA NA INTERNALIZAÇÃO DE STI-1

Uma vez que a STI-1 foi endocitada pelas células SN56, nós decidimos investigar qual a via de internalização utilizada por esta proteína. Como citado anteriormente, a internalização de moléculas de superfície pode ocorrer por diversas vias, sendo a endocitose dependente de clatrina o mecanismo mais bem caracterizado.

Para investigarmos se a endocitose de STI-1 ocorre por esta via, nós transfectamos as células SN56 com a cadeia leve de clatrina em fusão com GFP (clatrina-GFP). As células transfectadas foram então incubadas com STI-1 AF568 em diversos tempos e analisadas por microscopia confocal (Fig. 11, 12, 13).

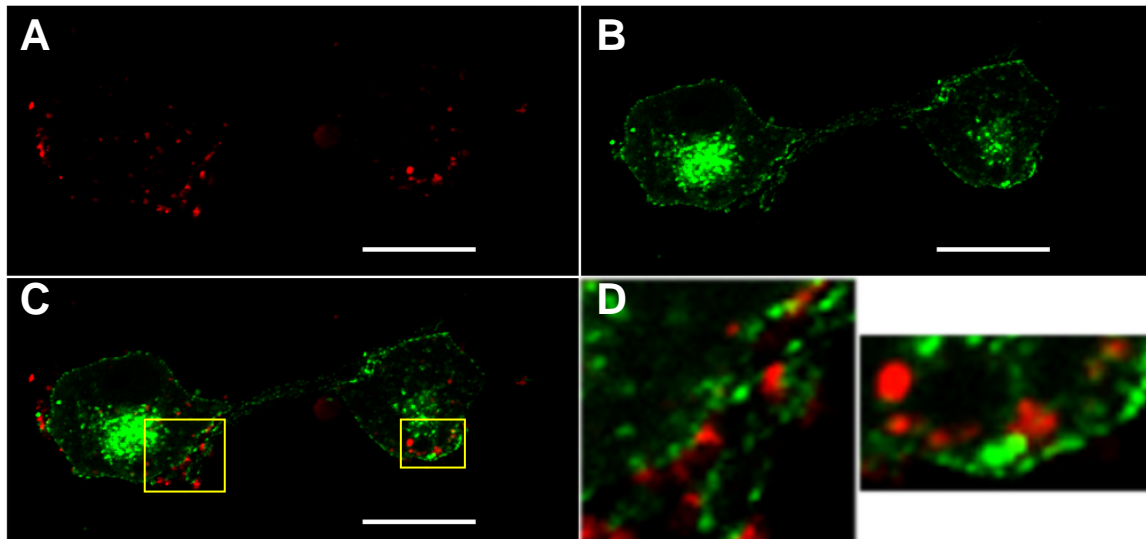


Figura 11: Avaliação do papel da clatrina na internalização de STI-1. Células SN56 foram transientemente transfectadas com 1 μg de clatrina-GFP. Quarenta e oito horas após a transfecção, estas células foram incubadas com 1 μM STI-1 AF568 durante 10 minutos. No painel **A** está representada a marcação da STI-1 AF568, e em **B** está representada a marcação de clatrina-GFP. A imagem de sobreposição mostra que não houve colocalização entre estes dois marcadores (**C**), sugerindo que a principal via de internalização de STI-1 seja independente de clatrina. Em **D** estão representadas duas regiões ampliadas da imagem de sobreposição. Barra = 20 μm .

A construção clatrina-GFP utilizada nestes experimentos já foi caracterizada anteriormente (Gaidarov et al., 1999), e utilizada em outros trabalhos do nosso grupo (Ribeiro et al., 2005). A proteína expressa apresenta-se distribuída pela região da membrana plasmática, com aspecto pontuado, e também no Golgi (Figura 11B e 12B). Este padrão de distribuição está de acordo com a localização endógena de clatrina descrita na literatura (Gaidarov et al., 1999).

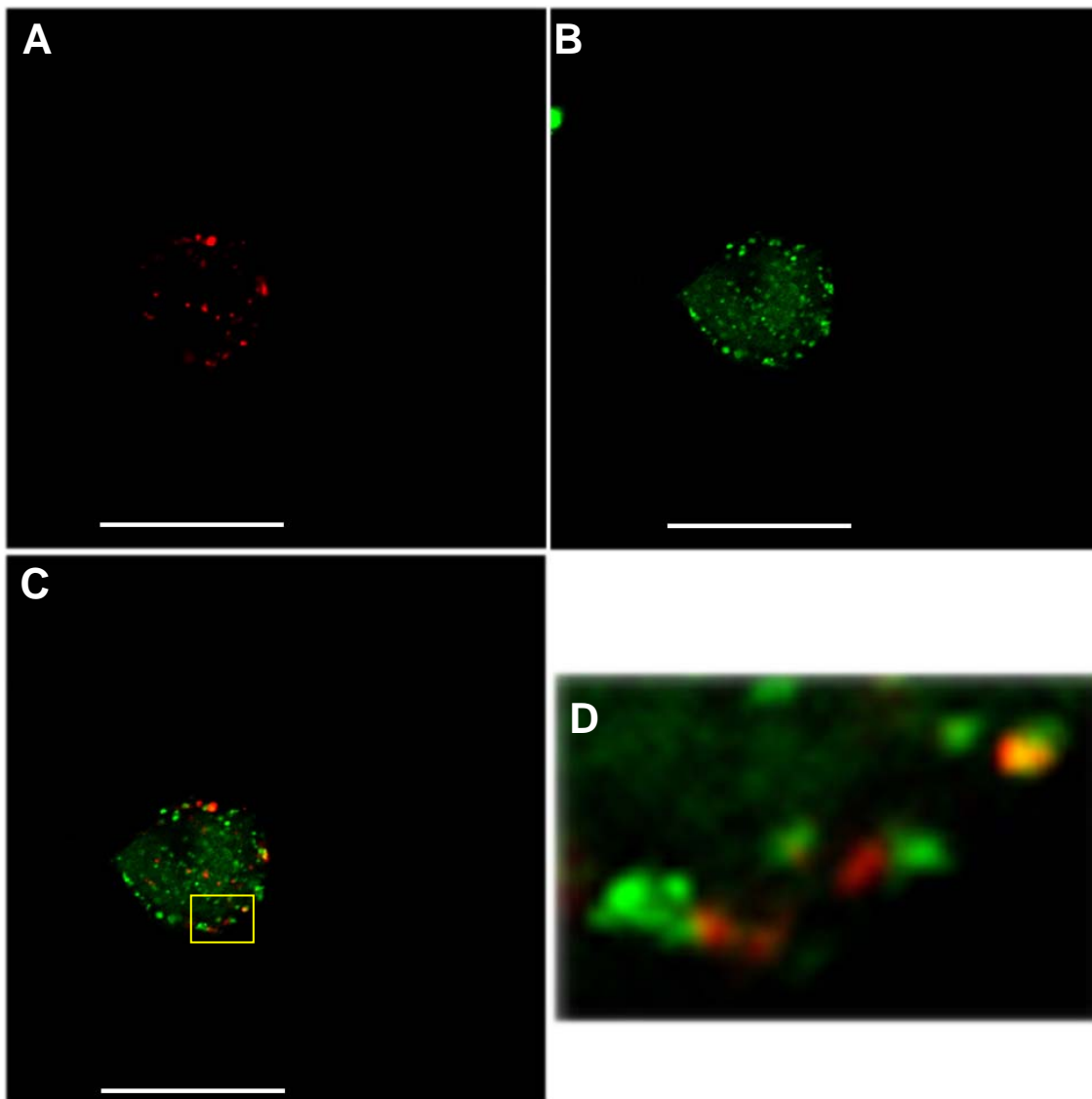


Figura 12: Avaliação do papel da clatrina na internalização de STI-1. Células SN56 foram transientemente transfectadas com clatrina-GFP (**B**) e incubadas com STI-1 AF568 (**A**) durante 20 minutos. A imagem de sobreposição mostra que a maior parte das vesículas positivas para STI-1 não são positivas para clatrina-GFP(**C**), sugerindo que a principal forma de internalização desta proteína ocorra por uma via independente de clatrina. A imagem é representativa de três experimentos independentes, e corresponde a uma fatia ótica. Uma região ampliada da imagem de sobreposição é mostrada em **D**. Barra = 20 μ m.

De acordo com os experimentos anteriores, após 10 e 20 minutos de incubação a STI-1 localiza-se em regiões próximas à membrana plasmática, provavelmente em fossas e vesículas recém formadas características da via endocítica utilizada por esta proteína. Dessa forma, a incubação de células transfectadas (clatrina-GFP) com a STI-1 nestes intervalos de tempo teve como objetivo avaliar se as estruturas formadas neste período correspondem à vesículas cobertas por clatrina.

Os resultados representados nas figuras 11 e 12 mostram que a maior parte das vesículas marcadas com STI-1 não eram positivas para clatrina-GFP. É possível visualizar algumas vesículas marcadas com clatrina-GFP positivas para STI-1 (imagem de sobreposição da figura 12). Mas as imagens mostram que quase todas as vesículas de STI-1 presentes na região da membrana plasmática não eram cobertas por clatrina.

A cobertura de clatrina não está presente apenas nas vesículas recém-formadas a partir da membrana plasmática. Esta proteína também participa, por exemplo, do transporte de vesículas formadas a partir do Golgi em direção aos lisosomas (Abazeed et al., 2005). Dessa forma, para novamente confirmarmos os resultados anteriores e avaliarmos se a STI-1 colocaliza com clatrina em algum momento durante seu tráfego intracelular, nós incubamos esta proteína por 40 minutos nas células SN56 transfectadas com clatrina-GFP.

O resultado deste experimento está representado na figura 13, e novamente mostra que a maior parte das vesículas positivas para STI-1 não são vesículas cobertas por clatrina. Conjuntamente, estes experimentos sugerem que a principal via de endocitose de STI-1 seja independente de clatrina.

Sabe-se, que as vesículas cobertas por clatrina são formadas a partir do brotamento de fossas cobertas na membrana plasmática. Após sua formação, estas vesículas perdem a cobertura de clatrina por um processo dependente de energia (Lemmon, 2001), passando a serem denominadas endosomas primários (revisto por Maxfield and MacGraw, 2004). Dessa forma, uma outra possibilidade é que a passagem de STI-1 por vesículas cobertas por clatrina seja um processo rápido, não detectado nas condições dos experimentos. Para elucidar melhor esta questão nós utilizamos outros marcadores desta via, que estão descritos no item 4.4.

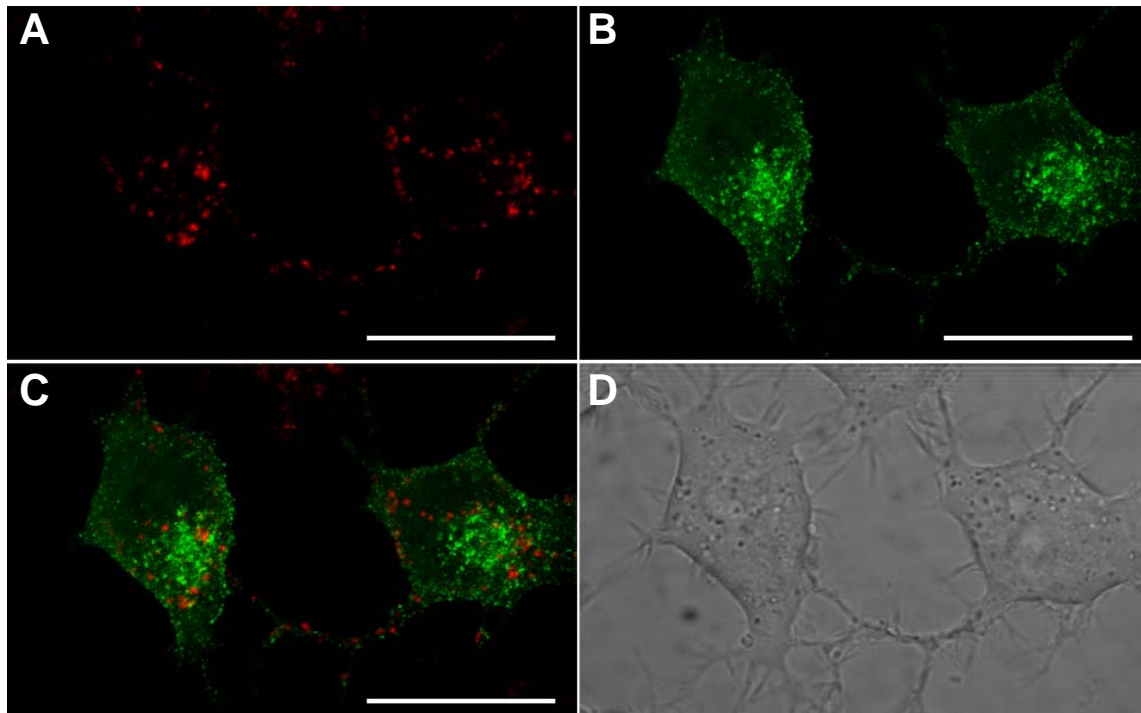


Figura 13: Avaliação da co-localização entre clatrina-GFP e STI-1 AF568. Células SN56 transientemente transfectadas com clatrina-GFP (**B**) foram incubadas por 40 minutos a 37°C com STI-1 AF568 (**A**). A sobreposição das imagens (**C**) mostra que não há colocalização entre estes dois marcadores na membrana plasmática e nem no citoplasma. As imagens **A**, **B** e **C** foram obtidas a partir da reconstrução de fatias óticas e corresponde a uma imagem representativa de três experimentos independentes. Em **D** é mostrada a imagem de luz transmitida das células (DIC). Barra = 20 μm .

