

Ana Cristina Ribeiro Magalhães

Internalização e Tráfego de PrPs

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular
Belo Horizonte
Fevereiro de 2005

Ana Cristina Ribeiro Magalhães

Internalização e Tráfego de PrPs

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

Orientador: Dr. Marco Antônio Máximo Prado

*Aos meus pais, Rosa e Roberto
e irmãos, Luciano e Flávio,
Pelo amor incondicional*

*Ao querido Alex,
pelo amor e incentivo constante*

Agradecimentos

Ao meu orientador, Marcão, pela oportunidade de realização deste projeto, pela confiança, pelas conversas e inúmeras sugestões que muito contribuíram para o projeto e para meu amadurecimento profissional.

Ao professor Marcus Vinicius Gomez, pelo exemplo de dedicação à Ciência e pelo entusiasmo contagiante.

A professora Vânia pelo apoio constante e aos amigos do laboratório de Neurobiologia, pela colaboração no projeto.

Aos pesquisadores do Instituto Ludwig, Vilma Martins, Ricardo Brentani e Kil Sun Lee pela constante colaboração em nosso projeto.

Aos amigos do laboratório de Neurofarmacologia pela convivência prazerosa durante estes anos, pelo apoio e troca de idéias, pelo incentivo e pela constante ajuda na hora dos “apertos”.

Aos queridos Heltinho, Júnior, André, Magda e Cristina, veteranos do lab quando eu iniciei e que muito me auxiliaram durante este período.

As minhas queridas amigas Luciene, Melzinha e Fabs, companheiras de estudo (lembram quando estudávamos para o TOEFL juntas? Hahaha..Deu certo!). Sem dúvida aprendi bem mais do que inglês junto com vocês. Obrigada pelo carinho e apoio!

A meus queridos amigos Lu, Lenício e Dedé que fizeram parte do dia a dia deste trabalho, dos momentos estressantes aos mais cômicos.

A grande Anita! Pelo apoio, pelo companheirismo, compreensão, risadas e alegrias. Você é muito especial!

A querida Jumps, uma pessoa muito especial e amiga. Apreendi muito trabalhando com você. Obrigada, Ju!

Aos queridos amigos do lab, Cristina Martins, Chris, Rosângela, Virgínia, Rodrigo, Guilherme, Dawidson, Píndaro, Mateus, Renan, Bruno e Antônio. Amigos com quem sempre pude contar. Aproveito pra dar boas vindas aos recém chegados (pelo menos pra mim...) como a Dani, Bruno, Felipe, Stephany, Livia, Geraldo, Carol, Bráulio e desejar muito sucesso pra todos vocês!

Ao apoio técnico da Eliane e Adriane.

Ao Dr. Byron Caughey por me receber em seu Lab no NIH, pela gentileza, paciência e apoio durante o desenvolvimento do projeto.

Ao Gerry Baron pelas inúmeras conversas e discussões que me ajudaram tanto durante este estágio. Além disso, todo o apoio técnico com protocolos, macetes e também pelos momentos divertidos e risadas.

Aos colegas do Lab of Persistent Viral Diseases, Gerry, Jay Silveira, John, David Kocisco, Abbi, Kristine, Ravi, Sailam, Kil, Andy, Lynne e Greg.

A Dra. Olivia Steele-Mortimer e pos docs do seu lab, Leigh, Dan e Scott pelo apoio e auxílio no uso do confocal.

Ao David Doward do departamento de microscopia do NIH.

A Sônia pela paciência e auxílio constante.

Ao Curso de Pós Graduação de farmacologia Bioquímica e Molecular, pelo suporte dado para realização deste trabalho.

E novamente agradeço a minha família, Alex, meu pai, Rosa e Roberto, irmãos, Luciano e Flávio, cunhadas, Larissa e Tatiana, sobrinhos fofos, Lara e Lorenzo e avós queridos, Delfina, Mariano e Beto.

Índice

Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	x
Lista de Abreviaturas	xi
Resumo	xiii
Abstract	xv
1 – Introdução	1
1.1 - Proteína Prion Celular (PrP ^c ou PrP ^{sen})	1
1.2 - Interações protéicas e função fisiológica de PrP ^c	2
1.3 - Internalização e tráfego de proteínas	7
1.4 - Internalização e tráfego de PrP ^c	12
1.5 - Proteína prion “scrapie” ou PrP ^{sc} ou PrPres	15
1.6 - Doenças causadas por Prion ou Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis	17
1.7 - Conversão “PrP ^{sen} → PrPres”	20
1.8 - Hipótese de apenas proteína como agente infeccioso	23
1.9 - Infecção e tráfego de PrPres	24
2 – Objetivos	26
3 – Material e Métodos	27
3.1 - Construção dos plasmídeos	27
3.2 - Cultura de células e transfecção	28
3.3 - Ensaio de internalização de PrP ^c	29
3.4 - Marcação de organelas em SN56 com Bodipy-TR, Transferrina, Lysotracker, toxina da cólera, Dextran e FM4-64	30
3.5 – Tratamento de células SN56 com Brefeldin A	32
3.6 – Tratamento de células SN56 com Cicloheximida	32
3.7 – Imunoblot	32
3.8 – Precipitação e detecção de PrPres	33
3.9 – Marcação de PrPres com alexa 568	34
3.10 – Infecção de células SN56 com PrPres fluorescente	35

3.11 – Protocolos de Biosegurança	35
4 – Resultados	36
4.1 - Distribuição de GFP-PrP ^c e GFP-PrP Δ 32-121 nas células SN56	36
4.2 - Dupla marcação das células expressando GFP-PrP ^c ou GFP-PrP Δ 32-121 com Bodipy-TR, Transferrina ou FM4-64	39
4.3 - Ensaio de internalização de GFP- PrP ^c e GFP-PrP Δ 32-121	50
4.4 - Avaliação do papel da dinamina na internalização de PrP ^c	53
4.5 - Papel do motivo GPI na endocitose de PrP ^c	58
4.6 - Papel da clatrina na internalização de PrP ^c	58
4.7 - Avaliação da expressão de clatrina e caveolina em células SN56	62
4.8 – Infecção de células SN56 com PrPres fluorescente	66
4.9 – Tratamento de células SN56 com diferentes fibrilas	76
4.10 – Localização intracelular de Ch PrPres – alexa568	76
4.11 – Mutantes de Rab 7 e formação de PrPres em células N2a	84
5 – Discussão	89
6 – Referências Bibliográficas	102
7 – Anexo	118

Lista de Figuras

Figura 1a: Estrutura primária da proteína PrP ^c de camundongo	3
Figura 1b: Modelo da molécula de PrP ^c	3
Figura 2: Mapa de restrição e múltiplo sítio de clonagem (MCS) do vetor de clonagem e expressão pEGFP-C1	27
Figura 3: Representação esquemática das construções GFP-PrP ^c e GFP-PrP Δ 32-121	28
Figura 4: Distribuição de GFP-PrP ^c e GFP-PrP Δ 32-121 em células SN56	37
Figura 5: Gráfico da frequência cumulativa para a distribuição da fluorescência GFP-PrP ^c e GFP-PrP Δ 32-121 na membrana plasmática e na região perinuclear de células SN56	38
Figura 6: Dupla marcação de células SN56 com Bodipy FL e TR e tratamento com BFA	41
Figura 7: Células SN56 expressando GFP-PrP ^c e marcadas com Bodipy-TR	42
Figura 8: Células SN56 expressando GFP-PrP Δ 32-121 e marcadas com Bodipy-TR	43
Figura 9: Células SN56 expressando GFP-PrP ^c e marcadas com Transferrina	44
Figura 10: Células SN56 expressando GFP-PrP Δ 32-121 e marcadas com Transferrina	45
Figura 11: Células SN56 expressando GFP-PrP ^c e marcadas com FM4 – 64	47
Figura 12: Células SN56 expressando GFP-PrP Δ 32-121 e marcadas com FM4 – 64	48
Figura 13: Células SN56 expressando GFP-PrP ^c , tratadas com cicloheximida e marcadas com FM4-64	49
Figura 14: Ensaio de internalização de GFP-PrP ^c por cobre (500 μ M)	51
Figura 15: Quantificação da internalização de GFP-PrP ^c e GFP-PrP Δ 32-121 em resposta ao cobre (500 μ M).	52
Figura 16: Co-expressão de GFP-PrP ^c e Dinamina-I selvagem ou Dinamina K44A em células SN56	55
Figura 17: Célula co-transfectada com GFP-PrP ^c e Dinamina-I K44A.	56
Figura 18: Ensaio de internalização em células co-expressando GFP-PrP ^c e Dinamina-I K44A ou Dinamina-I selvagem na presença de cobre (500 μ M)	57
Figura 19: Co-expressão de GFP-GPI e Dinamina-I selvagem ou Dinamina K44A em células SN56	59
Figura 20: Avaliação do papel de AP180-C na internalização de transferrina-alexa 568	60

Figura 21: Gráfico de frequência cumulativa para a distribuição da fluorescência na membrana plasmática e na região perinuclear em células SN56 co-expressando GFP-PrP ^c e AP180	61
Figura 22: Ensaio de internalização em células co-expressando GFP-PrP ^c e AP180-C na presença de cobre (500μM).	64
Figura 23: Imunoblot de clatrina e caveolina 1 em células SN56 diferenciadas.	65
Figura 24: Gel e Imunoblot mostrando amostras de PrPres conjugadas com alexa-568	67
Figura 25: Células SN56 incubadas com Ch PrPres-alexa568	68
Figura 26: Células SN56 incubadas com 87V e 263K PrPres-alexa568	71
Figura 27: Gráfico de frequência cumulativa para a distribuição dos valores da área dos agregados entre diferentes cepas	72
Figura 28: Células SN56 incubadas com microssomos-alexa568 de cérebro de camundongos normais e infectados com Chandler	73
Figura 29: Avaliação da infectividade das amostras de PrPres conjugadas com alexa-568	75
Figura 30: Células SN56 incubadas com fibrilas de PrP recombinante e fibrilas de peptídeos β1-42	77
Figura 31: Células SN56 infectadas com Ch PrPres-alexa568 e marcadas com Cólera toxina e transferrina	80
Figura 32: Células SN56 transfectadas com GFP-VACHT e infectadas com Ch PrPres-alexa568	81
Figura 33: Células SN56 infectadas com Ch PrPres-alexa568 e marcadas com dextran e lisotracker ou tratadas com fibrilas de peptídeos aβ1-42 e marcadas com lisotracker	82
Figura 34: Células SN56 marcadas com corante alexa 568 livre	83
Figura 35: Células SN56 transfectadas com GFP-Rab 7 Q67L e infectadas com Ch PrPres-alexa568	86
Figura 36: Produção de PrPres em células N2a infectadas com Ch PrPres e expressando Rab7 e mutantes	87
Figura 37: Gráfico mostrando a quantidade de PrPres produzido em células N2a infectadas com Ch PrPres e expressando Rab 7 e mutantes	88
Figura 38: Esquema da endocitose e tráfego de GFP-PrP ^c	95