4.4 LOCALIZAÇÃO INTRACELULAR DE STI-1

Na tentativa de identificarmos as estruturas intracelulares positivas para STI-1 AF568 e elucidarmos o papel da clatrina na endocitose desta proteína, nós utilizamos alguns marcadores de organelas intracelulares em experimentos de dupla marcação.

De acordo com a via clássica de internalização, as moléculas endocitadas são primeiramente entregues para endosomas de distribuição. A partir desta organela, estas moléculas podem ser direcionadas para endosoma de reciclagem, endosomas tardios, lisosomas ou Golgi (revisto por Maxfield and MacGraw, 2004; Nakayama, 2004).

Para avaliarmos se STI-1 AF568 é direcionada para endosomas da via clássica, nós utilizamos a transferrina conjugada com Alexa Flúor 488 como marcador de endosomas primários. A transferrina se liga ao seu receptor na superfície celular e é internalizada pela via clássica dependente de clatrina. Nesta via, a transferrina passa primeiramente por endosomas de distribuição próximos à membrana e se acumula numa região perinuclear que corresponde aos endosomas de reciclagem (Sonnichsen et al, 2000). Ao contrário do que acontece com a maioria dos ligantes, a transferrina não se dissocia de seu receptor nos endosomas de distribuição, permanecendo acoplada a ele até que o mesmo volte à membrana através dos ERs(Maxfield and MacGraw, 2005). Portanto, esta proteína constitui um marcador específico para estas duas populações de endosomas primários e tem sido utilizada em vários estudos de caracterização de vias endocíticas (Nichols, 2002; Magalhães et al., 2002; Glebov et al., 2006).

As células SN56 foram duplamente marcadas com STI-1 AF568 e Transferrina AF488 durante 20 e 40 minutos. Os resultados, representados nas figuras 14 e 15, mostram que as organelas enriquecidas com STI-1 AF568 não foram sobrepostas por transferrina AF488.

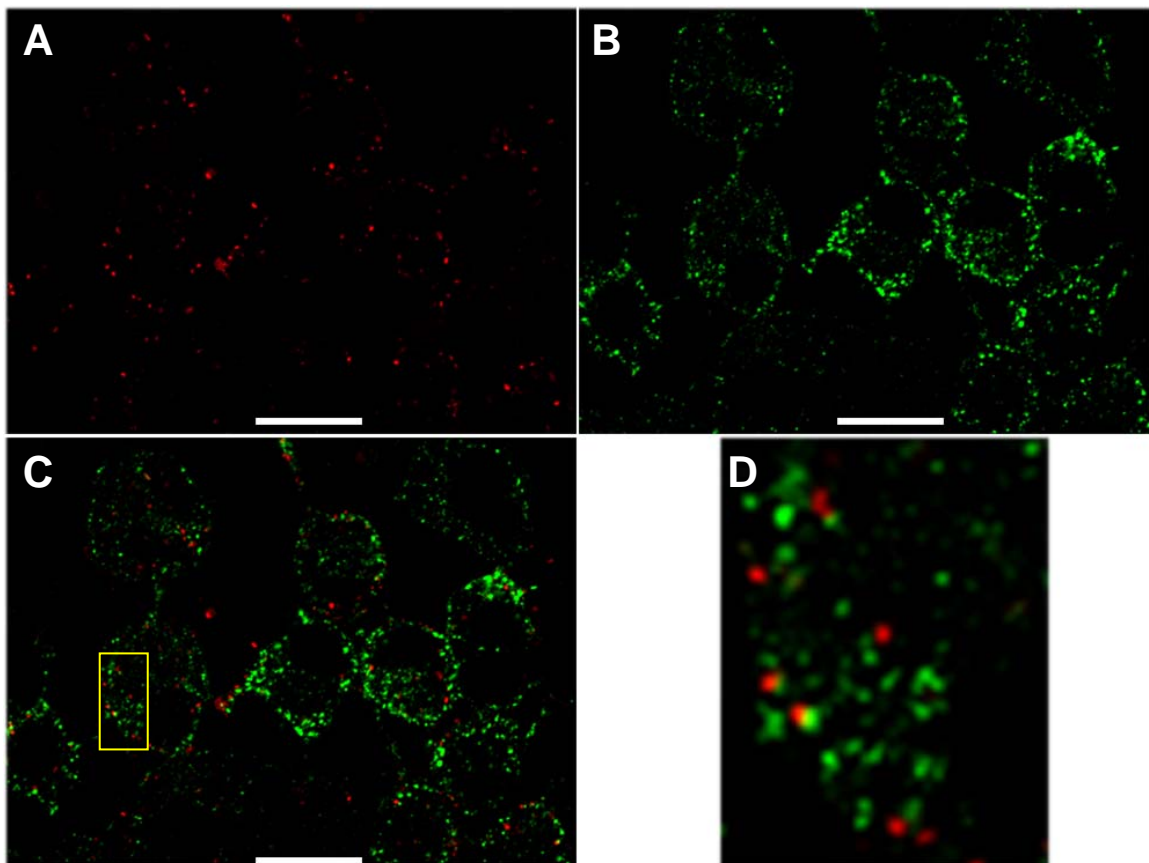


Figura 14: Análise da co-localização entre STI-1 AF568 e transferrina AF488. Células SN56 foram duplamente marcadas com 1 μ M STI-1 AF568 (A) e 40 mg/ml de transferrina AF488 (B) durante 20 minutos. A imagem de sobreposição mostra que as estruturas positivas para STI-1 não foram sobrepostas pela transferrina (C), sugerindo que a STI-1 não seja direcionada para endosomas primários após sofrer endocitose. Em D está representada uma região ampliada da imagem de sobreposição. Barra= 20 μ m.

Após 20 minutos de incubação, nota-se uma distribuição mais próxima da membrana dos dois marcadores (Fig. 14). Neste ponto, a hipótese é de que se a STI-1 fosse internalizada rapidamente via clatrina e em seguida direcionada para compartimentos originados desta via, ela se colocaria com transferrina AF488. Porém, a não colocação entre estas duas proteínas confirma os resultados vistos com clatrina-GFP, e novamente sugere que a internalização de STI-1 ocorre de modo independente de clatrina. Como citado anteriormente, a transferrina é um

marcador de endosomas de distribuição e de reciclagem. Portanto, estes resultados também sugerem que a STI-1 após sofrer endocitose não seja direcionada para estes compartimentos.

A incubação das células SN56 com transferrina e STI-1 durante 40 minutos mostrou uma marcação mais intensa, com ambas as proteínas se distribuindo por todo o citoplasma (Fig. 15). Nota-se a colocalização destas duas proteínas em algumas poucas vesículas no citoplasma, mas como visto no resultado anterior, a maior parte das estruturas positivas para STI-1 não foi co-localizada com transferrina AF488.

Estes resultados nos levam a propôr que a STI-1 seja internalizada através da interação com um receptor de membrana por uma via independente de clatrina; e diferente da transferrina, essa proteína não seja direcionada para endosomas primários. Porém, sabe-se que proteínas internalizadas por outras vias também podem ser entregues para organelas da via clássica (Nichols and Lippincott-Schwartz., 2001), em um processo chamado “crosstalk”. Dessa forma, há a possibilidade de que a STI-1 seja direcionada para endosomas primários sem passar por clatrina.

Para elucidarmos melhor esta questão, nós realizamos experimentos de dupla marcação utilizando Rab5-GFP como um marcador de endosomas primários. Dados recentes mostraram que vesículas positivas para caveolina podem interagir com endosomas primários, em um processo dependente de Rab5 (revisto por Le Roy and Wrana). Também já foi mostrado que Rab5 está envolvida na regulação da endocitose de fase fluida (revisto por Galperin and Sorkin, 2003). Estes trabalhos mostram que a formação de populações distintas de endosomas primários, originadas a partir de vias endocíticas diferentes, é regulada pela Rab5. Dessa forma, essa Rab constitui um interessante marcador destas organelas.

Células SN56 foram transientemente transfectadas com a construção Rab5-GFP e incubadas durante 20 e 40 minutos com STI-1 AF568. Os resultados destes experimentos mostram que não houve colocalização entre estas duas proteínas (Fig. 16 e 17).

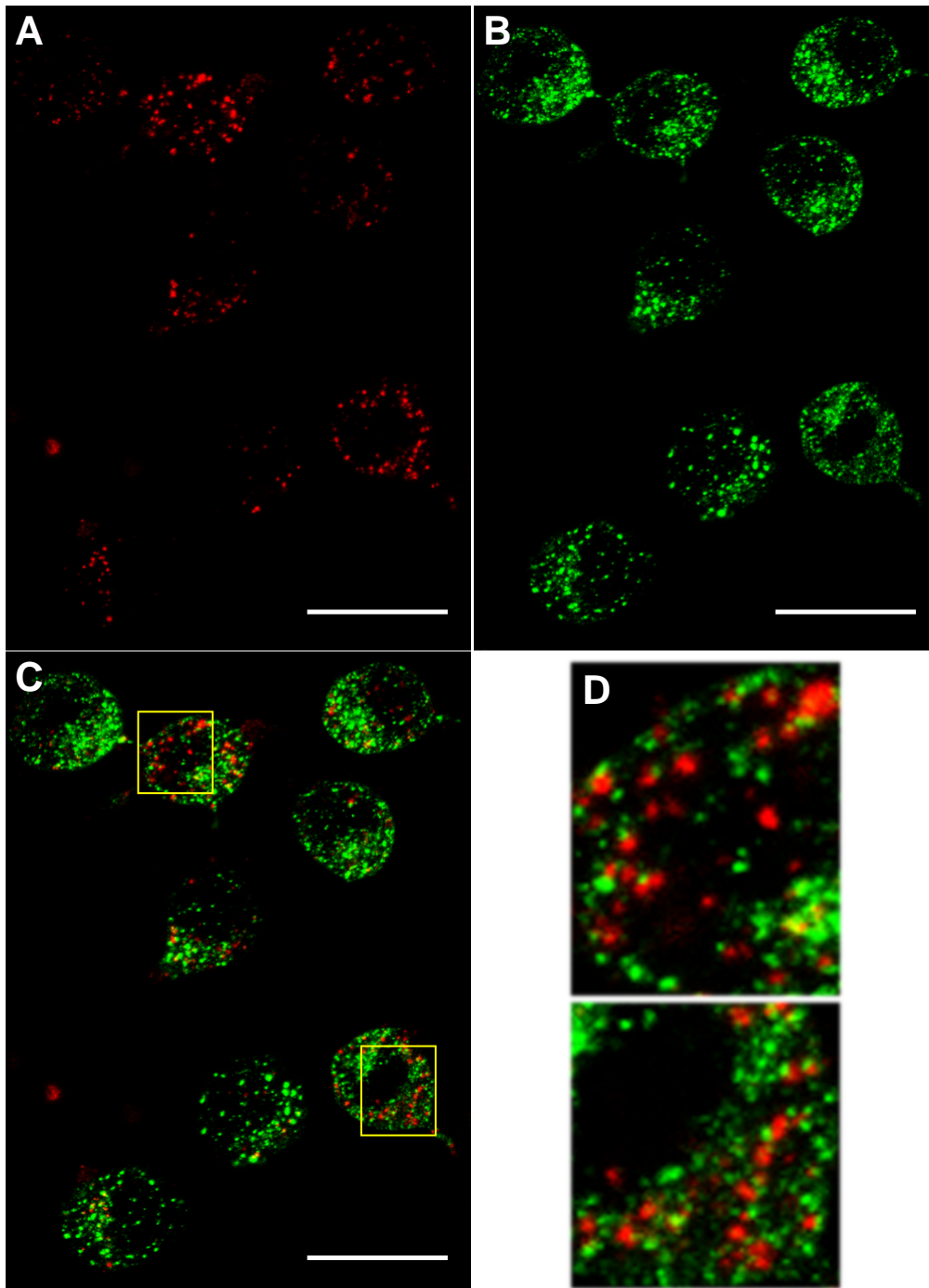


Figura 15: Análise da colocalização entre STI-1 AF568 e transferrina AF488. Células SN56 foram duplamente marcadas com 1 μ M de STI-1 AF568 (A) e 40 mg/ml de transferrina AF488 (B) durante 40 minutos. A imagem de sobreposição mostra que a maior parte das estruturas positivas para STI-1 não foram marcadas pela transferrina (C), sugerindo que a STI-1 não seja direcionada para endosomas primários após sofrer endocitose. Em D estão representadas duas regiões ampliadas da imagem de sobreposição. Barra= 20 μ m.

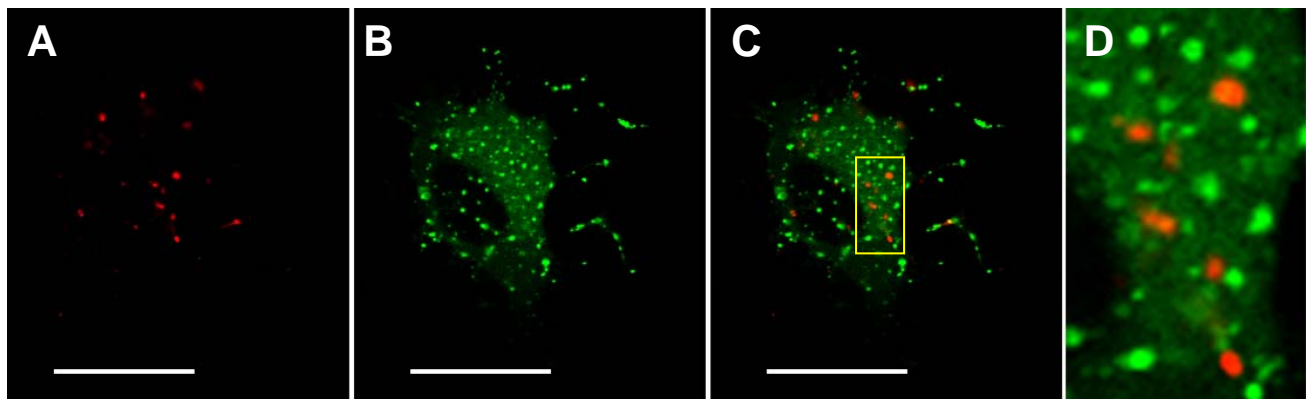


Figura 16: Análise da colocalização entre STI-1 AF568 e Rab5-GFP. Células SN56 foram transientemente transfectadas com 1 μ g de Rab5-GFP e incubadas com STI-1 por 20 minutos. Em vermelho está representada a marcação de STI-1 AF568 (A), e em verde estão representadas grandes vesículas positivas para Rab5-GFP que se distribuíram por toda a célula (B). A imagem de sobreposição mostra que não há colocalização entre STI-1 e Rab5-GFP (C), sugerindo que a STI-1 não seja direcionada para endosomas primários após sofrer endocitose. A não colocalização entre as duas proteínas pode ser melhor visualizada em D, que representa uma região ampliada da imagem de sobreposição. As imagens foram obtidas através da reconstrução de fatias óticas de uma imagem representativa de três experimentos independentes. Barra = 20 μ m.

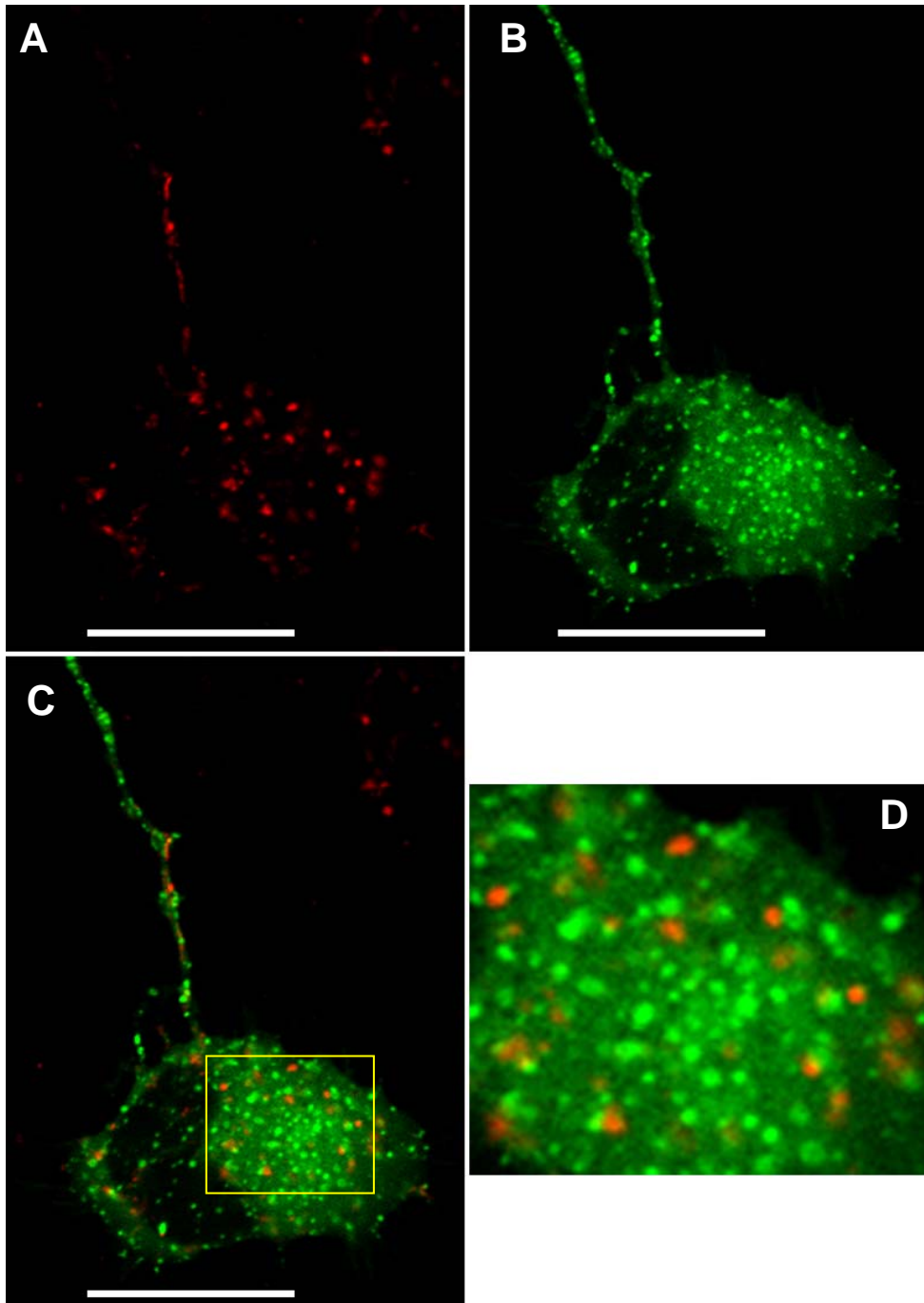


Figura 17: Análise da colocalização entre STI-1 AF568 e Rab5-GFP. Células SN56 foram transientemente transfectadas com Rab5-GFP e incubadas com STI-1 por 40 minutos. A imagem de sobreposição mostra que a STI-1 AF568 marcada em vermelho (**A**), não se colocaliza com os endosomas positivos para Rab5-GFP, representados em verde(**B**). Uma região da imagem de sobreposição (**C**) foi ampliada para que a não colocalização entre as vesículas pudesse ser melhor visualizada (**D**). As imagens foram obtidas através da reconstrução de fatias óticas de uma imagem representativa de três experimentos independentes. Barra = 20 μm .

A Rab5 é uma GTPase presente na membrana de endosomas primários (revisto por Rodman and Wandinger-Ness, 2000). A construção Rab5-GFP tem sido utilizada em vários trabalhos (Magalhães et al., 2002; Ribeiro et al., 2003) e sua expressão nas células SN56 leva à formação de endosomas primários que se distribuem por toda a célula (Fig. 16B e 17B). Independente da via endocítica envolvida na internalização de STI-1, se essa proteína fosse direcionada para endosomas primários nós a veríamos dentro das vesículas marcadas com Rab5-GFP nos experimentos de dupla marcação. Porém os nossos resultados mostraram que tanto em 20 quanto em 40 minutos de incubação praticamente toda a STI-1 internalizada estava presente em organelas distintas daquelas marcadas com Rab5-GFP. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos para clatrina-GFP e transferrina, reforçando a hipótese anterior de que a STI-1 é internalizada principalmente por uma via independente de clatrina, e não é direcionada para endosomas primários após sofrer endocitose.

Além dos endosomas primários, existem outras organelas intracelulares para as quais as moléculas de superfície podem ser diretamente direcionadas após sofrerem endocitose. Pelkmans e colaboradores (2001), por exemplo, mostraram que o Simian virus 40 (SV40) é endocitado por caveolae e em seguida entregue para o retículo endoplasmático através de estruturas denominadas caveosomas. Nichols e colaboradores (2002) também mostraram que a subunidade B da cólera toxina (CTxB) é entregue para o complexo de Golgi através de organelas desprovidas dos marcadores de endosomas primários. Uma outra possibilidade é o direcionamento para vesículas ácidas como os corpos multivesiculares (Valdez et al., 2005).

Diante disso, nós decidimos avaliar a presença desta proteína em vesículas ácidas. Para isto, utilizamos o marcador Lysosensor Green, uma sonda acidotrópica que se acumula em organelas ácidas como resultado de sua protonação.

As células SN56 foram então duplamente marcadas com Lysosensor Green e STI-1 AF568 por 1 hora à 37 °C. Esse tempo de incubação é sugerido pelo fabricante do Lysosensor para que as vesículas ácidas sejam eficientemente marcadas. Após o período de incubação as células foram analisadas por microscopia confocal, e os resultados mostraram que boa parte das vesículas marcadas com STI-1 AF568 foram marcadas com a sonda acidotrópica (Fig. 18).

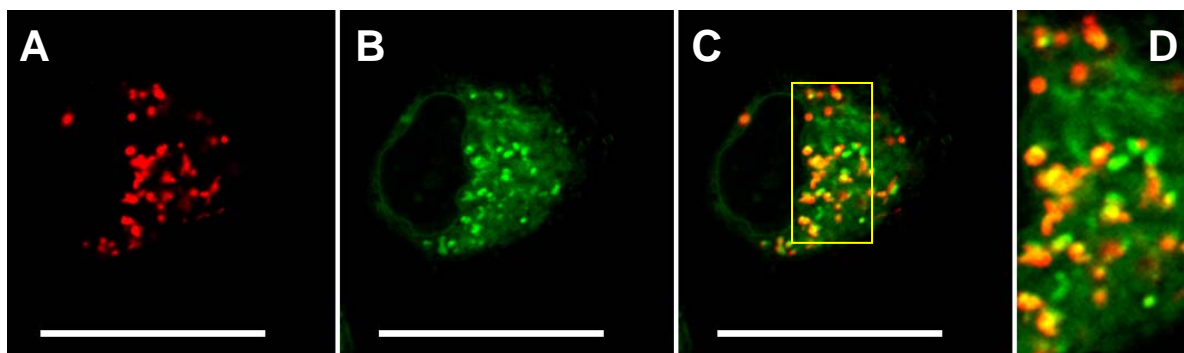


Figura 18: STI-1 se colocaliza com vesículas acídicas. Células SN56 foram duplamente marcadas com 1 μ M de STI-1 AF568 (**A**) e 1 μ M do marcador de vesículas acídicas Lysosensor Green (**B**) durante 1 hora a 37°C. O painel de sobreposição mostra uma forte colocalização entre STI-1 e Lysosensor (**C**), mostrando que a STI-1 é direcionada para vesículas acídicas após sofrer endocitose. Em (**D**) está representada a ampliação de uma região da imagem de sobreposição para facilitar a visualização de vesículas duplamente marcadas. O resultado é representativo de 77 células analisadas por microscopia confocal. A imagem mostrada corresponde a uma fatia ótica com barra = 20 μ M.

O resultado deste experimento mostra que a maior parte das vesículas marcadas com STI-1 corresponde a vesículas acídicas. É interessante notar que as vesículas duplamente marcadas localizaram-se tanto na região mais próxima à membrana plasmática, quanto na região perinuclear, mas com uma prevalência maior destas vesículas nessa última região.

Como visto nos experimentos de interação da STI-1 com células SN56, após 40 minutos de incubação com estas células, essa proteína encontra-se distribuída por todo o citoplasma e também nas regiões próximas à membrana plasmática. Esta distribuição nos leva a pensar na possibilidade de que as vesículas de STI-1 mais próximas à região perinuclear correspondam a estruturas mais maduras enquanto as vesículas mais próximas à membrana plasmática correspondam à novas moléculas se STI-1 recém endocitadas, tendo em vista que a endocitose é um processo dinâmico. Portanto, a presença de vesículas duplamente marcadas para STI-1 e Lysosensor na região da membrana nos leva a sugerir que a endocitose dessa proteína ocorra diretamente em vesículas acídicas. Essa hipótese é reforçada pelos resultados anteriores que mostraram que a STI-1 não é direcionada em nenhum momento para endosomas primários, que são vesículas de pH menos ácido (revisto por Paroutis et al., 2004).