Lista de Tabelas

Tabela 1: Doenças causadas por prion	19
Tabela 2: Comprimentos de onda de absorção e emissão dos marcadores fluorescentes utilizados	31

Lista de Abreviaturas

AP	Adaptor Protein
ARF	ADP-ribosylation factor
BFA	Brefeldin A
BSA	Bovine serum albumine
BSE	Bovine Spongiform Encephalopathy
CJD	Creutzfeldt-Jakob Disease
CWD	Chronic Wasting Disease
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ácido etilenodiaminatetracético
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
fCJD	Familiar Creutzfeldt-Jakob Disease
FL	Fluoresceína
FFI	Fatal Familial Insomnia
GAG	Glicosaminoglicano
GFP	Green Fluorescent Protein
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GSS	Gerstmann-Straussle-Sheinker disease
HBSS	Hepes Buffered Saline Solution
HEPES	Hidroxietil-piperazina- <i>N</i> -2-etano-sulfônico
iCJD	iatrogenic CJD
MEM	Minimal Essential Médium
OptiMEM	Modificação do Eagle Medium
PBS	Phosphate-buffered Solution
PiPLC	Phospholipase C Phosphatidylinositol specific
PrP ^c	Proteína prion celular
PK	Proteinase K
PrP ^{sen}	Proteína prion sensível a tratamento com proteinase K
PrP ^{sc}	Proteína prion scrapie
PrP ^{res}	Proteína prion resistente a tratamento com proteinase K

PTA	Sodium Phosphotungstic Acid
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RNA	Ácido ribonucléico
sCJD	Sporadic CJD
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
STI-1	Stress inducible Protein 1
TR	Texas Red
TBS	Tris-Buffered Saline
UV	Radiação Ultravioleta
VACht	Vesicular acetylcholine transporter
vCJD	Variant CJD

Resumo

A proteína prion celular (PrP^{sen} ou PrP^c) é uma proteína expressa em vários tipos celulares, especialmente em neurônios. Esta proteína apresenta uma estrutura rica em alfa hélices, no entanto pode sofrer uma mudança de conformação secundária gerando uma isoforma conhecida como PrP^{res} (ou PrP^{sc}). Esta isoforma apresenta uma estrutura predominante de folhas beta e adquire a capacidade de se associar formando amilóides, bem como resistência a tratamento com proteases. Através de um mecanismo biológico ainda pouco esclarecido, PrP^{res} é capaz de promover a conversão de moléculas de PrP^{sen} para PrP^{res}. A formação e deposição de agregados insolúveis de PrP^{res} no sistema nervoso estão relacionados a uma série de doenças neurodegenerativas raras e fatais.

A internalização e tráfego intracelular destas isoformas podem revelar informações importantes sobre o papel fisiológico de PrP^{sen}, bem como os mecanismos de infecção e propagação de PrP^{res} entre células. Interessados nestes mecanismos, nosso grupo construiu uma versão da proteína prion celular ligada a “green fluorescent protein” (GFP) para monitorarmos a distribuição, endocitose e tráfego desta proteína em células neuronais SN56 vivas. Células SN56 expressando esta proteína de fusão (GFP-PrP^c) apresentaram a fluorescência distribuída pela membrana plasmática e em compartimentos intracelulares próximos ao núcleo, de maneira similar a proteína endógena. GFP-PrP^c foi internalizada e direcionada para uma região perinuclear na presença de cobre, indicando um papel importante deste íon na fisiologia de PrP^c. Um mutante de deleção N-terminal (aminoácidos 32 a 121) ligado a GFP apresentou maior acúmulo na membrana plasmática e menor concentração na região perinuclear, sugerindo uma deficiência na endocitose. Além disso, o cobre não foi capaz de induzir a endocitose deste mutante, indicando que a região N-terminal é importante para a endocitose constitutiva e induzida por cobre de PrP^c. Experimentos de dupla marcação indicaram que a região perinuclear positiva para GFP-PrP^c era constituída de endossomas de reciclagem e Golgi.

O mecanismo de endocitose de GFP-PrP^c também foi avaliado e a endocitose constitutiva e induzida por cobre de GFP-PrP^c foi dependente de dinamina I. Células expressando o fragmento C terminal da proteína AP180, que compete com a proteína endógena responsável pelo recrutamento de clatrina para a membrana plasmática,

apresentam 75% de inibição da endocitose dependente de clatrina. Nestas células, a endocitose constitutiva de GFP-PrP^c não sofreu alteração e a induzida por cobre apresentou uma inibição parcial, sugerindo que o mecanismo de endocitose de GFP-PrP^c é complexo, podendo envolver tanto um mecanismo dependente como independente de clatrina. Provavelmente, o mecanismo independente não envolve caveolae, já que não pudemos detectar caveolina, um marcador para caveolae, em células SN56.

Nós também avaliamos a internalização e tráfego de PrPres usando diferentes cepas de PrPres conjugadas à molécula fluorescente alexa568. Células SN56 foram capazes de processar agregados da cepa de PrPres Chandler de camundongo distribuindo a fluorescência em vesículas espalhadas pelo citoplasma e neuritos. Outras cepas de PrPres, 263K e 87V, não foram processadas e internalizadas com a mesma eficiência em células SN56. As células incubadas com Chandler PrPres foram capazes de produzir novas moléculas de PrPres, indicando que estavam infectadas persistentemente, enquanto as cepas 263K e 87V não foram capazes de infectar estas células. Estes dados mostram que a endocitose e tráfego de PrPres foram coincidentes com a infecção das células, sugerindo que as vias utilizadas por PrPres para internalizar e trafegar na célula podem ter importância neste processo.

As vesículas de Chandler PrPres colocalizaram com marcadores para endossomas tardios e lisossomas (dextran e lisotracker) e não colocalizaram com marcadores da via clássica de clatrina (transferrina) ou vesículas provenientes de endocitose por “lipid rafts” (toxina da cólera) indicando que após internalização provavelmente por um mecanismo independente de clatrina ou “rafts”, Chandler PrPres é direcionado para organelas ácidas. A expressão do mutante constitutivamente ativo de Rab 7 (GFP-Rab7 Q67L) confirmou que PrPres está presente em endossomas tardios e lisossomas no corpo e neuritos. Em neuritos, Chandler PrPres não colocalizou com GFP-VACHT, um marcador de vesículas sinápticas. Experimentos com outra linhagem celular (N2a) persistentemente infectada por PrPres indicaram alteração na formação de PrPres na presença de mutantes de Rab 7. Estes dados com Rab7 em SN56 e N2a infectadas sugerem que o tráfego de PrPres pelos endossomas tardios e lisossomas pode ter uma participação no processo de formação de novas moléculas de PrPres.

Abstract

Cellular prion protein (PrP^{sen} ou PrP^c) is expressed in a wide variety of cells, specially neurons. This protein is rich in alpha helix structures, but it can assume an alternative conformational isoform known as PrP^{res} (or PrP^{sc}). PrP^{res} presents mainly beta sheet structure and gains the ability to form aggregates as well as is protease resistant. PrP^{res} is able to propagate by converting PrP^{sen} molecules to the alternative conformation isoform PrP^{res} in a new biologic mechanism, not yet fully understood. Then, PrP^{res} molecules form aggregates that accumulates in the brain causing Prion Diseases, a group of neurodegenerative disorders very rare and fatal.

PrP^{sen} and PrP^{res} internalization and subsequent intracellular trafficking may give important sights about the physiological role of PrP^{sen} and the mechanisms of PrP^{res} infection and propagation between cells. In order to pursue these mechanisms, we used a GFP-tagged version of the mouse cellular prion protein. This construction allowed us to check PrP^{sen} distribution and follow its endocytosis and traffic in a living neuronal cell line, SN56.

SN56 cells expressing GFP-PrP^c showed fluorescence signal distributed at the plasma membrane and in intracellular compartments localized close to the nucleus, similarly to endogenous protein. In response to copper treatment, GFP-PrP^c was internalized and directed to a perinuclear region, suggesting that Cu²⁺ may have an important role in PrP^{sen} physiology. We also examined the steady state distribution of a N-terminal deletion mutant of PrP^{sen} (Δ 32 – 121) tagged with GFP. This mutant showed an accumulation at the plasma membrane and weak labeling of the perinuclear region suggesting an endocytosis deficiency. This mutant did not show internalization after copper treatment suggesting that N-terminal region may be involved with PrP^{sen} endocytosis. Organelle specific markers suggest that the perinuclear region labeled with GFP-PrP^c is composed of recycling endosomes and Golgi.

We also evaluate the mechanism involved in GFP-PrP^c endocytosis and our data suggests that dynamin I is important to both, constitutive and copper induced GFP-PrP^c endocytosis. Cells expressing a C-terminal fragment of AP-180, a protein that recruits clathrin to the plasma membrane, showed 75% inhibition of clathrin dependent endocytosis. In these conditions, constitutive endocytosis of GFP-PrP^c was not altered and the copper induced internalization showed a partial inhibition. These data suggest

that GFP-PrP^c may present a complex endocytosis mechanism involving clathrin dependent and independent pathways. The clathrin independent mechanism does not involve caveolae, since we failed to detect caveolin, a caveolae marker, in SN56 cells.

We also examined PrPres internalization and intracellular trafficking by labeling several PrPres strains with the fluorescent dye alexa568. SN56 cells were able to take up Chandler PrPres from aggregates and distribute this fluorescent protein in vesicles inside the cell body and neuritis. However, those cells were not able to internalize PrPres of other strains, like 263K and 87V, with the same efficiency seen for Chandler PrPres. Moreover, cells treated with Chandler PrPres showed formation of new PrPres molecules, suggesting the establishment of a sustained infection, while cells treated with either 263K or 87V PrPres did not show PrPres formation. These observations suggest that uptake and intracellular trafficking of PrPres coincide with sustained infection in SN56 neuronal cells. Thus, the mechanisms and pathways taken by PrPres may be important to the establishment of a sustained infection.

Chandler PrPres positive vesicles spread in the cell body and neuritis co-localized with late endosomes and lysosomes markers (dextran and lysotracker) and failed to co-localize with markers of clathrin dependent endocytosis (transferrin) or lipid raft endocytosis (cholera toxin), suggesting that those vesicles are directed to acidic organelles after internalization probably using a clathrin and raft independent mechanism. Chandler PrPres positive vesicles did not colocalize with GFP-VACHT, a marker for synaptic vesicles, in neuritis or cell body.

Overexpression of a constitutively active GTP-bound Rab7 fused to GFP (GFP-Rab7 Q67L) showed that Chandler PrPres localizes in late endosomes and lysosomes in the cell body and neuritis. Expression of Rab7 and mutants in another cell line persistently infected with PrPres (N2a) showed alteration of new PrPres formation. The results with infected SN56 and N2a expressing Rab7 mutants suggest that trafficking in late endosomes and lysosomes may play an important role in sustained PrPres formation.

1 - Introdução:

1.1 - Proteína Prion Celular (PrP^c ou PrP^{scn}):

A proteína prion celular é uma sialoglicoproteína (Stahl e cols., 1992) ancorada externamente à membrana das células por motivo de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Stahl e cols., 1997; revisto por Prusiner, 1998) e encontrada também em compartimentos intracelulares como Golgi e endossomas (Negro e cols., 2001; Magalhaes e cols., 2002; Sunyach e cols., 2003; Brown & Harris, 2003; revisto por Harris, 2003). PrP^c ou PrP^{scn}, como também é conhecida devido à sensibilidade ao tratamento com proteases, é codificada por um único exon em um gene de cópia única (Basler e cols., 1986). PrP^c é altamente conservada entre as espécies, com genes descritos para mamíferos, aves e até tartaruga (Wopfner e cols., 1999; Simonic e cols., 2000) e expressa em diversos tipos celulares, especialmente em neurônios onde pode se acumular em membranas pré e pós sinápticas (revisto por Brown, 2001).

O precursor de PrP^c de camundongo apresenta 252 aminoácidos (Fig. 1a) e é direcionado ao lúmen do retículo endoplasmático devido à presença de um peptídeo sinal de 22 aminoácidos na região N-terminal. No retículo, o peptídeo sinal é clivado, o que ocorre também na extremidade C-terminal com 23 aminoácidos, permitindo a adição da âncora de GPI. A proteína transita pelo Golgi e via secretória e sofre glicosilação nos resíduos de asparagina 180 e 196, bem como a formação de ponte dissulfeto entre os aminoácidos 178 e 213, gerando a proteína madura com a conformação adequada. A massa molecular de PrP^c pode variar de 18 a 33 kD de acordo com o seu nível de glicosilação, ou seja deglicosilada, mono ou diglicosilada (revisto por Brown, 2001). Esta proteína madura irá se localizar na superfície externa da membrana celular (Taraboulos e cols., 1990) se acumulando em “lipid rafts” ou plataformas lipídicas, (Kaneko e cols., 1997; Naslavsky e cols., 1999; Baron e cols., 2002). Essas plataformas formam microdomínios na membrana, graças à condensação de esfingolipídeos saturados com colesterol, gerando uma camada lipídica organizada que acumula proteínas ancoradas por GPI e exclui a maioria das proteínas transmembranas (revisto por Simons e Ikonen, 1997). Também foi demonstrado que

várias proteínas relacionadas à vias de transdução de sinal se encontram em “rafts” de uma maneira dependente da presença de colesterol (Foster e cols., 2003).

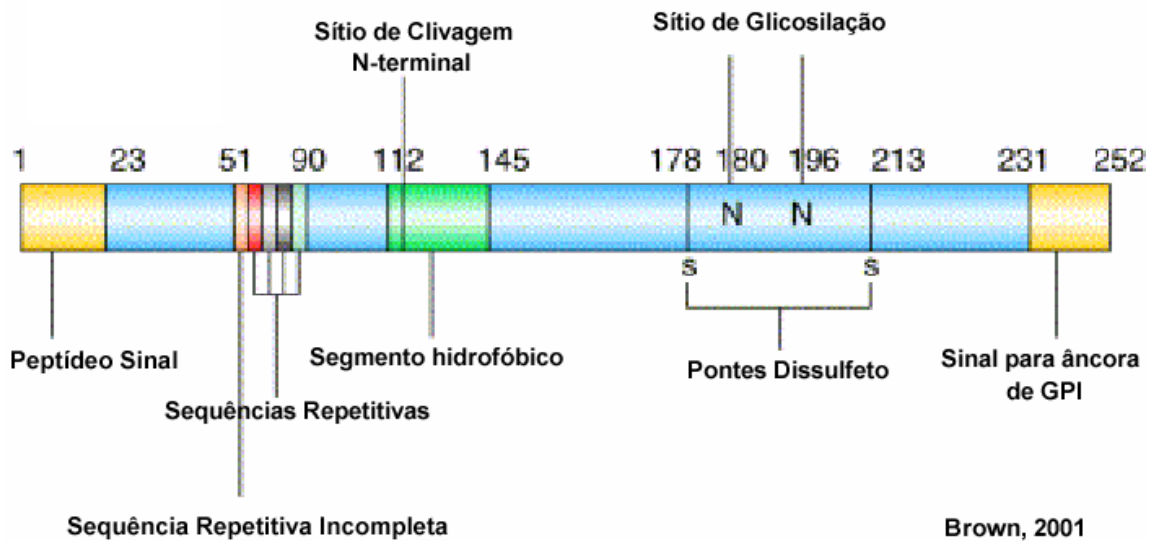
A região N-terminal de PrP^c apresenta 4 cópias completas de uma sequência de 8 aminoácidos ricos em glicina e histidina (PHGGGWGQ; resíduos 51 a 90) e uma cópia incompleta (PQGGTWGQ) que representam uma região altamente conservada entre diferentes espécies de mamíferos e que é capaz de coordenar preferencialmente íons cobre (Hornshaw e cols., 1995; Miura e cols., 1996; Brown e cols., 1997a). Também na região N-terminal encontra-se, entre os aminoácidos 112 e 145, um segmento hidrofóbico contendo um sítio para clivagem da proteína durante seu metabolismo normal (revisto por Brown, 2001).

A região C-terminal da proteína é rica em alfa-hélices consistindo de um domínio globular contendo 3 alfa-hélices, uma folha beta anti-paralela curta e uma única ponte dissulfeto estabilizando a molécula (Riek e cols., 1996); já a metade N-terminal da proteína é altamente flexível não apresentando estrutura secundária definida (Donne e cols., 1997; Riek e cols., 1997) (fig. 1b).

1.2 - Interações protéicas e função fisiológica de PrP^c:

A alta homologia e conservação de PrP^c entre as espécies sugerem um papel fisiológico importante para esta proteína. Com a finalidade de avaliar a função de PrP^c, quatro linhagens de camundongos “knockouts” foram geradas independentemente (Bueler e cols., 1992; Manson e cols., 1994; Sakaguchi e cols., 1995; Moore e cols., 1999). No entanto, os camundongos de todas as linhagens geradas se desenvolveram normalmente sem fenótipo patológico óbvio devido à ausência de PrP^c. Entretanto, animais de duas destas linhagens (Sakaguchi e cols., 1995; Moore e cols., 1999) desenvolveram um quadro de ataxia depois de 70 semanas de idade, devido à superexpressão do gene Doppel, um gene relacionado a PrP^c (Moore e cols., 1999). Alterações eletrofisiológicas no cérebro de uma destas linhagens foram descritas por alguns grupos (Collinge e cols., 1994; Whittington e cols., 1995; Colling e cols., 1996) e não confirmadas por outros (Herms e cols., 1995; Lledo e cols., 1996). Também foram descritas alterações no ritmo circadiano (Tobler e cols., 1996) e maior sensibilidade a estímulos epleptogênicos nesses animais (Walzs e cols., 1999). A ausência de fenótipo

1a)



1b)

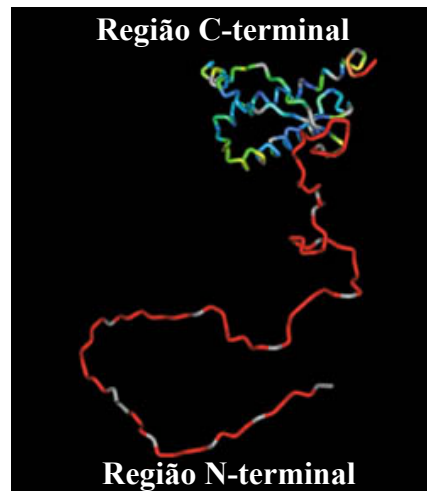


Fig. 1a: Estrutura primária da proteína PrP^c de camundongo. A proteína é ancorada à membrana por GPI, apresenta um peptídeo sinal para direcionar a entrada no retículo endoplasmático e um sinal para ligação de GPI. PrP^c pode ser glicosilada tanto na asparagina 180 como na 196. A proteína possui ainda 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 (revisto por Brown, 2001). 1b: Modelo da molécula de PrP^c mostrando em vermelho, região N-terminal flexível e em verde e azul, região C-terminal rica em alfa-hélices (adaptado de Brown, 2001).

drástico em camundongos “knockouts” sugere a existência de mecanismos compensatórios que propiciem a adaptação destes camundongos à falta da proteína.

Portanto, a função fisiológica de PrP^c ainda é alvo de muitos estudos. Vários grupos de pesquisa concentram esforços na identificação de potenciais ligantes de PrP^c como indicadores de possíveis funções fisiológicas. Como resultado, várias moléculas já foram identificadas e possíveis funções associadas à PrP^c foram descritas.

Como descrito na seção anterior, PrP^c é capaz de ligar íons cobre sugerindo um papel na homeostase deste íon (Brown e cols., 1997a). Além disso, células que não expressam PrP^c apresentam quantidades de cobre e atividade de superóxido dismutase reduzidas resultando em maior sensibilidade à estresse oxidativo (Brown e cols., 1997 a e b). Algumas evidências sugerem que o nível de expressão de PrP^c altera a atividade superóxido dismutase porque PrP^c funcionaria como um sensor de cobre no ambiente e modularia a incorporação deste íon pela enzima, alterando assim a resistência da célula ao estresse oxidativo (Brown & Besinger, 1998). Por outro lado, Waggoner e cols. (2000) não detectaram diferenças na quantidade de cobre ou atividade de superóxido dismutase dependente do nível de expressão da proteína prion celular. PrP^c recombinante de galinha ou camundongo, bem como a proteína nativa, imunoprecipitada à partir de homogenato de cérebro, apresentaram atividade enzimática de superóxido dismutase dependente da região de octapeptídeos (Brown e cols., 1999), sugerindo um papel neuroprotetor contra estresse oxidativo e toxicidade do cobre. Nishimura e cols. (2004) também sugeriram que PrP^c tenha um efeito neuroprotetor contra a toxicidade do cobre através da regulação dos níveis de peróxido de hidrogênio intracelular.