Mas uma outra possibilidade seria uma rápida passagem de STI-1 por estruturas de pH neutro desprovidas de marcadores de endosomas primários, seguida da sua entrega para vesículas acídicas. Esta segunda hipótese explicaria melhor o fato das vesículas marcadas apenas com STI-1 se concentrarem mais na região da membrana plasmática.

Tendo em vistas estas questões e a existência de diferentes organelas intracelulares que apresentam pH ácido, nós decidimos pesquisar a identidade destas vesículas acídicas positivas para STI-1. Os valores de pH luminal das principais organelas das vias secretória e endocítica estão representados na figura 19. Dentre as organelas da via endocíticas aquelas de menor pH luminal são os endosomas tardios e lisosomas. Dessa forma, para avaliarmos a presença da STI-1 nestas estruturas, nós transfectamos as células SN56 com a construção Rab7Q67L-GFP.

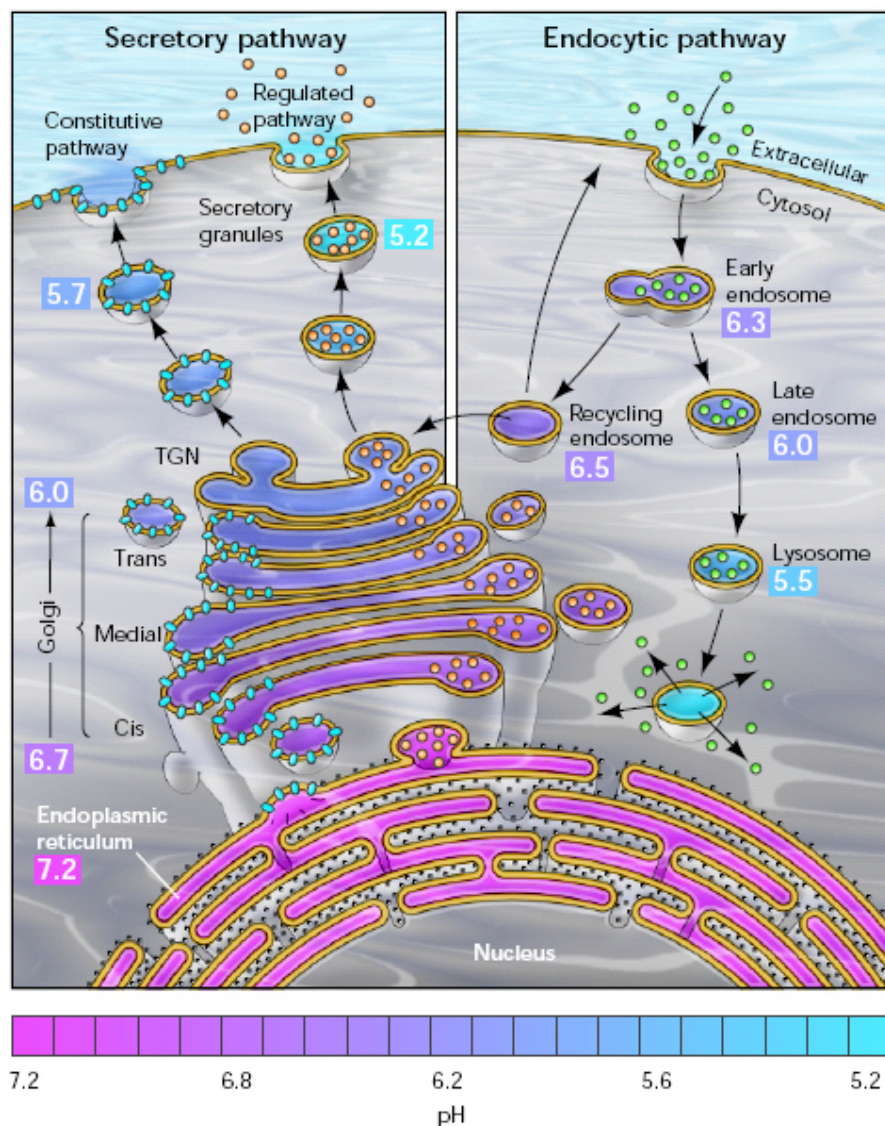


Figura 19: Valores de pH luminal de organelas da via secretória e endocítica. Vários processos fisiológicos como tráfego, ativação enzimática, secreção de vesículas, processamento de proteínas e outros, só ocorrem em determinadas faixas de pH. Dessa forma, as organelas intracelulares possuem pH luminal característico, que está relacionado com suas funções. A maior parte dos valores mostrados nesta figura foram determinados pelo uso de sondas sensíveis ao pH. TGN = rede trans Golgi. Adaptado de Paroutis et al., 2004.

A Rab7 é uma GTPase envolvida fusão entre endosomas tardios e lisosomas (revisado por Bucci et al, 2000). O mutante Q67L gera uma molécula constitutivamente ativa que promove a fusão homotípica destas organelas e como resultado desta fusão, as células apresentam endosomas tardios e lisosomas bem maiores. Essa construção tem sido utilizada em vários trabalhos como marcador de endosomas tardios/lisosomas (Bucci et al., 2000; Gutierrez et al., 2004; Dale et al., 2004).

As células SN56 transfectadas transientemente com Rab7Q67L-GFP foram incubadas com a STI-1 AF568 durante 20 e 40 minutos. As imagens destes experimentos mostram que a maior parte das vesículas contendo STI-1 são vesículas marcadas com Rab7Q67L (fig. 20 e 21), sugerindo que as vesículas acídicas duplamente marcadas vistas no experimento com Lysosensor sejam endosomas tardios/lisosomas.

O experimento com este marcador utilizando 20 minutos de incubação mostrou que a maior parte das vesículas contendo STI-1 recém-formadas a partir da membrana plasmática também são endosomas/lisosomas. Este resultado reforça a nossa hipótese de que a STI-1 é direcionada para vesículas acídicas sem passar primeiro por endosomas primários.

Os resultados após 40 minutos de incubação com a STI-1 mostra a presença de várias vesículas duplamente marcadas na região perinuclear (Fig. 21C), que também está de acordo com o resultado observado para Lysosensor.

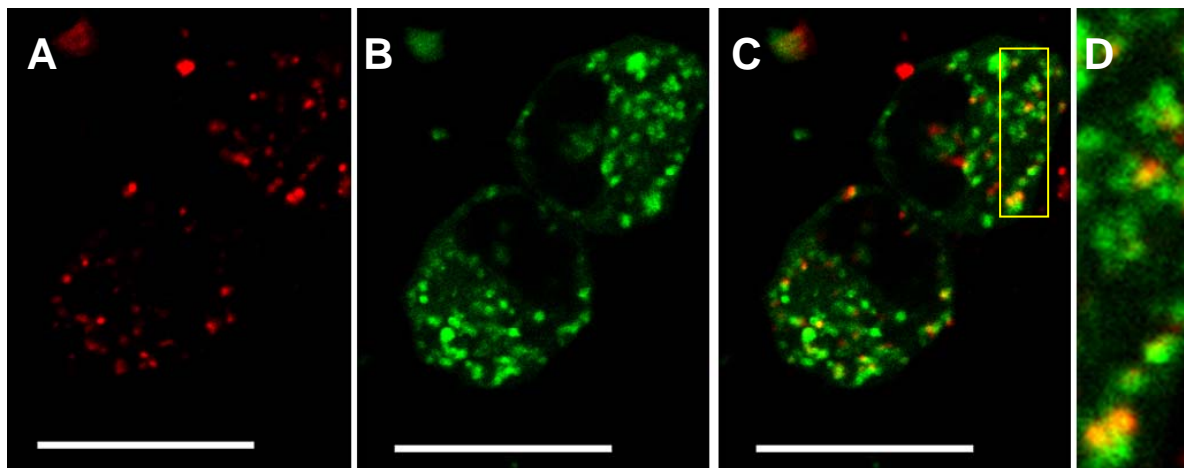


Figura 20: Presença de STI-1 em endosomas/lisosomas. Células SN56 foram transientemente transfectadas com Rab7Q67L-GFP e incubadas com 1 μ M de STI-1 AF568 por 20 minutos. Em **A** está representada a marcação de STI-1 AF568 e em **B** vê-se a presença de grandes endosomas tardios e lisosomas marcados com Rab7Q67L-GFP. A imagem de sobreposição mostra várias vesículas duplamente marcadas na região próxima à membrana plasmática (**C**). Em **D** está representada uma região ampliada de **C** para evidenciar a colocalização. Este resultado corresponde a uma imagem representativa de três experimentos independentes. Barra = 20 μ m.

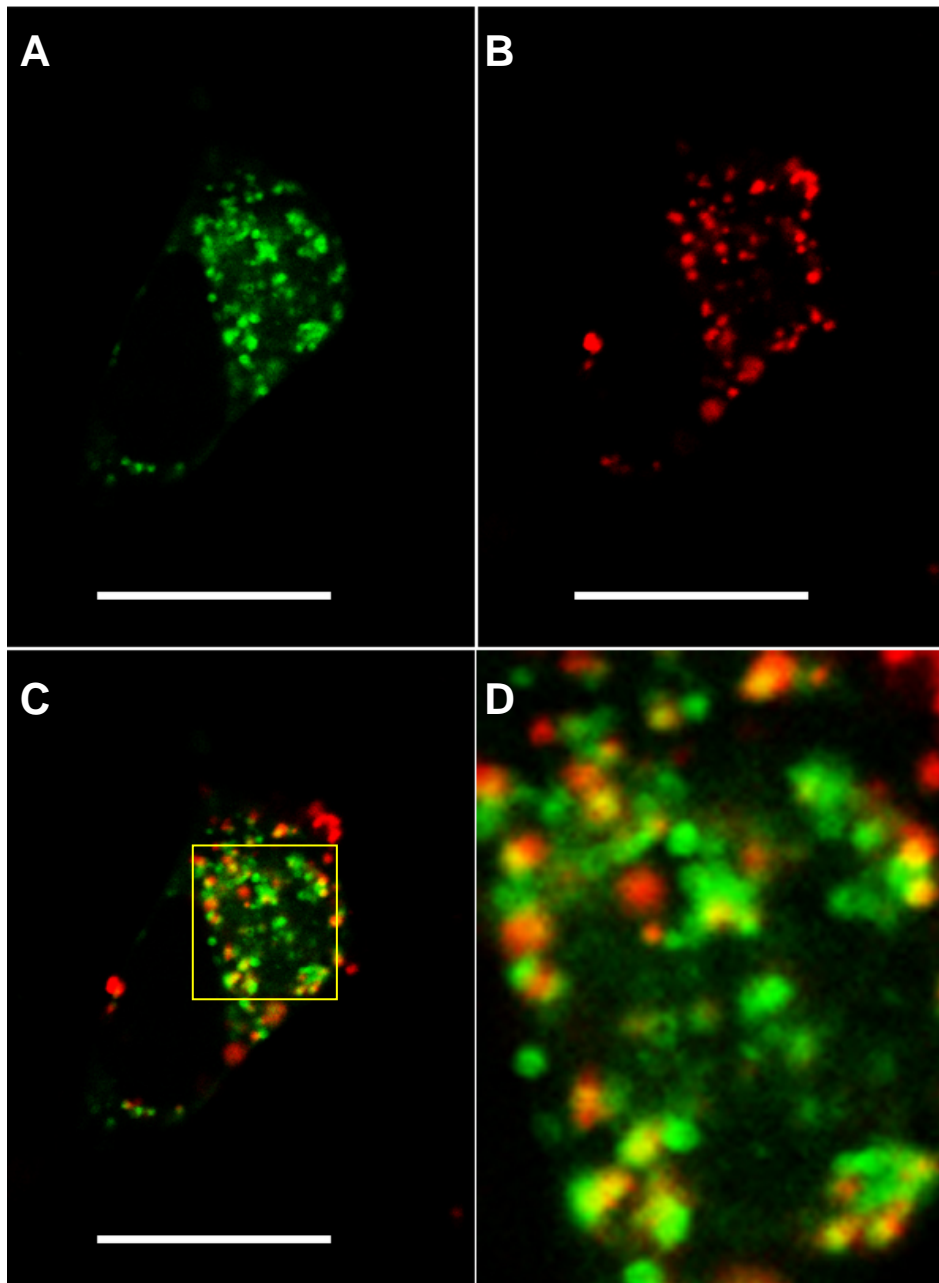


Figura 21: Presença de STI-1 em endosomas/lisosomas. Células SN56 foram transientemente transfectadas com Rab7Q67L-GFP e incubadas com 1 μ M de STI-1 AF568 por 40 minutos. Em **A** está representada a marcação de STI-1 AF568 e em **B** vê-se a presença de grandes endosomas tardios e lisosomas marcados com Rab7Q67L-GFP. A imagem de sobreposição mostra várias vesículas duplamente marcadas na região próxima à membrana plasmática (**C**). Em **D** está representada uma região ampliada de **C** para evidenciar a colocalização. Este resultado corresponde a uma imagem representativa de três experimentos independentes. Barra = 20 μ m.