Uma molécula descrita recentemente como ligante de PrP^c é a laminina. Laminina é uma glicoproteína de matrix extracelular com participação importante nos processos de diferenciação, migração e regeneração celular. PrP^c se associa à laminina de maneira específica e com alta afinidade (Graner e cols., 2000a). Esta interação em neurônios de hipocampo de camundongo e rato estimula o crescimento de neuritos (Graner e cols., 2000a). Experimentos em células da linhagem PC-12 confirmaram que a interação PrP^c-laminina é importante em processos de neuritogênese e adesão celular e quando bloqueada causa interrupção do processo de diferenciação, com conseqüente retração de neuritos pré existentes, sugerindo um papel importante na sobrevivência da célula e na plasticidade neuronal (Graner e cols., 2000b). Outro trabalho demonstrou que células deficientes de PrP^c sofriam apoptose em condições de ausência de soro e que os neuritos

destas células eram menos desenvolvidos que os presentes em células expressando PrP^c (Kuwahara e cols., 1999).

Estudos demonstraram que PrP^c pode interagir tanto com plasminogênio como tPA de uma maneira dependente de cobre resultando na ativação deste sistema e consequente produção de plasmina (Ellis e cols., 2002). Plasminogênio, tPA e plasmina têm efeitos tanto fisiológicos como patológicos no cérebro e as consequências desta interação ainda precisam ser avaliadas.

Na busca de um receptor celular para PrP^c, Martins e cols. (1997), baseados na teoria de hidropaticidade complementar, propuseram a existência de um peptídeo ligante de PrP^c. Anticorpos produzidos contra este peptídeo reconheceram uma proteína de 66 kDa identificada posteriormente como STI-1 (Stress-inducible protein 1) ou extendina (Zanata e cols., 2002). STI-1 é uma co-chaperona formadora de macrocomplexos com proteínas da família das chaperonas como Hsp70 e Hsp90 (Lassle e cols., 1997; Blatch e cols., 1997). Zanata e cols. (2002) mostraram que STI-1 é capaz de interagir com PrP^c *in vitro* e *in vivo* induzindo sinais neuroprotetores. Também foi demonstrado em retinas, que a interação PrP^c - STI-1 desencadeia sinalização por cAMP, PKA e ERK, sendo que cAMP e PKA eram responsáveis pelos efeitos neuroprotetores contra apoptose (Chiarini e cols., 2002), evidenciando a função neuroprotetora de PrP^c e seu papel na transdução de sinal. Weise e cols. (2004) mostraram que a expressão de PrP^c no cérebro é aumentada durante processos isquêmicos, sugerindo também o envolvimento em vias neuroprotetoras.

PrP^c também foi relacionado a fenótipos pró-apoptóticos (Paitel e cols., 2002). Os autores sugerem que a superexpressão de PrP^c sensibiliza as células à ativação de caspase 3 induzida por estaurosporina. Este efeito pró-apoptótico pode ser aumentado por inibidores de proteassoma e prevenidos pelo seqüestro de PrP^c por anticorpos específicos. Em contrapartida, Bounhar e cols. (2001) demonstraram que PrP^c atua como um forte protetor contra apoptose mediada por Bax, uma proteína pró-apoptótica neuronal.

“Cross-linking” de PrP^c por anticorpos específicos na superfície de células diferenciadas resultou em transdução de sinal com ativação de proteína tirosina cinase Fyn. Esta ativação foi dependente de caveolina 1, e também pode envolver clatrina (Mouillet-Richard e cols., 2000). Mais recentemente foi demonstrado que “Cross-linking” de PrP^c por anticorpos específicos causaria deslocamento lateral e agregação de PrP^c com as proteínas reggie-1 e reggie-2 presentes em rafts, um processo conhecido

como “capping” em linfócitos T e células Jukart. Este evento resulta em 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. Os autores também demonstraram que decorrente à formação do “capping”, PrP^c era internalizado em lisossomas positivos para proteínas reggie, sugerindo um mecanismo de inativação desta via de sinalização (Stuermer e cols., 2004).

Em sistema de duplo-híbrido foram identificadas duas proteínas, a sinapsina Ib e Grb2, capazes de interagir com PrP^c. Estas moléculas apresentam expressão neuronal e estão envolvidas em sinalização celular, sugerindo novamente que PrP^c tenha um papel em transdução de sinal. Estas interações também foram confirmadas *in vivo* por coimunoprecipitação (Spielhaupter & Schätzl, 2001). Recentemente, Lysek & Wuthrich (2004) identificaram a região entre os aminoácidos 100 a 109 de PrP^c, que é altamente conservada entre as espécies, como o sítio para ligação com o domínio SH3 de Grb2.

Usando técnica de “patch-clamp”, Korte e cols. (2003) demonstraram que concentrações nanomolares de PrP^c recombinante foram capazes de modular canais de cálcio do tipo L dependente de voltagem em células granulares de cerebelo. Este efeito foi dependente da região N-terminal da proteína e abolido por nifedipina, bloqueador de canal de cálcio tipo L.

Outras moléculas também foram descritas como ligantes para PrP^c como N-CAMs (Schmitt-Ulms e cols., 2001), glicosaminoglicanos (Gonzalez-Iglesias e cols., 2002) e o receptor de laminina (Gauczynski e cols., 2001), mas o papel fisiológico destas interações ainda precisa ser avaliado.

PrP^c pode sofrer alterações conformacionais gerando uma isoforma infecciosa responsável por neuropatologias graves e fatais (ver detalhes na seção 1.6) que afetam humanos e outras espécies como bovinos, caprinos, roedores entre outras. Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento destas patologias ainda não estão claros e especula-se que a perda da função de PrP^c ou o ganho da função com a isoforma alterada poderiam levar à estas doenças (Hetz e cols., 2003).

1.3 - Internalização e tráfego de proteínas:

Células eucarióticas apresentam vários mecanismos de endocitose. A endocitose é importante na manutenção da homeostase do organismo, dinâmica de membrana, captação de nutrientes extracelulares, reação à estímulos extracelulares através de dessensibilização ou reciclagem de receptores, transmissão de sinais neuronais, metabólicos ou proliferativos e até defesa contra microorganismos (revisto por Mellman, 1996; D'Hondt e cols., 2000). O mecanismo mais estudado de endocitose é aquele dependente de clatrina. Este processo utiliza de várias interações proteína-proteína ou proteína-lipídeos resultando na internalização de receptores e seus ligantes como descrito a seguir.

Proteínas de membrana apresentam sinais de internalização em sua porção citoplasmática que são reconhecidos por proteínas adaptadoras (APs). Estes sinais compreendem pequena seqüência de aminoácidos contendo um resíduo crítico de tirosina do tipo NPXY, ou um motivo mais geral do tipo YXX ϕ , onde Y, N e P representam respectivamente tirosina, asparagina e prolina. X representa qualquer aminoácido e ϕ representa um aminoácido hidrofóbico (revisto por Mellman, 1996; D'Hondt e cols., 2000; Brodin e cols., 2000; Kirchhausen, 1999 e 2000). Também existem sinais consistindo apenas de duas leucinas ou duas lisinas e ainda simplesmente, uma seqüência de aminoácidos ácidos (revisto por D'Hondt e cols., 2000; Kirchhausen, 1999 e 2000).

Proteínas adaptadoras, como AP-2, são capazes de se associar a estes sinais e então recrutar clatrina para membrana plasmática. O complexo AP-2 consiste de 2 subunidades grandes (α - e β -adaptinas – 100kDa), capazes de ligar clatrina; uma subunidade média (μ - 50 kDa), que reconhece e interage com os sinais de internalização e uma subunidade menor (σ - 20kDa) (revisto por Mellman, 1996; D'Hondt e cols., 2000; Kirchhausen, 1999 e 2000). AP-2 também é capaz de promover deslocamento de proteínas na membrana de forma a concentrar proteínas para serem endocitadas na região de formação da vesícula. Outros adaptadores parecem auxiliar no recrutamento de clatrina, como é o caso de AP180 e CALM (revisto por Mellman, 1996; D'Hondt e cols., 2000; Brodin e cols., 2000; Kirchhausen, 1999 e 2000). AP180 apresenta um sítio de ligação a fosfolípidos e um de ligação a clatrina e alguns dados

sugerem que funciona como regulador do tamanho e curvatura da vesícula em formação (revisto por Brodin e cols., 2000; Ford e cols., 2001).

Clatrina é o principal componente deste mecanismo de endocitose e uma vez na membrana plasmática, recrutada por APs, é capaz de se associar para recobrir as vesículas em formação gerando uma estrutura composta de hexágonos e pentágonos (revisto por Mellman, 1996; Kirchhausen, 2000). Depois de formada, a vesícula precisa ser liberada no citoplasma. Isto ocorre devido à ação da proteína dinamina, uma GTPase que se associa ao “pescoço” da vesícula formada e através da hidrólise de GTP causa fissão da vesícula (revisto por D'Hondt e cols., 2000; McNiven e cols., 2000). Dinamina não é um componente exclusivo da endocitose dependente de clatrina e na verdade participa de outros processos, como caveolae e endocitose dependente de “rafts” (Henley e cols., 1998; Oh e cols., 1998; revisto por Pelkmans & Helenius, 2003).

Uma vez no citoplasma, as vesículas rapidamente perdem a cobertura de clatrina, através da ação conjunta das proteínas hsc 70, auxilina e sinaptojanina 1, o que facilita sua fusão com endossomas primários (revisto por Brodin e cols., 2000; Kirchhausen, 2000). Os endossomas primários compreendem uma rede de túbulos e vesículas espalhados pelo citoplasma e são considerados a primeira estação de triagem dentro da célula. Apresentam pH ligeiramente ácido (6-6.8) e por isso promovem a dissociação de receptores e ligantes. Os receptores livres se acumulam em estruturas tubulares e podem ser reciclados de volta à membrana diretamente ou após passagem pelos endossomas de reciclagem, que correspondem a estruturas tubulares acumuladas em região perinuclear. Os ligantes dissociados, por sua vez, são direcionados para endossomas tardios e lisossomas, onde são degradados (revisto por Mellman, 1996).

A demonstração de que a endocitose de alguns marcadores não se alterava mediante bloqueio da endocitose de clatrina sugeriu a existência de mecanismos independentes de clatrina. A partir daí foram descritos mecanismos como caveolae, endocitose dependente de “rafts” e macropinocitose. Estes mecanismos, embora não menos importantes que o mecanismo dependente de clatrina, ainda não estão tão bem caracterizados quanto o dependente de clatrina. Até o momento especula-se que mecanismos não dependentes de clatrina não se utilizem de interação proteína-proteína para concentrar receptores ou cobrir vesículas; basicamente, eles exploram diferenças na composição de lípidos e proteínas de membrana (revisto por Nichols & Lippincott-Schwartz, 2001).