4.5 ANÁLISE QUANTITATIVA DA CO-LOCALIZAÇÃO

A quantificação da co-localização entre os marcadores usados foi feita utilizando o programa Metamorph. Os resultados estão representados como a porcentagem de STI-1 AF568 presente nas vesículas positivas para os marcadores Lysosensor Green e Rab7Q67L-GFP, \pm o erro padrão da média. Os resultados da análise quantitativa mostram que a maior parte das vesículas positivas para STI-1 também são positivas os marcadores de endosomas tardios/lisosomas (tabela A).

Tabela 3: Porcentagem de co-localização entre marcadores de organelas intracelulares e STI-1

Experimento	N° células	% colocalização
STI-1 + Lysosensor 1H	77	48 \pm 3
STI-1 + Rab7 40'	34	69 \pm 3
STI-1 + Rab7 20'	29	70 \pm 4

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Chaperonas e co-chaperonas constituem um importante grupo de proteínas responsáveis pela promoção e manutenção da conformação nativa das proteínas celulares (Young et al., 2004). Apesar desta família de proteínas serem citosólicas, foi demonstrado que algumas chaperonas como a HSP70 (Guzhova et al., 2001) e HSP90 (Eustace and Jay, 2004), podem ser secretadas. Robinson e colaboradores (2005) mostraram que a HSP70 extracelular atua na sobrevivência de neurônios motores. Baseados neste resultado e nas evidências de que astrócitos são capazes de secretar HSP70, os autores propuseram uma atuação desta chaperona como um fator neurotrófico.

Fatores neurotróficos constituem uma família de proteínas envolvidas na sobrevivência, proliferação e diferenciação neuronal (revisado por Lessmann et al., 2003). Ao longo do desenvolvimento estes fatores são controladamente liberados, atuando na regulação da neurogênese e da neurodiferenciação (revisado por Huang and Reichardt, 2001). Dentre as várias fontes de liberação dos fatores neurotróficos, estão as células gliais, que constituem importantes fontes de fatores como o NGF (fator de crescimento nervoso) e GDNF (fator neurotrófico derivado de células gliais).

Recentes trabalhos têm apontado os astrócitos como importantes reguladores da neurogênese (Airaksinen and Saarma, 2002; Ma et al., 2005), e identificado vários fatores neurotróficos expressos e secretados por estas células (Barkho et al., 2006). Interessantemente, Lima e colaboradores (dados não publicados) mostraram que a STI-1 é secretada por astrócitos em cultura por duas vias, sendo uma utilizando exossomos (Arantes et al, dados não publicados).

Um trabalho anterior já havia demonstrado a secreção da STI-1 homóloga humana (HOP) por células de fibrosarcoma (Eustace and Jay, 2004). Mas até recentemente, nenhuma função para esta STI-1 secretada havia sido proposta. Zanata e colaboradores (2002) mostraram que a STI-1 induz sinais neuroprotetores em explantes de retina através de sua interação com a proteína prion celular. Em 2005, Lopes e colaboradores mostraram que a interação entre STI-1 e PrP^C induz neuritogênese e neuroproteção em culturas de neurônios hipocampais. Interessantemente, os autores viram que a neuritogênese induzida

pela interação destas duas proteínas ativa a mesma via de sinalização (MAP cinase) que neurotrofinas clássicas como a NT-3 ativam (Barnabé-Heider and Miller, 2003). Estes resultados deram origem à hipótese de que a STI-1 secretada por astrócitos atue como um fator neurotrófico em neurônios, induzindo neuroproteção e neuritogênese através da sua interação com a proteína prion celular.

A partir desta hipótese, e tendo em mente que a sinalização de alguns fatores neurotróficos como o NGF depende de seu o tráfego intracelular (Saxena et al., 2005), nós decidimos estudar a interação da STI-1 com células neuronais.

Como modelo neuronal nós utilizamos as células SN56. Esta linhagem celular foi gerada através da fusão somática de neurônios do septo de camundongo com o neuroblastoma N18TG2 (Hammond et al., 1990; Lee et al., 1990a, 1990b), resultando desta forma em uma célula híbrida. As células SN56 apresentam várias características colinérgicas como a expressão de Chat (colina acetil transferase), de receptores muscarínicos (Rosoff et al., 1996) e síntese de acetilcolina (Berse and Blusztajn, 1997). Além disso, quando tratadas com Dibutilil cAMP ou foskolina, estas células se diferenciam, emitindo uma grande rede de neuritos, e expressam canais de cálcio neuronais tipo L, N e P/Q (Kushmerick et al., 2001). Dessa forma, essa é uma linhagem celular bem caracterizada como modelo neuronal. Uma outra razão para utilizarmos essa linhagem é que vários estudos em relação ao tráfego de PrP^C e PrP^{Sc} já foram feitos nestas células (Magalhães et al., 2005; Magalhães et al., 2002).

Uma importante ferramenta para o estudo de tráfego de proteínas em células vivas é a conjugação de proteínas de interesse purificadas com moléculas de corantes fluorescentes. Essa foi a estratégia usada pelo nosso grupo para estudar o tráfego de STI-1 nas células SN56. Dessa forma, STI-1 recombinante, produzida no Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer, foi conjugada às moléculas dos corantes fluorescentes Alexa Fluor 488 ou 568. Estudos preliminares, realizados no Instituto Ludwig, com a proteína marcada demonstraram que as principais bandas marcadas com alexa fluor568 ou 488 presentes nas amostras de STI-1 foram reconhecidas por anticorpo específico para esta proteína (Anexo). Estes estudos também demonstraram que a marcação com os corantes fluorescentes não alterou a funcionalidade de STI-1 (Anexo).

Os experimentos iniciais de interação da STI-1 com as células SN56 mostraram que a STI-1 interage com estas células, sendo internalizada. Nestes experimentos vimos que a STI-1 é endocitada pelas células SN56, localizando-se próximo à região da membrana plasmática nos primeiros 20 minutos de interação, e distribuindo-se por todo o citoplasma após 40 minutos de interação com estas células.

A endocitose é um processo dinâmico essencial para a homeostasia celular (Mellman, 1996). Moléculas de superfície podem ser internalizadas por mecanismos dependentes ou independentes de alguma via endocítica (Vivèst et al., 1997; Pelkmans and Helenius, 2003). Os mecanismos independentes de via endocítica são poucos conhecidos, e foram descritos para alguns peptídeos como peptídeos da família das homeoproteínas em *Drosófilas* (Derossi et al., 1994), e peptídeo derivado da proteína Tat HIV-1 (Vivèst et al., 1997). Estes processos, assim como a Potocitose são insensíveis à temperatura, não sendo portanto inibidos a 4 °C (Anderson et al., 1992). No caso dos mecanismos de internalização que envolvem vias endocíticas, a maior parte destes processos são ativos, dependentes de energia, e ocorrem à temperatura fisiológica (revisto por Maxfield and MacGraw, 2004).

Para avaliarmos se a endocitose de STI-1 ocorre por um processo dependente de via endocítica, foi realizado um experimento incubando-se a STI-1 com células SN56 à 4 °C. O resultado deste experimento mostrou que a STI-1 não é internalizada nesta temperatura, sugerindo que esse processo envolva mecanismos dependentes de vias endocíticas. A observação de que alguns aglomerados de STI-1 permaneceram na membrana após a incubação a 4 °C, também nos levou a sugerir que a endocitose desta proteína seja mediada por um receptor.

Dentre os mecanismos de internalização que envolvem vias endocíticas, a endocitose mediada por receptor é o processo melhor caracterizado até hoje. Várias moléculas de superfície atuam como receptores para ligantes endógenos e exógenos. Os receptores são, em sua maioria, proteínas, mas já foi demonstrado que outras moléculas como os gangliosídeos atuam como receptores, mediando a internalização de toxinas bacterianas (Fishman, 1982). Algumas características de interação são intrínsecas do complexo ligante-receptor, como a especificidade de ligação e saturabilidade (Habich et al., 2002).

Uma das maneiras de se avaliar a presença e a especificidade de um receptor é através de ensaios de competição. Trabalhos utilizando uma mesma proteína conjugada e não conjugada com corantes fluorescentes mostraram que é possível bloquear a internalização de um ligante através do pré-bloqueio de seu receptor (Gekle et al., 1995; Habich et al., 2002).

Nós utilizamos essa abordagem neste trabalho, pré-incubando as células SN56 com excesso de STI-1 não conjugada durante 30 minutos a 4°C e logo em seguida, incubando estas células com a STI-1 marcada por 1 hora a 37°C. O resultado deste experimento mostrou que a pré-incubação com STI-1 não marcada conseguiu bloquear a internalização da STI-1 marcada. Nos processos de internalização independentes de receptor, como a macropinocitose, a captação do substrato aumenta proporcionalmente à sua concentração, de modo que este processo não é bloqueado pelo excesso de ligante (revisado por Gekle, 2005). Já os processos de endocitose mediados por receptor são saturáveis, de modo que a internalização do ligante dependerá da reciclagem do receptor de volta à membrana plasmática, ou da síntese de novas moléculas (revisado por Maxfield and MacGraw, 2004). Dessa forma, o resultado do ensaio de competição sugere que a internalização da STI-1 seja mediada por um receptor.

No ensaio de competição onde o pré-bloqueio foi realizado com excesso de STI-1 não marcada, observou-se a internalização da STI-1 marcada durante a aquisição das imagens no microscópio confocal (dados não mostrados). Esta observação sugere que o possível receptor da STI-1 recicle constitutivamente para a membrana plasmática, que é, de acordo com a literatura, um processo constitutivo para a maior parte dos receptores (revisado por Maxfield and MacGraw, 2004).

O pré bloqueio das células SN56 com albumina não alterou a internalização da STI-1 marcada. Como citado anteriormente, a albumina é uma proteína transportadora abundante no plasma, que sofre endocitose mediada por receptor. Esta proteína possui massa molecular próxima a da STI-1 (69 e 66 KDa, respectivamente), de modo que, se a internalização da STI-1 fosse mediada por um receptor não seletivo capaz de internalizar proteínas da mesma ordem de tamanho, este processo seria bloqueado pela pré-incubação com albumina. Logo, a internalização de STI-1 na presença de excesso de albumina sugere que este processo seja específico.

A via mais comum de internalização do complexo ligante-receptor é a via dependente de clatrina. Esta via está envolvida em importantes processos fisiológicos, como a reciclagem de componentes da vesícula sináptica após a liberação de neurotransmissores em resposta a um potencial de ação (revisto por Mousavi et al., 2004). As moléculas internalizadas por esta via dependem da sua ligação com receptores na membrana plasmática que possuem motivos protéicos específicos em seus domínios citosólicos, capazes de se ligarem à proteínas adaptadoras. As proteínas adaptadoras juntamente com os fosfolípidos, recrutam os triesqueletos que promovem a cobertura de clatrina do complexo a ser internalizado (revisto por González-Gaitán and Stenmark, 2003).

Tendo em vista que várias neurotrofinas são internalizadas via clatrina, através de sua interação com os receptores Trk na membrana plasmática (Howe et al., 2001) nós decidimos avaliar o papel desta via na internalização de STI-1. Como os triesqueletos de clatrina são formados pela união de três cadeias leves e três cadeias pesadas, a expressão da cadeia leve de clatrina em fusão com a proteína verde fluorescente (GFP) permite a visualização de vesículas cobertas por triesqueletos de clatrina através de microscopia, sendo portanto uma ótima ferramenta para avaliar a utilização desta via por proteínas exógenas.

Os experimentos em células SN56 transfectadas com clatrina-GFP mostraram que a STI-1 não se co-localizou com clatrina em nenhum dos tempos estudados. Este resultado sugere que a principal via de internalização de STI-1 seja independente da via clássica, mas uma outra possibilidade seria que a passagem desta proteína por vesículas cobertas por clatrina ocorresse rapidamente, de modo que não seriam visualizadas nos tempos estudados. Para esclarecer melhor esta questão, nós utilizamos um outro marcador da via clássica: a transferrina.

O receptor de transferrina é uma das proteínas clássicas que segue a via endocítica mediada por clatrina (revisto por Maxfield and MacGraw, 2004). Como a transferrina permanece ligada ao seu receptor até que ele retorne à membrana plasmática, a conjugação desta proteína com corantes fluorescentes também permite a visualização de endosomas primários e de reciclagem por microscopia de fluorescência.

Os nossos resultados de dupla marcação das células SN56 com STI-1 AF568 e transferrina AF488 mostraram que a STI-1 está presente em organelas distintas

daquelas marcadas para transferrina. Estes resultados sugerem que a STI-1 não é direcionada para endosomas primários e de reciclagem, que são organelas clássicas da via mediada por clatrina, e portanto, reforçam a hipótese de que a STI-1 não utilize esta via para ser internalizada.