Caveolae são invaginações da membrana plasmática em forma de garrafa com tamanho variando entre 50-100 nm, especializadas na captação de moléculas pequenas em vários tipos celulares (revisto por Anderson, 1998; Thomsen e cols., 2002). Estas invaginações apresentam superfície coberta por estrias devido ao acúmulo da proteína caveolina, que se tornou um marcador bioquímico para caveolae (revisto por Mellman, 1996). De fato, a expressão de caveolina em células pode ser correlacionada com o aparecimento de caveolae (revisto por Anderson, 1998). Além da proteína caveolina, domínios caveolae também concentram glicosíngolípídeos e colesterol (revisto por Anderson, 1998; Thomsen e cols., 2002) e é sabido que caveolina é capaz de ligar colesterol (revisto por Anderson, 1998). A proteína caveolina apresenta massa molecular de 22kDa e através de um segmento hidrofóbico de 33 aminoácidos associa-se à membrana, deixando livres no citoplasma a região N e C-terminal (revisto por Anderson, 1998). Caveolae e caveolina estão relacionados a diferentes processos como endocitose, transporte e homeostase de colesterol e transdução de sinal (revisto por Schlegel e cols., 2001; Thomsen e cols., 2002).

Consistente com um papel endocítico, caveolae também requer dinamina para fissão de vesículas (Henley e cols., 1998; Oh e cols., 1998; revisto por Kurzchalia & Parton, 1999). E uma vez dissociadas da membrana, estas invaginações se fundem com organelas pré-existentes de pH neutro, recebendo o nome de caveossomos por apresentar caveolina. Os caveossomos parecem ser direcionados para o retículo endoplasmático (revisto por Nichols & Lippincott-Schwartz, 2001; Pelkmans & Helenius, 2003). É importante ressaltar que moléculas encontradas em caveolae geralmente também são encontradas em “rafts” (revisto por Nichols & Lippincott-Schwartz, 2001). Mais recentemente, foi demonstrado que estruturas endocíticas derivadas de caveolae poderiam ser direcionadas para organelas da via clássica de clatrina como por exemplo, endossomas primários (Sharma e cols., 2003; Pelkmans & Helenius, 2003).

Macropinocitose é um processo de endocitose caracterizado pela formação de prolongamentos de membrana que se lançam no meio extracelular e em seguida se fundem à membrana formando grandes vacúolos (revisto por Swanson & Watts, 1995). Estes vacúolos ou vesículas são geralmente grandes, podendo chegar até a 5µm de diâmetro. Este processo é bastante inespecífico e macromoléculas internalizadas por este mecanismo podem ser levadas à lisossomas ou recicladas (revisto por Mellman, 1996). Este mecanismo que se baseia na atividade ondulatória da membrana é

dependente da polimerização da actina e não requer dinamina. Por ser um processo inespecífico, é usado por alguns vírus pra entrar dentro das células (revisto por Pelkmans & Helenius, 2003). A ondulação de membranas, atividade importante e imprescindível para formação de macropinosomos, parece ser regulada pela GTPase ARF6 que promove a produção localizada de fosfatidilinositol bifosfato (PtdIns(4,5)P₂). Portanto, ARF6 e fosfatidilinositol bifosfato exercem papel regulatório na macropinocitose (revisto por Nichols & Lippincott-Schwartz, 2001). De fato, acúmulo de fosfatidilinositol bifosfato na membrana plasmática precede a formação de macropinosomos. A macropinocitose pode ser induzida através de tratamento com ester de forbol (TPA) ou fator de crescimento epitelial (EGF). TPA é um potente ativador de proteína cinase C (PKC) e induz macropinocitose via Rac1, uma proteína ligante de GTP relacionada a Ras. Rac1 ativada se localiza na membrana plasmática e estimula a síntese de fosfatidilinositol bifosfato (PtdIns(4,5)P₂) resultando na organização de actina. O conteúdo de colesterol nestas membranas também é importante e na ausência deste, Rac1 não se localiza em membrana plasmática e conseqüentemente não induz reorganização de actina (Grimmer e cols., 2002). Por outro lado, a desorganização da actina através de drogas como citocalazina ou latrunculina bloqueiam a macropinocitose (Lee & Knecht, 2002).

A endocitose dependente de “rafts” e independente de caveolae, um mecanismo ainda pouco esclarecido, tem sido estudada em células que não expressam caveolina e portanto, não apresentam caveolae e parece ser induzida pela associação de “rafts”. Este mecanismo pode ou não requerer a participação de dinamina (revisto por Pelkmans & Helenius, 2003).

O tráfego intracelular de proteínas e lipídeos é um processo fundamental para criação de organelas especializadas e a comunicação entre elas. Acompanhar o tráfego de proteínas entre as organelas intracelulares é um processo complicado, já que estas organelas são extremamente dinâmicas e se torna impossível a identificação baseada em morfologia ou posição no citoplasma. No entanto, o processo de identificação foi facilitado quando marcadores bioquímicos foram descritos para cada população de endossomas (revisto por Mellman, 1996; Seabra e cols., 2002; revisto por Zerial & McBride, 2001). Estes marcadores são as proteínas da família Rab, pequenas GTPases que regulam o transporte de vesículas na endocitose e exocitose, principalmente no controle da associação entre vesículas e posterior fusão das mesmas, regulando também as proteínas do complexo SNARE, responsáveis pela fusão propriamente dita (revisto

por Somsel Rodman & Wandinger-Ness, 2000; Zerial & McBride, 2001). As proteínas Rabs estão intimamente associadas a proteínas do citoesqueleto para regulação do transporte de vesículas ao longo dos microtúbulos (revisto por Seabra e cols., 2002). Mais de 60 genes humanos para Rab já foram descritos indicando que há uma grande necessidade de controle e organização intracelular (revisto por Zerial & McBride, 2001; Seabra e cols., 2002).

As funções das proteínas Rab são mediadas pela sua capacidade de se associar a GTP ou GDP e as habilidades distintas provenientes destas interações. Na sua forma ativa, associada a GTP, Rabs podem recrutar diversas proteínas chamadas de efetoras que auxiliam na regulação do transporte de vesículas. Quando inativa, ou seja associada a GDP, Rab permite que as proteínas efetoras se dissociem e a própria Rab se desloca da membrana acceptora e retorna à membrana na organela de origem com a ajuda da proteína reguladora negativa conhecida como RabGDI – Rab inibidor de dissociação de GDP (revisto por Zerial & McBride, 2001; Seabra e cols., 2002).

A proteína ativa Rab5 é importante para o transporte das vesículas cobertas por clatrina e subsequente fusão em endossomas primários. Rab 5 também promove a fusão homotípica destes endossomas (revisto por Somsel Rodman & Wandinger-Ness, 2000). Para isso, Rab 5 se liga à proteína EEA1 (do inglês “early endosomal antigen 1”) presente em endossomas primários e recruta seus efetores, as proteínas Rabaptina-5, Rabex-5 e Rabenosina-5 para a membrana. Estes efetores interagem com proteínas do complexo SNARE que são responsáveis pela fusão (revisto por Somsel Rodman & Wandinger-Ness, 2000; Pfeffer, 2001; Zerial & McBride, 2001).

Moléculas endocitadas saem dos endossomas primários de diversas maneiras. Uma delas é a reciclagem direta pra membrana plasmática. Rab 4 controla o fluxo a partir desses endossomas para a membrana plasmática, mas também está envolvido na reciclagem de moléculas originadas dos endossomas de reciclagem (revisto por Somsel Rodman & Wandinger-Ness, 2000). Rab 11 se acumula nos endossomas de reciclagem e parece ter um papel na homeostase dos mesmos, além de controlar saída de vesículas para membrana plasmática e também o tráfego de vesículas oriundas do Golgi com passagem por estes endossomas (revisto por Somsel Rodman & Wandinger-Ness, 2000).

Moléculas destinadas à degradação são endocitadas e passam primeiramente por endossomas primários e em seguida eles são direcionados para endossomas tardios e posteriormente lisossomas. Rab 7 atua em membranas de endossomas tardios e é

essencial para manutenção de lisossomas ativos (Bucci e cols., 2000; revisto por Somsel Rodman & Wandinger-Ness, 2000). Endossomas tardios também apresentam Rab 9 que regula o transporte de vesículas destas organelas com destino ao Golgi (revisto por Somsel Rodman & Wandinger-Ness, 2000).

Muitas proteínas Rab já descritas ainda não foram relacionadas a nenhuma organela ou etapa do transporte de vesículas e mutações nestes genes foram relacionadas a doenças, como é o caso da síndrome de Griscelli. Na maioria dos pacientes apresentando esta doença foi detectada alteração no gene de Rab 27a, que codifica uma proteína que se localiza em melanossomos e grânulos citolíticos. Os pacientes com esta doença apresentam linfócitos T com deficiência na exocitose destes grânulos citolíticos (revisto por Seabra e cols., 2002). As proteínas Rab têm grande importância na organização celular e vem recebido bastante atenção nos últimos tempos, mas ainda há muito para ser esclarecido a respeito de funções específicas e interações protéicas destas GTPases.

1.4 - Internalização e tráfego de PrP^c:

Um dos locais onde PrP^c está presente e especula-se que possa exercer seus papéis fisiológicos é a superfície celular. Portanto, sua internalização e tráfego poderiam ter grande impacto para sua função fisiológica, bem como participação em processos patológicos.

Shyng e cols. (1993) observaram que PrP^c de galinha transita constitutivamente entre compartimentos intracelulares e membrana plasmática. Durante este trajeto, 5% da proteína internalizada é clivada na região N-terminal, provavelmente em compartimentos endocíticos ou lisossomas e posteriormente se acumula na membrana plasmática, sugerindo que a proteína truncada apresente uma deficiência em internalização ou uma taxa de reciclagem mais eficiente.

O mecanismo pelo qual PrP^c é endocitado pela célula ainda é alvo de debates. PrP^c de galinha e de camundongo foram encontrados em vesículas cobertas por clatrina em cultura primária de neurônio e glia (Shyng e cols., 1994; 1995). Além disso, sua internalização foi reduzida em 70% em células N2a incubadas em meio hipertônico, tratamento que inibe a endocitose devido ao rompimento da estrutura formada por moléculas de clatrina. A endocitose dependente de clatrina requer a presença de

seqüências de aminoácidos na região citoplasmática da proteína a ser internalizada. Estas seqüências sinalizam a internalização dependente de clatrina através de interação com proteínas adaptadoras, como AP-2 e AP-180, que vão recrutar clatrina para este ponto da membrana (revisto por Kirchhausen e cols., 1997; 1999). PrP^c é ancorada à membrana via motivo de GPI e portanto, não apresenta região citoplasmática capaz de interagir com adaptadores. No entanto, Shyng e cols. (1994) sugerem que PrP^c possa se associar a alguma proteína transmembrana e ser endocitada juntamente com esta, em vesículas cobertas por clatrina. Além disso, Shyng e cols. (1995) também demonstraram que deleções na região N-terminal levam à redução da endocitose e da concentração de PrP^c em vesículas cobertas por clatrina.