Já foi demonstrado que o SV40 e a CTxB podem ser direcionados para endosomas primários a partir de uma via endocítica independente de clatrina (Pelkmans et al, 2004). Neste trabalho, os autores mostraram que vesículas caveolares se fundem com endosomas primários por um mecanismo dependente de Rab5, formando estruturas distintas. Este e outros trabalhos sugerem a existência de populações distintas de endosomas primários, originados a partir de vias endocíticas diferentes, cuja formação é regulada pela GTPase Rab5 (revisado por Galperin and Sorkin, 2003; revisado por Le Roy and Wrana, 2005).

Dessa forma, a utilização da construção Rab5-GFP nos permitiu avaliar se a STI-1 era direcionada para alguma população de endosomas primários. Os nossos resultados mostraram que as vesículas marcadas para STI-1 são distintas daquelas marcadas para Rab5, novamente sugerindo que a STI-1 não é direcionada para endosomas primários.

É interessante notar que até aqui, os nossos dados de internalização da STI-1 nas células SN56 mostram que o tráfego desta proteína não coincide com o tráfego de PrP^c descrito nestas células (Magalhães et al., 2002). Magalhães e colaboradores (2005) mostraram que a via de internalização da proteína prion infecciosa também é diferente daquela utilizada por PrP^c. Enquanto PrP^c é endocitado principalmente via clatrina, se acumulando em endosomas Rab5 positivos, Golgi e endosomas de reciclagem, PrP^{Sc} é endocitado independente de clatrina e se acumula em endosomas tardios/lisosomas (Magalhães et al., 2002, 2005).

Decidimos então avaliar a presença de STI-1 em vesículas acídicas, e para isso nós realizamos experimentos de dupla marcação utilizando STI-1 AF568 e a sonda acidotrópica Lysosensor Green. Os nossos resultados mostraram que 48% das vesículas positivas para STI-1 eram positivas para Lysosensor.

Na busca pela identidade destas organelas acídicas nós utilizamos um marcador de endosomas tardios/lisosomas: Rab7. A expressão do mutante constitutivamente ativo Rab7Q67L etiquetado com GFP em células SN56 confirmou a localização da STI-1 em endosomas tardios/lisosomas.

Uma observação importante nos experimentos utilizando Rab7Q67L-GFP foi a visualização de várias vesículas positivas para STI-1 e para esta Rab, após 20 minutos de incubação, localizadas na região da membrana plasmática. Esta observação sugere que a STI-1 seja direcionada rapidamente para endossomos tardios/lisosomas após ser internalizada.

De acordo com os nossos resultados, a internalização da STI-1 ocorre principalmente por uma via independente de clatrina que direciona esta proteína para endossomos tardios/lisosomas. Um mecanismo independente de clatrina que poderia estar envolvido na endocitose de STI-1 é o caveolae. Este mecanismo requer a presença de caveolina, uma proteína de 22 KDa que recobre as vesículas de caveolae gerando um aspecto estriado. Foi verificado em trabalhos anteriores que as células SN56 diferenciadas não expressam caveolina, conseqüentemente não expressando os domínios caveolares (Magalhães, Tese Doutorado). Dessa forma, este mecanismo não deve estar envolvido na endocitose de STI-1 independente de clatrina nas células SN56.

Tendo em vista a presença dos caveolares em astrócitos (Cameron et al., 1997), e a importância destas células para o desenvolvimento neuronal, novos estudos serão realizados para melhor esclarecer o papel dos caveolares na endocitose de STI-1.

Uma outra possibilidade seria a internalização da STI-1 por macropinocitose, tendo em vista que marcadores desta via como o Dextran, são direcionados para endossomos tardios/lisosomas após serem endocitados (revisto por Pelkmans and Helenius, 2003). Porém, como citado anteriormente, a macropinocitose é um processo endocítico independente de receptor (revisto por Swanson and Watts, 1995), e os nossos resultados mostraram que endocitose de STI-1 é um processo específico, saturável, e mediado por um receptor.

Apesar da maior parte dos processos de internalização mediados por receptor envolverem clatrina, é possível que proteínas ou lípidos presentes nos domínios "rafts" atuem como receptor de STI-1 mediando a internalização independente de clatrina desta proteína. Os lípidos "rafts" são domínios constituídos por colesterol, glicoesfingolípides e proteínas, e estão envolvidos na regulação de vários processos fisiológicos como tráfego de proteínas e transdução de sinal (revisto por Simons and Ikonen, 1997).

Recentemente, Suzuki e colaboradores (2004) mostraram que o receptor TrkB é translocado para os domínios “rafts” em resposta à sua ligação a BDNF. Os autores demonstraram que a esta translocação resulta em uma potencialização da sinalização mediada por BDNF na sinapse. Outras neurotrofinas, como da família GDNF, também sinalizam através de sua interação com receptores ancorados por GPI presentes nos domínios rafts (revisto por Le Roy and Wrana, 2005). Estes trabalhos exemplificam a importância destes domínios na sinalização mediada por fatores neurotróficos.

A endocitose mediada por lípidos “rafts” já foi descrita para várias moléculas como TGF β R e IL2R β (revisto por Le Roy and Wrana, 2005). Mas o destino intracelular das moléculas endocitadas por esta via ainda é pouco caracterizado. Dessa forma, novos estudos serão desenvolvidos para avaliar se esta é a principal via endocítica envolvida na internalização da STI-1.

Novas vias endocíticas têm sido propostas nos últimos anos. Recentemente, Glebov e colaboradores (2006) demonstraram que a flotilina-1, um marcador de lípidos “rafts”, está envolvida em uma nova via endocítica independente de clatrina e de caveolina. Shao e colaboradores (2002) propuseram uma via intermediária entre a macropinocitose e a endocitose mediada por receptor, responsável pela endocitose e transporte retrógrado das neurotrofinas. Dessa forma, outros experimentos serão desenvolvidos utilizando novos marcadores de vias endocíticas, para caracterizar melhor o tráfego da STI-1 e a implicação deste processo nos efeitos mediados por esta proteína.

Além de direcionar moléculas para degradação, sabe-se que a endocitose e o tráfego intracelular de moléculas de superfície estão envolvidos em diversos processos fisiológicos. Em relação aos fatores neurotróficos, o tráfego intracelular é fundamental para sinalização. De acordo com o modelo de endosoma de sinalização, o complexo NGF-TrkA após sofrer internalização é transportado retrogradamente através destas organelas até o corpo celular para exercer seus efeitos (Grimes et al., 1996; Saxena et al., 2005). Trabalhos utilizando células PC12 mostraram que a inibição da internalização do receptor de NGF, TrkA, leva à inibição da sinalização mediada por esta neurotrofina (Zhang et al., 2000). Além disso a alteração do tráfego deste receptor ao longo da via endocítica leva à alterações na sinalização, exarcebando ou diminuindo seus efeitos (Saxena et al., 2005).

Estes e outros trabalhos mostram que o tráfego intracelular de moléculas está diretamente envolvido com as funções fisiológicas das mesmas, assim como alterações neste processo podem estar relacionadas com doenças. Portanto o estudo do tráfego da STI-1 pode nos ajudar a entender melhor suas funções e conseqüentemente as funções do seu ligante: a proteínas prion celular.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- ↳ A STI-1 é endocitada principalmente por via independente de clatrina;
- ↳ Após sofrer endocitose a STI-1 é direcionada para endosomas tardios/lisosomas sem passar por endosomas primários.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abazeed ME, Blanchette JM, Fuller RS (2005) Cell-free transport from the trans-Golgi network to late endosome requires factors involved in formation and consumption of clathrin-coated vesicles. *Journal of Biological Chemistry* 280: 4442-4450.

Aguzzi A, Polymenidou M (2004) Mammalian prion biology: One century of evolving concepts. *Cell* 116: 313-327.

Airaksinen MS, Saarma M (2002) The GDNF family: Signalling, biological functions and therapeutic value. *Nature Reviews Neuroscience* 3: 383-394.

Anderson DJ (1993) Cell Fate Determination in the Peripheral Nervous-System - the Sympathoadrenal Progenitor. *Journal of Neurobiology* 24: 185-198.

Anderson RGW, Kamen BA, Rothberg KG, Lacey SW (1992) Potocytosis - Sequestration and Transport of Small Molecules by Caveolae. *Science* 255: 410-411.

Arevalo JC, Wu SH (2006) Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cellular and Molecular Life Sciences* 63: 1523-1537.

Atwal JK, Massie B, Miller FD, Kaplan DR (2000) The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and PI3-kinase. *Neuron* 27: 265-277.

Barkho BZ, Song HJ, Aimone JB, Smrt RD, Kuwabara T, Nakashima K, Gage FH, Zhao XY (2006) Identification of astrocyte-expressed factors that modulate neural stem/progenitor cell differentiation. *Stem Cells and Development* 15: 407-421.

Barnabe-Heider F, Miller FD (2003) Endogenously produced neurotrophins regulate survival and differentiation of cortical progenitors via distinct signaling pathways. *Journal of Neuroscience* 23: 5149-5160.

Berse B, Blusztajn JK (1997) Modulation of cholinergic locus expression by glucocorticoids and retinoic acid is cell-type specific. *Febs Letters* 410: 175-179.

Blatch GL, Lassel M (1999) The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* 21: 932-939.

Borchelt DR, Taraboulos A, Prusiner SB (1992) Evidence for Synthesis of Scrapie Prion Proteins in the Endocytic Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 267: 16188-16199.

Brown DA, Rose JK (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68(3):533-44.

Brown DR, Qin KF, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, vonBohlen A, SchulzSchaeffer W, Giese A, Westaway D, Kretzschmar H (1997) The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 390: 684-687.

Brown DR (2001) Prion and prejudice: normal protein and the synapse. *Trends in Neurosciences* 24: 85-90.

Bucci C, Thomsen P, Nicoziani P, McCarthy J, van Deurs B (2000) Rab7: A key to lysosome biogenesis. *Molecular Biology of the Cell* 11: 467-480.

Cameron PL, Ruffin JW, Bollag R, Rasmussen H, Cameron RS (1997) Identification of caveolin and caveolin-related proteins in the brain. *Journal of Neuroscience* 17: 9520-9535.

Campana V, Sarnataro D, Zurzolo C (2005) The highways and byways of prion protein trafficking. *Trends in Cell Biology* 15: 102-111.

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

Caughey B, Raymond GJ (1991) The Scrapie-Associated Form of Prp Is Made from A Cell-Surface Precursor That Is Both Protease-Sensitive and Phospholipase-Sensitive. *Journal of Biological Chemistry* 266: 18217-18223.

Caughey B, Raymond GJ, Ernst D, Race RE (1991) N-Terminal Truncation of the Scrapie-Associated Form of Prp by Lysosomal Protease(S) - Implications Regarding the Site of Conversion of Prp to the Protease-Resistant State. *Journal of Virology* 65: 6597-6603.

Chiarini LB, Freitas ARO, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R (2002) Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *Embo Journal* 21: 3317-3326.

Chuang HH, Prescott ED, Kong HY, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, Julius D (2001) Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P-2-mediated inhibition. *Nature* 411: 957-962.

Cohen S, Levimontalcini R (1956) A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Snake Venom. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 42: 571-&.

Conese M, Nykjaer A, Petersen CM, Cremona O, Pardi R, Andreasen PA, Gliemann J, Christensen EI, Blasi F (1995) Alpha-(2)-Macroglobulin Receptor Ldl-Receptor-Related-Protein (Lrp)-Dependent Internalization of the Urokinase Receptor. *Journal of Cell Biology* 131: 1609-1622.

Czekay RP, Kuemmel TA, Orlando RA, Farquhar MG (2001) Direct binding of occupied urokinase receptor (uPAR) to LDL receptor-related protein is required for endocytosis of uPAR and regulation of cell surface urokinase activity. *Molecular Biology of the Cell* 12: 1467-1479.

Dale LB, Seachrist JL, Babwah AV, Ferguson SSG (2004) Regulation of angiotensin II type 1A receptor intracellular retention, degradation, and recycling by Rab5, Rab7, and Rab11 GTPases. *Journal of Biological Chemistry* 279: 13110-13118.

Damke H, Baba T, Warnock DE, Schmid SL (1994) Induction of Mutant Dynamin Specifically Blocks Endocytic Coated Vesicle Formation. *Journal of Cell Biology* 127: 915-934.

Das AK, Cohen PTW, Barford D (1998) The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *Embo Journal* 17: 1192-1199.

Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, Prochiantz A (1994) The 3Rd Helix of the Antennapedia Homeodomain Translocates Through Biological-Membranes. *Journal of Biological Chemistry* 269: 10444-10450.

Du YZ, Fischer TZ, Clinton-Luke P, Lercher LD, Dreyfus CF (2006) Distinct effects of p75 in mediating actions of neurotrophins on basal forebrain oligodendrocytes. *Molecular and Cellular Neuroscience* 31: 366-375.