Em contradição a estes dados, Vey e cols. (1996) demonstraram que PrP^c se encontra em CLDs (do inglês “caveolae like domains”) em células N2a, sugerindo uma internalização dependente de caveolae. Outros trabalhos também demonstraram que PrP^c se concentra em caveolae e sua internalização ocorre por mecanismos independentes de clatrina, provavelmente dependentes de caveolae (Kaneko e cols., 1997; Naslavsky e cols., 1997; Marella e cols., 2002; Peters e cols., 2003). No entanto, Mayor e cols. (1994) demonstraram que o uso de fixativos e a reação “cross-linking” entre anticorpos podem levar a uma redistribuição das proteínas ancoradas por GPI em domínios caveolae e que na ausência destes tratamentos estas proteínas estariam distribuídas de forma difusa pela membrana plasmática.

Mais recentemente, foi demonstrado que PrP^c está presente em “rafts”, mas que depois de internalizado pode ser encontrado em vesículas cobertas por clatrina (Sunyach e cols., 2003). Os autores sugerem que PrP^c seja capaz de se redistribuir na membrana antes de sofrer endocitose, deixando os domínios “rafts” e então, seguir a via dependente de clatrina. Além disso, foi demonstrado que a internalização de PrP^c é direcionada pela região N-terminal da proteína e que o motivo GPI não tem participação neste processo (Sunyach e cols., 2003). Na literatura, outras proteínas ancoradas por GPI também foram associadas a processos de endocitose dependente de clatrina (Rijnboutt e cols., 1996; Vilhardt e cols., 1999; Grunfelder e cols., 2003). Um exemplo é o receptor de urocinase (uPAR) que se encontra distribuído randomicamente na membrana e quando ativado é capaz de se associar ao LRP (proteína relacionada ao receptor de LDL), conseqüentemente sofrendo endocitose dependente de clatrina e sendo direcionado a endossomas primários juntamente com LRP (Czekay e cols., 2001).

A região N-terminal de PrP^c parece estar relacionada também à sinalização para tráfego intracelular desta proteína e consequente direcionamento para a membrana plasmática, além da modulação da endocitose (Nunziante e cols., 2003).

Pauly e Harris (1998) demonstraram que concentrações micromolares de cobre induziam endocitose de PrP^c de galinha e que esta internalização dependia da presença da região N-terminal de PrP^c. Cobre também foi capaz de induzir endocitose de PrP^c de camundongo dependente da região N-terminal (Perera & Hooper, 2001; Lee e cols., 2001), corroborando a hipótese de PrP^c estar relacionada ao metabolismo deste íon.

PrP^c expresso em excesso pelas células ou com conformação inadequada está sujeito a um sistema de “controle de qualidade” e é direcionado ao citoplasma para degradação pelo proteassoma (Ma & Lindquist, 2001; Yedidia e cols., 2001). Em seguida, foi demonstrado em células N2a que PrP^c direcionado para o citoplasma através de transporte retrógrado pode ser citotóxico se o sistema de proteassoma estiver inibido (Ma e cols., 2002). No entanto, mais recentemente, outro grupo demonstrou que em cultura primária de neurônios humanos PrP^c citossólico não é neurotóxico e na verdade, apresenta efeito neuroprotetor contra apoptose (Roucou e cols., 2003).

PrP^c encontra-se distribuído na membrana plasmática, Golgi (Negro e cols., 2001; Ivanova e cols., 2001; Magalhães e cols., 2002) e em estruturas intracelulares parecidas com endossomas (Laine e cols., 2001; Magalhães e cols., 2002). Sunyach e cols. (2003) detectaram PrP^c em organelas positivas para transferrina em neurônios, sugerindo que a via clássica dependente de clatrina poderia estar envolvida no processo de endocitose e tráfego desta proteína. As organelas nas quais PrP^c trafega durante este percurso entre membrana plasmática e Golgi ainda não estão definidas. Proteínas da família Rab, pequenas GTPases responsáveis por coordenar etapas do transporte e motilidade de organelas intracelulares, funcionam como marcadores destas organelas e das etapas de tráfego e são ferramentas úteis na identificação destas vias (revisado por Zerial & McBride, 2001). GFP-PrP^c internalizado encontra-se em organelas positivas para um mutante de Rab5, sugerindo sua presença em endossomas primários (Magalhães e cols., 2002).

Portanto, as rotas de internalização e tráfego de PrP^c ainda não estão definidas; a via clássica dependente de clatrina parece ter participação, mas alguns dados também apontam para mecanismos independentes de clatrina, como caveolae. Mais estudos serão necessários para definir qual ou quais mecanismos são responsáveis pela

endocitose de PrP^c e por quais organelas esta proteína trafega durante o seu processo de reciclagem para a membrana e também degradação em lisossomas.

Recentemente, moléculas de PrP^c em fusão com GFP (“Green fluorescent protein”) têm sido geradas, apresentando distribuição idêntica à proteína nativa e possibilitando uma nova ferramenta para o estudo da localização e tráfego desta proteína, evitando os problemas de fixação e “cross-linking” de anticorpos (Lee e cols., 2001; Ivanova e cols., 2001; Negro e cols., 2001; Lorenz e cols., 2002; Magalhães e cols., 2002).

Uma das etapas deste projeto consiste no uso de GFP-PrP^c e mutantes dominantes negativos de proteínas Rab e outras proteínas relacionadas à endocitose para avaliação da internalização e tráfego desta proteína em células vivas.

1.5 - Proteína prion “scrapie” ou PrP^{sc} ou PrPres:

O termo “prion” denomina o agente infeccioso de uma série de doenças, caracterizadas por neurodegeneração espongiiforme e proliferação de células da glia. Vários estudos demonstraram que o agente causador da doença “scrapie” era resistente a tratamentos que danificam ácidos nucleicos, porém era inativado irreversivelmente por álcalis. Além disso, a sensibilidade deste agente a proteases sugeriu que ele deveria conter uma proteína que seria necessária à infectividade. Este agente apresentou heterogeneidade no tamanho, em geral pequeno; e características hidrofóbicas. Juntos, estes dados levaram Prusiner a propor o termo “**prion**” (do inglês: *proteinaceous* + *infectious*) para denotar pequenas partículas protéicas infecciosas, resistentes a tratamentos que modificam ácidos nucleicos (Prusiner, 1982). Logo depois, Bolton e cols. (1982), através da purificação de prions a partir de cérebro de hamster infectado com scrapie, identificaram uma proteína com massa molecular variando de 27 a 30 kDa. Esta proteína apresentou resistência a tratamento com proteinase K, podendo ser detectada em cérebro de animais infectados após digestão com esta enzima, mas não foi detectada em cérebro de animais sadios submetido ao mesmo tratamento. Mais tarde, o gene para esta proteína foi identificado e sua seqüência não apresentou nenhuma diferença entre animais infectados e sadios (Basler e cols., 1986). Estes dados mostram que a proteína prion *scrapie*, conhecida como PrP^{sc}, é codificada no genoma do próprio hospedeiro independentemente da doença e portanto, sugere que eventos pós-

traducionais seriam responsáveis pelas diferenças entre a isoforma celular (PrP^c) e a isoforma relacionada à doença (PrP^{sc}).

Como já mencionado, uma das principais características da proteína prion infecciosa é sua resistência parcial a proteinase K. Esta proteína é capaz de resistir a um tratamento com 50µg/ml de proteinase K (PK) a 37°C por 2 horas sem nenhum prejuízo em sua capacidade infecciosa (Mckinley e cols., 1983; revisto por Prusiner, 1998). Sob estas condições, 67 aminoácidos da região N-terminal da proteína são degradados resultando na molécula que ficou conhecida como PrP 27-30, devido a variação de sua massa molecular. PrP 27-30 corresponde então à porção da proteína prion scrapie que é resistente a PK e capaz de manter infectividade (revisto por Prusiner, 1998). A presença desta proteína depois de tratamento proteolítico ainda é o método bioquímico padrão para identificação de infecção por prion (revisto por Aguzzi & Polymenidou, 2004). O termo PrPres (**res** proveniente de **resistente** a PK) foi proposto como um nome mais geral, abrangendo PrPs relacionadas a diversas doenças por prion (Caughey e cols., 1990).

Outra diferença marcante entre PrPres e PrPsen está relacionada a estrutura secundária da molécula. Enquanto PrPres é composta predominantemente por folhas beta-pregueadas (47%) e cerca de 17% de alfa hélices, PrPsen apresenta 42% de alfa hélices e apenas 3% de folhas beta (Caughey e cols., 1991; Pan e cols., 1993). Estes dados sugerem que a proteína prion celular (PrPsen ou PrP^c) sofre alterações de estrutura secundária para se converter na isoforma infecciosa (PrPres ou PrP^{sc}).

Esta estrutura rica em folhas beta possibilita que PrPres forme agregados conhecidos como amilóide (Prusiner e cols., 1983) e representa uma estrutura típica de outras proteínas capazes de formar amilóides (Glennner e cols., 1974).

Além disso, PrPres é insolúvel em detergentes ao contrário de PrPsen (Meyer e cols., 1986), se acumula enquanto PrPsen recicla rapidamente (Caughey & Raymond, 1991; Borchelt e cols., 1992) e o padrão de distribuição de PrPres no cérebro é bem diferente da distribuição de PrPsen (Taraboulos e cols., 1992).

Existem diferentes cepas de PrPres, o que significa no caso deste agente infeccioso, que uma mesma seqüência de aminoácidos é capaz de gerar e propagar informações diferentes. Diferentes cepas acarretam diferentes tempos de incubação, proporção de formas glicosiladas, conformação, grau de agregação e resistência a PK. Algumas poucas evidências sugerem que as propriedades de cada cepa estão codificadas em sua estrutura terciária, que pode apresentar alterações conformacionais discretas ou

diferenças no estado de agregação (revisto por Prusiner, 1998; Caughey, 2003). Estas diferenças no estado de agregação de PrPres poderiam gerar diferenças na habilidade de catalizar a conversão e levar à distribuição em diferentes regiões do cérebro produzindo neuropatologias distintas (revisto por Soto & Castilla, 2004).