Eustace BK, Jay DG (2004) Extracellular roles for the molecular chaperone, hsp90. *Cell Cycle* 3: 1098-1100.

Faure J, Lachenal G, Court M, Hirrlinger J, Chatellard-Causse C, Blot B, Grange J, Schoehn G, Goldberg Y, Boyer V, Kirchhoff F, Raposo G, Garin J, Sadoul R (2006) Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Molecular and Cellular Neuroscience* 31: 642-648.

Fevrier B, Raposo G (2004) Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Current Opinion in Cell Biology* 16: 415-421.

Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, Laude H, Raposo G (2004) Cells release prions in association with exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 9683-9688.

Fishman PH (1982) Role of Membrane Gangliosides in the Binding and Action of Bacterial Toxins. *Journal of Membrane Biology* 69: 85-97.

Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG (1995) De-Novo Formation of Caveolae in Lymphocytes by Expression of Vip21-Caveolin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 8655-8659.

Gaidarov I, Santini F, Warren RA, Keen JH (1999) Spatial control of coated-pit dynamics in living cells. *Nature Cell Biology* 1: 1-7.

Gajdusek DC, Zigas V (1957) Degenerative Disease of the Central Nervous System in New-Guinea - the Endemic Occurrence of Kuru in the Native Population. *New England Journal of Medicine* 257: 974-978.

Gajdusek DC (1996) Infectious amyloids: subacute spongiform encephalopathies as transmissible cerebral amyloidoses, p. 2851-2900. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.

Galperin E, Sorkin A (2003) Visualization of Rab5 activity in living cells by FRET microscopy and influence of plasma-membrane-targeted Rab5 on clathrin-dependent endocytosis. *Journal of Cell Science* 116: 4799-4810.

Gekle M, Mildenerger S, Freudinger R, Silbernagl S (1995) Endosomal Alkalinization Reduces J(Max) and K-M of Albumin Receptor-Mediated Endocytosis in Ok Cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 37: F899-F906.

Gekle M (2005) Renal tubule albumin transport. *Annual Review of Physiology* 67: 573-594.

Glebov OO, Bright NA, Nichols BJ (2006) Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nature Cell Biology* 8: 46-U16.

González-Gaitán M, Stenmark H (2003) Endocytosis and Signaling: A Relationship under Development. *Cell* 115: 513-521.

Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Forlenza OV, Cabral ALB, Veiga SS, Juliano MA, Roesler R, Walz R, Minetti A, Izquierdo I, Martins VR, Brentani RR (2000) Cellular prion protein binds laminin and mediates neuriteogenesis. *Molecular Brain Research* 76: 85-92.

Grimes ML, Zhou J, Beattie EC, Yuen EC, Hall DE, Valletta JS, Topp KS, Lavail JH, Bunnnett NW, Mobley WC (1996) Endocytosis of activated TrkA: Evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes. *Journal of Neuroscience* 16: 7950-7964.

Gutierrez MG, Munafo DB, Beron W, Colombo MI (2004) Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *Journal of Cell Science* 117: 2687-2697.

Guzhova I, Kislyakova K, Moskaliyova O, Fridlanskaya I, Tytell M, Cheetham M, Margulis B (2001) In vitro studies show that Hsp70 can be released by glia and that exogenous Hsp70 can enhance neuronal stress tolerance. *Brain Research* 914: 66-73.

Habich C, Baumgart K, Kolb H, Burkart V (2002) The receptor for heat shock protein 60 on macrophages is saturable, specific, and distinct from receptors for other heat shock proteins. *Journal of Immunology* 168: 569-576.

Haigh CL, Edwards K, Brown DR (2005) Copper binding is the governing determinant of prion protein turnover. *Molecular and Cellular Neuroscience* 30: 186-196.

Hammond DN, Lee HJ, Tonsgard JH, Wainer BH (1990) Development and Characterization of Clonal Cell-Lines Derived from Septal Cholinergic Neurons. *Brain Research* 512: 190-200.

Harris DA (1999) Cellular biology of prion diseases. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 429-+.

Harris DA, True HL (2006) New insights into prion structure and toxicity. *Neuron* 50: 353-357.

Hill AF, Joiner S, Wadsworth JDF, Sidle KCL, Bell JE, Budka H, Ironside JW, Collinge J (2003) Molecular classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* 126: 1333-1346.

Houlgatte R, Mallat M, Brachet P, Prochiantz A (1989) Secretion of Nerve Growth-Factor in Cultures of Glial-Cells and Neurons Derived from Different Regions of the Mouse-Brain. *Journal of Neuroscience Research* 24: 143-152.

Howe CL, Valletta JS, Rusnak AS, Mobley WC (2001) NGF signaling from clathrin-coated vesicles: Evidence that signaling endosomes serve as a platform for the Ras-MAPK pathway. *Neuron* 32: 801-814.

Huang EJ, Reichardt LF (2001) Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. *Annual Review of Neuroscience* 24: 677-736.

Johnson LS, Dunn KW, Pytowski B, McGraw TE (1993) Endosome acidification and receptor trafficking: bafilomycin A1 slows receptor externalization by a mechanism involving the receptor's internalization motif. *Molecular Biological Cell* 4(12):1251-66.

Keshet GI, Ovadia H, Taraboulos A, Gabizon R (1999) Scrapie-infected mice and PrP knockout mice share abnormal localization and activity of neuronal nitric oxide synthase. *Journal of Neurochemistry* 72: 1224-1231.

Kiang JG, Tsokos GC (1998) Heat shock protein 70 kDa: Molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacology & Therapeutics* 80: 183-201.

Kirkham M, Parton RG (2005) Clathrin-independent endocytosis: New insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1745: 273-286.

Korsching S (1993) The Neurotrophic Factor Concept - A Reexamination. *Journal of Neuroscience* 13: 2739-2748.

Kushmerick C, Romano-Silva MA, Gomez MV, Prado MAM (2001) Changes in Ca²⁺ channel expression upon differentiation of SN56 cholinergic cells. *Brain Research* 916: 199-210.

Lafon-Cazal M, Adjali O, Galelotti N, Poncet J, Jouin P, Homburger V, Bockaert J, Marin P (2003) Proteomic analysis of astrocytic secretion in the mouse - Comparison with the cerebrospinal fluid proteome. *Journal of Biological Chemistry* 278: 24438-24448.

Lakadamyali M, Rust MJ, Zhuang XW (2006) Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes. *Cell* 124: 997-1009.

Le Roy C, Wrana JL (2005) Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6: 112-126.

Lee HJ, Hammond DN, Large TH, Roback JD, Sim JA, Brown DA, Otten UH, Wainer BH (1990) Neuronal Properties and Trophic Activities of Immortalized Hippocampal Cells from Embryonic and Young-Adult Mice. *Journal of Neuroscience* 10: 1779-1787.

Lee HJ, Hammond DN, Large TH, Wainer BH (1990) Immortalized Young-Adult Neurons from the Septal Region - Generation and Characterization. *Developmental Brain Research* 52: 219-228.

Legname G, Baskakov IV, Nguyen HOB, Riesner D, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB (2004) Synthetic mammalian prions. *Science* 305: 673-676.

Lemmon SK (2001) Clathrin uncoating: Auxilin comes to life. *Current Biology* 11: R49-R52.

Lessmann V, Gottmann K, Malcangio M (2003) Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Progress in Neurobiology* 69: 341-374.

Levi-Montalcini R (1987) The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237:1154-62

Lim DA, Alvarez-Buylla A (1999) Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 7526-7531.

Lopes MH (2004) Envolvimento da proteína prion celular e seus ligantes nos mecanismos de plasticidade neuronal e neuroproteção. Tese de Doutorado. Centro de Tratamento e Pesquisa – Hospital do Câncer Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer.

Lopes MH, Hajj GNM, Muras AG, Mancini GL, Castro RMPS, Ribeiro KCB, Brentani RR, Linden R, Martins VR (2005) Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neurogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *Journal of Neuroscience* 25: 11330-11339.

Ma DK, Ming GL, Song HJ (2005) Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis. *Current Opinion in Neurobiology* 15: 514-520.

Mabbott NA, MacPherson GG (2006) Prions and their lethal journey to the brain. *Nature Reviews Microbiology* 4: 201-211.

Magalhães AC (2005) Internalização e Tráfego de PrPs. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Farmacologia e Bioquímica Molecular.

Magalhaes AC, Silva JA, Lee KS, Martins VR, Prado VF, Ferguson SSG, Gomez MV, Brentani RR, Prado MAM (2002) Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. *Journal of Biological Chemistry* 277: 33311-33318.

Magalhaes AC, Baron GS, Lee KS, Steele-Mortimer O, Dorward D, Prado MAM, Caughey B (2005) Uptake and neuritic transport of scrapie prion protein coincident with infection of neuronal cells. *Journal of Neuroscience* 25: 5207-5216.

Mallucci G, Collinge J (2005) Rational targeting for prion therapeutics. *Nature Reviews Neuroscience* 6: 23-34.

Mallucci GR, Ratten S, Asante EA, Linehan J, Gowland I, Jefferys JGR, Collinge J (2002) Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *Embo Journal* 21: 202-210.

Martins VR, Graner E, Garcia-Abreu J, de Souza SJ, Mercadante AF, Veiga SS, Zanata SM, Neto VM, Brentani RR (1997) Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. *Nature Medicine* 3: 1376-1382.

Maxfield FR, McGraw TE (2004) Endocytic recycling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5: 121-132.

Mayor S, Riezman H (2004) Sorting GPI-anchored proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5: 110-120.

McClellan AJ, Tam S, Kaganovich D, Frydman J (2005) Protein quality control: chaperones culling corrupt conformations. *Nature Cell Biology* 7: 736-741.

Mckinley MP, Taraboulos A, Kenaga L, Serban D, Stieber A, DeArmond SJ, Prusiner SB, Gonatas N (1991) Ultrastructural-Localization of Scrapie Prion Proteins in Cytoplasmic Vesicles of Infected Cultured-Cells. *Laboratory Investigation* 65: 622-630.

Mellman I (1996) Endocytosis and molecular sorting. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 12: 575-625.

Monici M (2005) Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnology Annual Review* 11:227-56.

Moore RC, Lee IY, Silverman GL, Harrison PM, Strome R, Heinrich C, Karunaratne A, Pasternak SH, Chishti MA, Liang Y, Mastrangelo P, Wang K, Smit AFA, Katamine S, Carlson GA, Cohen FE, Prusiner SB, Melton DW,

Tremblay P, Hood LE, Westaway D (1999) Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein Doppel. *Journal of Molecular Biology* 292: 797-817.

Morris RJ, Parkyn CJ, Jen A (2006) Traffic of prion protein between different compartments on the neuronal surface, and propagation of prion disease. *FEBS Letters* 580(23):5565-5571.

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

Mouillet-Richard S, Pietri M, Schneider B, Vidal C, Mutel V, Launay JM, Kellermann O (2005) Modulation of serotonergic receptor signaling and cross-talk by prion protein. *Journal of Biological Chemistry* 280: 4592-4601.

Mousavi SA, Malerod L, Berg T, Kjekken R (2004) Clathrin-dependent endocytosis. *Biochemical Journal* 377: 1-16.

Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR (1997) Endocytosis. *Physiological Reviews* 77: 759-803.

Mullins C, Bonifacino JS (2001) The molecular machinery for lysosome biogenesis. *Bioessays* 23: 333-343.

Nakayama K (2004) Membrane Traffic: Editorial Overview. *Biochemical Journal* 380: 751-753.

Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends in Neurosciences* 26: 523-530.

Nichols BJ, Lippincott-Schwartz J (2001) Endocytosis without clathrin coats. *Trends in Cell Biology* 11: 406-412.

Nichols BJ, Kenworthy AK, Polishchuk RS, Lodge R, Roberts TH, Hirschberg K, Phair RD, Lippincott-Schwartz J (2001) Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. *Journal of Cell Biology* 153: 529-541.

Nichols BJ (2002) A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex. *Nature Cell Biology* 4: 374-378.

Nykjaer A, Petersen CM, Moller B, Jensen PH, Moestrup SK, Holtet TL, Ertter M, Thogersen HC, Munch M, Andreasen PA, Gliemann J (1992) Purified Alpha-2-Macroglobulin Receptor Ldl Receptor-Related Protein Binds Urokinase-Bullet-Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 Complex - Evidence That the Alpha-2-Macroglobulin Receptor Mediates Cellular Degradation of Urokinase Receptor-Bound Complexes. *Journal of Biological Chemistry* 267: 14543-14546.

Nykjaer A, Kjoller L, Cohen RL, Lawrence DA, Garniwagner BA, Todd RF, Vanzonneveld AJ, Gliemann J, Andreasen PA (1994) Regions Involved in Binding of Urokinase-Type-1 Inhibitor Complex and Prourokinase to the Endocytic Alpha(2)-Macroglobulin Receptor Low-Density-Lipoprotein Receptor-Related Protein - Evidence That the Urokinase Receptor Protects Prourokinase Against Binding to the Endocytic Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 269: 25668-25676.