1.6 - Doenças causadas por Prion ou Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis:

As doenças causadas por prion são também conhecidas como Encefalopatias espongiformes transmissíveis e acometem várias espécies, entre elas, o homem (Tabela 1) (revisto por Prusiner, 1998; Harris, 1999). São doenças mediadas pela modificação conformacional da proteína prion celular e podem apresentar formas esporádica, genética e infecciosa (revisto por Prusiner, 1998; Harris, 1999). Exames microscópicos revelam perda de neurônios, formação de vacúolos e proliferação de células da glia em cérebros de pessoas infectadas, gerando aspecto espongiforme característico destas doenças (revisto por Prusiner, 1998). A maioria dos humanos afetados por prions apresenta um quadro de demência progressiva, embora alguns também possam manifestar ataxia cerebelar; já ovelhas e bovinos doentes geralmente apresentam ataxia (revisto por Prusiner, 1998).

Formas esporádicas de doenças por prion representam a maioria dos casos de CJD e possivelmente alguns dos casos de GSS. Nestes casos, não há um agente etiológico genético ou infeccioso óbvio e especula-se que a formação de PrPres ocorra devido a conversão espontânea de PrPsen para PrPres ou alguma mutação somática ainda não detectada que favoreça esta conversão (revisto por Prusiner, 1998; Harris, 1999).

Doenças priônicas de origem genética representam cerca de 10% dos casos de CJD e quase todos os casos de GSS e FFI. Nestes casos, foram detectadas mutações em células germinativas no gene de PrP que parecem favorecer a conversão espontânea de PrPsen para PrPres. Inserções de 1 a 9 cópias do octapeptídeo foram detectadas na região N-terminal e associadas a CJD. Mutações pontuais na região C-terminal foram relacionadas a CJD, GSS e FFI. Além disso, um polimorfismo no códon 129, podendo codificar valina ou metionina, pode influenciar profundamente as características da doença causada por mutações em outras regiões da molécula (revisto por Prusiner, 1998; Harris, 1999).

As doenças de origem infecciosa incluem Kuru que era transmitida através de rituais canibalistas na Nova Guiné. Outras fontes de prion que geraram iCJD incluem instrumentos cirúrgicos esterelizados de forma inapropriada, córneas usadas em transplantes e administração de hormônios derivados de pituitária cadavérica. Mais recentemente, evidências epidemiológicas, bioquímicas e histológicas sugerem que o aparecimento de vCJD, uma variante de CJD afetando principalmente adolescentes e jovens, ocorreu devido à transmissão de prions bovinos (BSE) para humanos (revisto por Prusiner, 1998; Aguzzi & Polymenidou, 2004).

Recentemente foi sugerido que os níveis de infectividade no sangue poderiam ser suficientes para causar infecção e, portanto existiria o risco de transmissão de doenças priônicas através da transfusão sanguínea. De fato, Hunter e cols. (2002) demonstraram que ovelhas que receberam transfusão de sangue proveniente de ovelha infectada com BSE em fase ainda assintomática da doença foram infectadas com BSE. Estes dados alertam para o risco de infecção através de produtos do sangue, especialmente no Reino Unido, onde existe ainda o número desconhecido de pessoas infectadas com vCJD devido ao consumo de carne infectada com BSE. Importante ressaltar que devido a longa fase pré-clínica da doença, estes indivíduos poderiam atuar como carreadores assintomáticos do agente infeccioso. No entanto, ainda são necessários mais estudos para avaliação deste risco.

Importante ressaltar que independente da origem, todas estas doenças são transmissíveis e ocorrem devido à conversão de PrPsen para PrPres e posterior acúmulo de PrPres (revisto por Prusiner, 1998).

Tabela 1: Alguns exemplos de doenças causadas por prion:

Doença	Hospedeiro	Patogênese
Kuru	Aborígenes Nova Guiné	Infecção através de rituais canibalistas
iCJD	Humanos	Infecção por transplantes ou uso de hormônios proveniente de fonte infectada
vCJD	Humanos	Infecção por prion bovino??
fCJD	Humanos	Mutações em linhagem germinativa do gene PrP
sCJD	Humanos	Mutação somática ou conversão espontânea de PrPsen – PrPres.
GSS	Humanos	Mutações em linhagem germinativa do gene PrP
FFI	Humanos	Mutações em linhagem germinativa do gene PrP (D178N, M129)
scrapie	Ovelhas	Infecção de ovelha geneticamente suscetível.
BSE	Bovinos	Infecção por ingestão de carne contaminada por prion
CWD	Cervídeos	Desconhecida

CJD: do inglês: “Creutzfeldt-Jakob Disease”; iCJD: CJD iatrogênica; vCJD: CJD variante; fCJD: CJD familiar; sCJD: CJD esporádica (do inglês: “sporadic CJD”); GSS: Gerstmann-Straussle-Sheinker; FFI: insônia familiar fatal (do inglês: “Fatal Familial Insomnia”); BSE: encefalopatia espongiiforme bovina (do inglês: “Bovine Spongiform Encephalopathy”); CWD, do inglês: “Chronic Wasting Disease”. (Adaptado de Prusiner SB, 1998).

1.7 - Conversão “PrPsen →PrPres”:

As duas isoformas de PrP apresentam a mesma sequência primária e as mesmas modificações pós-traducionais, sendo que a conversão de PrPsen para PrPres representa uma alteração exclusivamente conformacional (revisto por Prusiner, 1998; Harris, 1999). Na tentativa de esclarecer os mecanismos de conversão destas duas isoformas, Scott e cols. (1989) demonstraram que camundongos transgênicos, expressando PrPsen de hamster, quando inoculados com PrPres desta espécie se tornavam susceptíveis à infecção por prion de hamster, desenvolviam placas amilóides e degeneração espongiiforme com o tempo de incubação característico da doença em hamsters e acumulavam PrPres de hamster. Estes dados sugeriram que o gene de PrP era capaz de modular susceptibilidade, tempo de incubação e neuropatologia da doença. Mais tarde, Bueler e cols. (1993) demonstraram que animais que não expressam PrPsen eram resistentes à infecção por prion. E em seguida, Kocisko e cols. (1994) desenvolveram sistemas de conversão “in vitro”, onde moléculas de PrPsen marcadas radioativamente e PrPres eram misturadas e então PrP resistente à proteinase K e marcado radioativamente podiam ser detectados. Juntos, estes dados indicam que uma interação física bastante específica deve ocorrer entre as duas isoformas para que haja propagação de PrPres durante o processo de infecção.

Embora os sistemas de conversão “in vitro” reproduzam em parte o processo de propagação de prions, incluindo a especificidade entre espécies e cepas, é bastante ineficiente na produção de PrPres e requer um excesso de pelo menos 50 vezes mais PrPres que PrPsen no início da reação, condição esta que é exatamente a oposta do que ocorre “in vivo” (revisto por Harris, 1999; Caughey, 2001). Além disso, PrPres gerado “in vitro” não apresenta infectividade (Hill e cols., 1999; Caughey e cols., 2001). Portanto, a possibilidade de co-fatores celulares serem necessários durante o processo de conversão não pode ser descartada (revisto por Harris, 1999). Glicosaminoglicanos (GAGs) podem interagir com as duas isoformas de PrP e portanto são um co-fator potencial para o processo de conversão (Caughey & Baron, 2002; revisto por Caughey, 2003). De fato, GAG apresenta um efeito inibitório na formação de PrPres em células infectadas e animais (Caughey & Raymond, 1993), porém é capaz de estimular formação de PrPres em sistemas de conversão “in vitro” (Wong e cols., 2001). Para explicar esta discrepância, os autores propõem que no sistema celular, a adição de

GAGs exógenas gera competição entre os GAGs (endógeno e exógeno) por sítios de interação e isto levaria à inibição da formação de PrPres. Por outro lado, no sistema “in vitro”, a adição de GAGs exógenos complementaria o sistema e portanto a formação de PrPres seria estimulada (Caughey & Baron, 2002; revisto por Caughey, 2003). Também foi descrito que RNAs de mamíferos podem estimular a formação de PrPres “in vitro” (Deleault e cols., 2003). Cordeiro e cols. (2001) também demonstraram que moléculas de DNA podem interagir com a proteína prion celular e convertê-la na isoforma rica em folhas beta.

A interação PrPres-PrPsen, necessária a conversão, parece ser inibida ou até mesmo bloqueada quando peptídeos correspondentes a região C-terminal de PrPsen são adicionados no sistema de conversão “in vitro”, prevenindo a formação de PrPres (Horiuchi e cols., 2001). Os autores sugerem que as regiões entre os aminoácidos 109-141, 166-179 e 200-223 podem ter participação importante na interação PrPsen-PrPres. Estes dados confirmam estudos anteriores feitos com anticorpo anti PrP (epitopo entre os aminoácidos 219-232) que inibiu a interação PrPsen-PrPres. Entretanto, a remoção deste epitopo da molécula de PrPsen não teve o mesmo efeito, sugerindo que a inibição dessa interação envolvia outras sequências que poderiam estar sofrendo impedimento estérico devido a ligação do anticorpo. As sequências entre os aminoácidos 119-138, 165-174 e 206-223 correspondem a região próxima ao sítio de ligação do anticorpo que poderiam estar envolvidas no processo (Horiuchi & Caughey, 1999). Além desses, experimentos com proteína prion quimérica de hamster e camundongo também sugeriram que esta região tivesse envolvida na interação PrPsen-PrPres (Scott e cols., 1992) e outros mostraram que uma mudança num único resíduo de aminoácido (138) em PrPsen de hamster podia bloquear o processo de conversão (Priola & Chesebro, 1995). Portanto, é necessária uma alta homologia nesta região para que ocorra conversão, talvez explicando a barreira entre espécies neste processo.

Como a estrutura tri-dimensional de PrPres ainda não é conhecida, é difícil determinar o mecanismo de conversão entre as duas isoformas. No entanto, alguns dados mostram que somente PrPres presente em agregados e polímeros induzem a conversão e que PrPres recém convertido permanece ligado a estes agregados, apontando para um mecanismo de polimerização nucleada, autocatalítica em que PrPres funcionaria como molde para a formação de novas moléculas (revisto por Caughey, 2001; 2003). Este mecanismo já é bem estabelecido para propagação de prions de levedura e formação de amilóides em processos neurodegenerativos como Alzheimer. O

mecanismo de polimerização protéica nucleada apresenta duas fases, i) a conversão espontânea de moléculas mutantes de PrPsen para PrPres e associação dos monômeros para formação de um núcleo estável (esta etapa deve ser importante para determinação do tempo de incubação no caso das doenças de origem genética e inexistente no caso de origem infecciosa) e ii) a mais importante etapa corresponde a conversão de PrPsen induzida por PrPres, análoga à fase de crescimento em polimerizações nucleadas (revisto por Caughey, 2001; 2003).