Paroutis P, Touret N, Grinstein S (2004) The pH of the secretory pathway: Measurement, determinants, and regulation. *Physiology* 19: 207-215.

Parton RG, Richards AA (2003) Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: New insights and common mechanisms. *Traffic* 4: 724-738.

Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A (2001) Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nature Cell Biology* 3: 473-483.

Pelkmans L, Helenius A (2003) Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Current Opinion in Cell Biology* 15: 414-422.

Pelkmans L, Burli T, Zerial M, Helenius A (2004) Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell* 118: 767-780.

Peters PJ, Mironov A, Peretz D, van Donselaar E, Leclerc E, Erpel S, DeArmond SJ, Burton DR, Williamson RA, Vey M, Prusiner SB (2003) Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *Journal of Cell Biology* 162: 703-717.

Pfeffer S, Aivazian D (2004) Targeting RAB GTPases to distinct membrane compartments. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5: 886-896.

Pfeffer SR (2001) Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function. *Trends in Cell Biology* 11: 487-491.

Pimpinelli F, Lehmann S, Maridonneau-Parini I (2005) The scrapie prion protein is present in flotillin-1-positive vesicles in central- but not peripheral-derived neuronal cell lines. *European Journal of Neuroscience* 21: 2063-2072.

Pinheiro TJT (2006) The role of rafts in the fibrillization and aggregation of prions. *Chemistry and Physics of Lipids* 141: 66-71.

Piper RC, Luzio JP (2001) Late endosomes: Sorting and partitioning in multivesicular bodies. *Traffic* 2: 612-621.

Pol A, Calvo M, Lu A, Enrich C (2000) EGF triggers caveolin redistribution from the plasma membrane to the early/sorting endocytic compartment of hepatocytes. *Cellular Signalling* 12: 537-540.

Prado MAM, Alves-Silva J, Magalhaes AC, Prado VF, Linden R, Martins VR, Brentani RR (2004) PrPc on the road: trafficking of the cellular prion protein. *Journal of Neurochemistry* 88: 769-781.

Prusiner SB (1982) Novel Proteinaceous Infectious Particles Cause Scrapie. *Science* 216: 136-144.

Prusiner SB (1996) Prions, p. 2901-2950. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed), *Virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.

Prusiner SB (1998) Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 13363-13383.

Puri V, Watanabe R, Singh RD, Dominguez M, Brown JC, Wheatley CL, Marks DL, Pagano RE (2001) Clathrin-dependent and -independent internalization of plasma membrane sphingolipids initiates two Golgi targeting pathways. *Journal of Cell Biology* 154: 535-547.

Rajendran L, Simons K (2005) Lipid rafts and membrane dynamics. *Journal of Cell Science* 118: 1099-1102.

Rajendran L, Honsho M, Zahn TR, Keller P, Geiger KD, Verkade P, Simons K (2006) Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 11172-11177.

Re L, Rossini F, Re F, Bordicchia M, Mercanti A, Fernandez OSL, Barocci S (2006) Prion protein potentiates acetylcholine release at the neuromuscular junction. *Pharmacological Research* 53: 62-68.

Resh MD (1998) Fatty acylation of membrane proteins: Lessons from the Src family and HIV Gag. *Faseb Journal* 12: A1296.

Ribeiro FM, Alves-Silva J, Volkandt W, Martins-Silva C, Mahmud H, Wilhelm A, Gomez MV, Rylett RJ, Ferguson SSG, Prado VF, Prado MAM (2003) The hemicholinium-3 sensitive high affinity choline transporter is internalized by clathrin-mediated endocytosis and is present in endosomes and synaptic vesicles. *Journal of Neurochemistry* 87: 136-146.

Ribeiro FM, Black SAG, Cregan SP, Prado VF, Prado MAM, Rylett RJ, Ferguson SSG (2005) Constitutive high-affinity choline transporter endocytosis is determined by a carboxyl-terminal tail dileucine motif. *Journal of Neurochemistry* 94: 86-96.

Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends in Neurosciences* 20: 570-577.

Robinson MB, Tidwell JL, Gould T, Taylor AR, Newbern JM, Graves J, Tytell M, Milligan CE (2005) Extracellular heat shock protein 70: A critical component for motoneuron survival. *Journal of Neuroscience* 25: 9735-9745.

Rodman JS, Wandinger-Ness A (2000) Rab GTPases coordinate endocytosis - Commentary. *Journal of Cell Science* 113: 183-192.

Rosoff ML, Wei J, Nathanson NM (1996) Isolation and characterization of the chicken m2 acetylcholine receptor promoter region: Induction of gene transcription by leukemia inhibitory factor and ciliary neurotrophic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 14889-14894.

Rossi D, Cozzio A, Flechsig E, Klein MA, Rulicke T, Aguzzi A, Weissmann C (2001) Onset of ataxia and Purkinje cell loss in PrP null mice inversely correlated with Dpl level in brain. *Embo Journal* 20: 694-702.

Sabharanjak S, Sharma P, Parton RG, Mayor S (2002) GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Developmental Cell* 2: 411-423.

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

Sakudo A, Lee DC, Li SM, Nakamura T, Matsumoto Y, Saeki K, Itohara S, Ikuta K, Onodera T (2005) PrP cooperates with STI1 to regulate SOD activity in PrP-deficient neuronal cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 328: 14-19.

Saxena S, Bucci C, Weis J, Kruttgen A (2005) The small GTPase Rab7 controls the endosomal trafficking and neuritogenic signaling of the nerve growth factor receptor TrkA. *Journal of Neuroscience* 25: 10930-10940.

Scheufler C, Brinker A, Bourenkov G, Pegoraro S, Moroder L, Bartunik H, Hartl FU, Moarefi I (2000) Structure of TPR domain-peptide complexes: Critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* 101: 199-210.

Schimmoller F, Simon I, Pfeffer SR (1998) Rab GTPases, directors of vesicle docking. *Journal of Biological Chemistry* 273: 22161-22164.

Seebach BS, Arvanov V, Mendell LM (1999) Effects of BDNF and NT-3 on development of Ia motoneuron functional connectivity in neonatal rats. *Journal of Neurophysiology* 81: 2398-2405.

Shao YF, Akmentin W, Toledo-Aral JJ, Rosenbaum J, Valdez G, Cabot JB, Hilbush BS, Halegoua S (2002) Pincher, a pinocytic chaperone for nerve growth factor/TrkA signaling endosomes. *Journal of Cell Biology* 157: 679-691.

Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569-572.

Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1: 31-39.

Song YT, Masison DC (2005) Independent regulation of Hsp70 and Hsp90 chaperones by Hsp70/Hsp90-organizing protein Sti1 (Hop1). *Journal of Biological Chemistry* 280: 34178-34185.

Sonnichsen B, De Renzis S, Nielsen E, Rietdorf J, Zerial M (2000) Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5 and Rab11. *Journal of Cell Biology* 149: 901-913.

Steele AD, Emsley JG, Ozdinler PH, Lindquist S, Macklis JD (2006) Prion protein (PrPc) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 3416-3421.

Stuermer CAO, Langhorst MF, Wiechers MF, Legler DF, von Hanwehr SH, Guse AH, Plattner H (2004) PrPc capping in T cells promotes its association with the lipid raft proteins reggie-1 and reggie-2 and leads to signal transduction. *Faseb Journal* 18.

Sunyach C, Jen A, Deng J, Fitzgerald KT, Frobert Y, Grassi J, McCaffrey MW, Morris R (2003) The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *Embo Journal* 22: 3591-3601.

Suzuki S, Numakawa T, Koshimizu H, Kojima M (2003) Brain-derived neurotrophic factor induced recruitment of receptor tyrosine kinase TrkB into lipid rafts in cortical neurons. *Journal of Neurochemistry* 87: 124.

Swanson JA, Watts C (1995) Macropinocytosis. *Trends in Cell Biology* 5: 424-428.

Taylor DR, Watt NT, Perera WSS, Hooper NM (2005) Assigning functions to distinct regions of the N-terminus of the prion protein that are involved in its copper-stimulated, clathrin-dependent endocytosis. *Journal of Cell Science* 118: 5141-5153.

Théry C, Zitvogel L, Amigorena S (2002) Exosomes: Composition, Biogenesis and Function. *Nature Reviews Immunology* 2: 569-579.

Torchilin VP, Rammohan R, Weissig V, Levchenko TS (2001) TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 8786-8791.

Trowbridge IS, Collawn JF, Hopkins CR (1993) Signal-Dependent Membrane-Protein Trafficking in the Endocytic Pathway. *Annual Review of Cell Biology* 9: 129-161.

Valdez G, Akmentin W, Philippidou P, Kuruvilla R, Ginty DD, Halegoua S (2005) Pincher-mediated macroendocytosis underlies retrograde signaling by neurotrophin receptors. *Journal of Neuroscience* 25: 5236-5247.

van der Spuy J, Kana BD, Dirr HW, Blatch GL (2000) Heat shock cognate protein 70 chaperone-binding site in the co-chaperone murine stress-inducible protein 1 maps to within three consecutive tetratricopeptide repeat motifs. *Biochemical Journal* 345: 645-651.

Vicarioabejon C, Johe KK, Hazel TG, Collazo D, Mckay RDG (1995) Functions of Basic Fibroblast Growth-Factor and Neurotrophins in the Differentiation of Hippocampal-Neurons. *Neuron* 15: 105-114.

Vives E, Brodin P, Lebleu B (1997) A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *Journal of Biological Chemistry* 272: 16010-16017.

Wadsworth JD, Hill AF, Beck JA, Collinge J (2003) Molecular and clinical classification of human prion disease. *British Medical Bulletin* 66: 241-254.

Young JC, Agashe VR, Siegers K, Hartl FU (2004) Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5: 781-791.

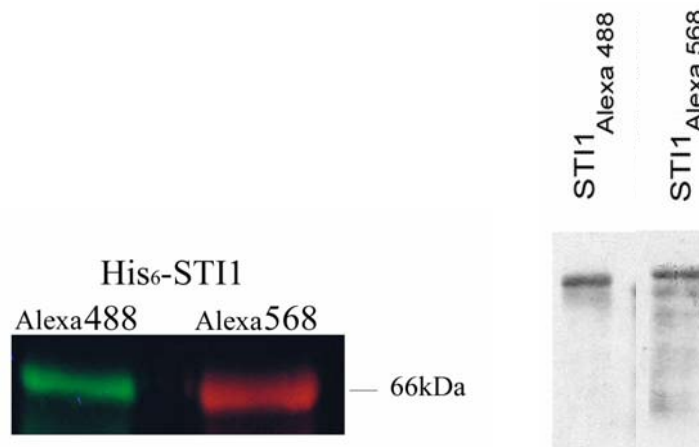
Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, Hajj GNM, Chiarini LB, Nomizo R, Freitas ARO, Cabral ALB, Lee KS, Juliano MA, de Oliveira E, Jachieri SG, Burlingame A, Huang L, Linden R, Brentani RR, Martins VR (2002) Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *Embo Journal* 21: 3307-3316.

Zhang YZ, Moheban DB, Conway BR, Bhattacharyya A, Segal RA (2000) Cell surface Trk receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation. *Journal of Neuroscience* 20: 5671-5678.

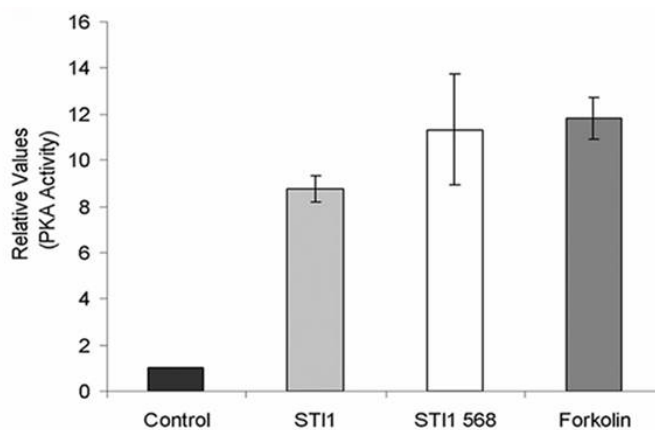
8 ANEXO

8 ANEXO

A



B



Anexo: Análise da STI-1 fluorescente. A - marcação da STI-1 recombinante com os corantes fluorescentes Alexa Fluor 488 (verde) e Alexa Fluor 568 (vermelho). As amostras com a proteína marcada foram submetidas a SDS PAGE e Western Blot. A utilização de anticorpos contra STI-1 mostra a seletividade da marcação. **B** – avaliação da funcionalidade da STI-1 marcada. A ativação da PKA pela STI-1 marcada foi da mesma magnitude que aquela vista com a STI-1 não marcada, sugerindo que a conjugação com corantes fluorescentes não altera a funcionalidade desta proteína. O ativador de PKA, Forskolin, foi utilizado como controle positivo. Estes experimentos foram realizados no Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer pelo grupo de pesquisa da Dra. Vilma R. Martins.