Assim como o mecanismo de conversão induzido por PrPres, as organelas envolvidas no processo também não estão esclarecidas. Alguns trabalhos mostram que a conversão poderia ocorrer tanto na membrana plasmática como em organelas endocíticas (Caughey & Raymond, 1991; Caughey e cols., 1991; Borchelt e cols., 1992) e que depois PrPres se acumularia em lisossomas (Caughey e cols., 1991). Por outro lado, outros trabalhos mostram que PrPres pode se localizar na superfície da célula em “rafts” (Vey e cols., 1996). Como tanto PrPsen quanto PrPres podem ser distribuídos em “rafts” (Vey e cols., 1996; Nasvlsky e cols., 1997) e depleção de colesterol ou esfingolípídeos altera a formação de PrPres (Taraboulos e cols., 1995; Naslavsky e cols., 1999), especula-se que estes domínios de membrana sejam o sítio para conversão PrPsen-PrPres.

Estudos de conversão “in vitro” em condições próximas às fisiológicas sem agentes desnaturantes ou detergentes e com PrPsen com âncora de GPI e associado a membrana demonstraram que a conversão de PrPsen não é eficiente se PrPsen e PrPres não estão inseridos em membranas contíguas (Baron e cols., 2002). Estes dados demonstram que num processo de infecção, PrPres precisa se inserir na membrana para promover conversão. Além disso, os autores demonstraram que a conversão foi mais eficiente em pH neutro sugerindo que os possíveis sítios para conversão seriam a membrana ou endossomas primários (Baron e cols., 2002).

Como foi dito, casos esporádicos e genéticos das doenças sugerem conversão espontânea ou mutações em PrPsen que facilitem a conversão sem a necessidade de interação inicial com PrPres. Foi demonstrado que PrPsen em células com atividade de proteassoma bloqueada por drogas é transportado para o citoplasma e pode assumir uma conformação parecida com PrPres (resistência a PK e formação de agregados). Além disso, mesmo após remoção dos inibidores e recuperação da atividade de proteassoma as células matinhm a formação de novas moléculas de PrPres sugerindo a autopropagação das mesmas (Ma & Lindquist, 2002). Os autores também

demonstraram que um mutante de PrP relacionado a uma doença priônica de origem genética apresenta uma alta taxa de transporte retrógrado para o citoplasma e produção de moléculas de PrPres. Estes dados sugerem que no processo de conversão espontânea os “sistemas de controle de qualidade das células” como o proteassoma podem ter fundamental importância.

1.8 - Hipótese de apenas proteína como agente infeccioso:

J.S. Griffith (1967) sugeriu pela primeira vez que scrapie era transmitido por uma proteína que tinha capacidade de se replicar. Mais tarde, Prusiner (1982) propôs o conceito de prion, em que uma proteína era o agente infeccioso com capacidade de causar uma série de doenças, que ainda hoje é alvo de debates (revisto por Soto & Castilla, 2004).

As evidências a favor desta hipótese são muito fortes, já que PrPres copurifica com a infectividade e esta só é reduzida com tratamentos que alteram estrutura protéica ou anticorpos anti-PrP (Gabizon e cols., 1988); camundongos que não expressam PrPsen são resistentes a infecção por prion (Bueler e cols., 1993) e talvez a mais importante; a conversão de PrPsen em PrPres pode ser detectada em sistemas “in vitro” usando PrPsen e PrPres purificados (Kocisko e cols., 1994).

No entanto, existem ainda alguns pontos que precisam ser esclarecidos. O principal deles é a falta de infectividade em amostras de PrPres gerado “in vitro” (Hill e cols., 1999; Caughey e cols., 2001) e a existência de diferentes cepas (revisto por Soto & Castilla, 2004). Recentemente, Legname e cols. (2004) demonstraram que PrP recombinante de camundongo polimerizado “in vitro” em fibrilas foi capaz de infectar camundongos geneticamente modificados. O extrato do cérebro destes camundongos apresentou PrPres e foi capaz de causar infecção em camundongos de duas linhagens distintas. Entretanto, nestes estudos foram usados camundongos geneticamente modificados, superexpressando uma proteína prion celular truncada e existe a possibilidade disto ser suficiente para gerar a doença com um tempo de incubação longo. Neste caso, experimentos usando animais normais seriam a comprovação final do conceito prion. Portanto, mais estudos são necessários pra comprovar a geração “in vitro” de infectividade e esclarecer a diversidade de cepas de prion.

1.9 - Infecção e tráfego de PrPres:

Existe pouca informação de como as células são capazes de internalizar PrPres durante o estágio inicial de infecção ou sobre o tráfego desta proteína dentro da célula (revisto por Harris, 1999). Como mencionado anteriormente, especula-se que o sítio de conversão possa ser os domínios “rafts” na membrana plasmática ou endossomas primários (Caughey & Raymond, 1991; Baron e cols., 2002; Vey e cols., 1996), o que sugere que o tráfego de PrPres possa ser importante para o desenvolvimento da doença.

Estudos em células expressando PrPs mutantes sugerem que o primeiro passo da conversão durante a síntese de novas moléculas de PrP deve acontecer no retículo endoplasmático, onde as proteínas se tornam resistentes a fosfolipase C (característica de PrPres), já a insolubilidade à detergentes e resistência à protease são adquiridas depois que a proteína chega a membrana ou em compartimentos endocíticos (Daude e cols., 1997; revisto por Harris, 1999). Outro trabalho mostrou um aumento na formação de PrPres, quando PrPsen é sujeita à transporte retrógrado em direção ao retículo endoplasmático, devido à expressão do mutante constitutivamente ativo da proteína Rab6 (Béranger e cols., 2002). Juntos, estes trabalhos sugerem que o retículo endoplasmático, endossomas primários e “rafts” podem estar envolvidos no processo de conversão, salientando a importância do tráfego desta proteína para o entendimento do processo de infecção, propagação e desenvolvimento de patologias.

No caso das doenças de origem infecciosa, prion deve ser capaz de se propagar do ponto da infecção (normalmente periférico) até o sistema nervoso central, onde a patologia se desenvolve. Para isto a transferência de PrPres entre diferentes células assume grande importância. PrPsen e PrPres são capazes de transitar de uma célula para outra de uma maneira dependente de contato celular (Kanu e cols., 2002; Liu e cols., 2002) e um trabalho recente demonstrou que PrPres pode ser liberado por células associado à exossomas (Fevrier e cols., 2004). Exossomas são vesículas membranosas de origem endossomal com tamanho variando entre 50 e 90 nm que representam uma nova forma de comunicação celular. Os exossomas se originam de endossomas tardios e como já foi demonstrado que PrPres pode se acumular em endossomas tardios e lisossomas, este pode ser o ponto de associação de PrPres com estas vesículas (Fevrier e cols., 2004). A próxima etapa seria a liberação destas vesículas e uma vez, no espaço extracelular, os exossomas poderiam se associar a células próximas e talvez por fusão

de membrana, como também já foi sugerido (Baron e cols.,2002), a molécula de PrPres seria inserida nesta célula e promoveria conversão de PrPsen, propagando a infectividade.

2 – Objetivos:

Avaliar o mecanismo de endocitose e o tráfego intracelular de PrP^{sen} (PrP^c) e PrP^{res} (PrP^{sc}) e possíveis proteínas envolvidas que possam afetar estes processos.

Objetivos específicos:

- 1- Avaliação do papel do cobre na endocitose de GFP-PrP^c.
- 2- Determinação da região em PrP^c importante na endocitose induzida por cobre através de PrP^c mutante.
- 3- Determinação da localização subcelular de GFP-PrP^c.
- 4- Avaliação da internalização de GFP-PrP^c através do uso de mutantes como dinamina K44A e AP180 .
- 5- Acompanhar o processo de infecção e tráfego intracelular de PrP^{res} fluorescente.

3 – Material e Métodos:

3.1 - Construção dos plasmídeos:

As construções foram feitas no Instituto Ludwig por Kil Sun Lee e Vilma R Martins (Lee e cols., 2001). O vetor de expressão utilizado foi o pEGFP (Clontech, Fig.2) O peptídeo sinal de PrP^c foi clonado a 5' do gene de GFP e o restante do gene de PrP^c foi clonado em fusão a 3' de GFP entre os sítios de restrição EcoRI e BamHI (Fig. 3).

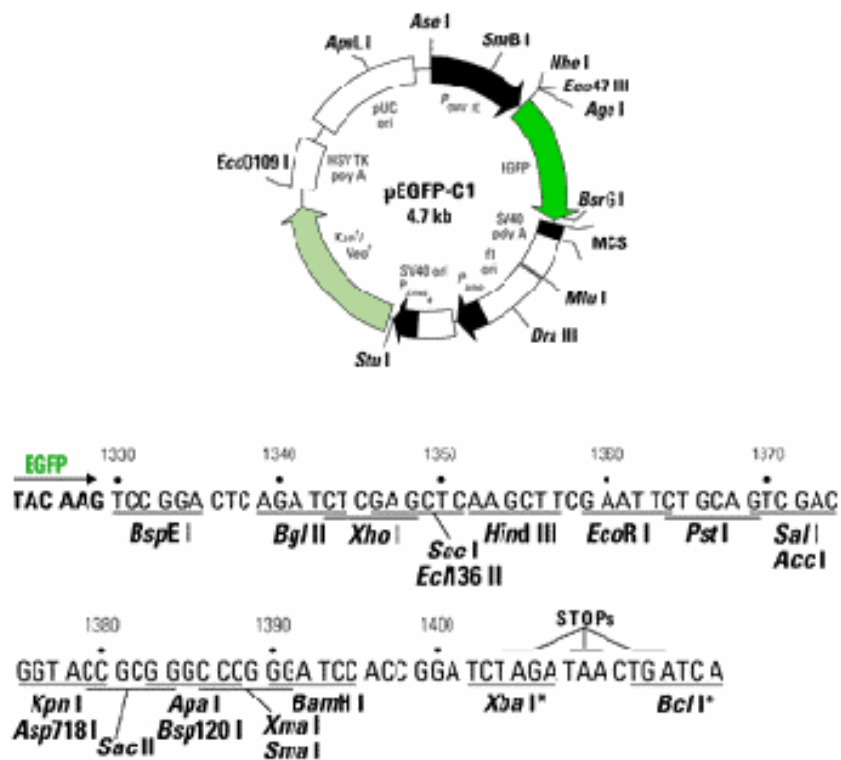


Figura 2: Mapa de restrição e múltiplo sítio de clonagem (MCS) do vetor de clonagem e expressão pEGFP-C1. Os sítios únicos de restrição estão em negrito. Quando clonado no MCS deste vetor, o gene da proteína de interesse é expresso como uma proteína de fusão ligada a EGFP (Enhanced Green Fluopresent Protein).

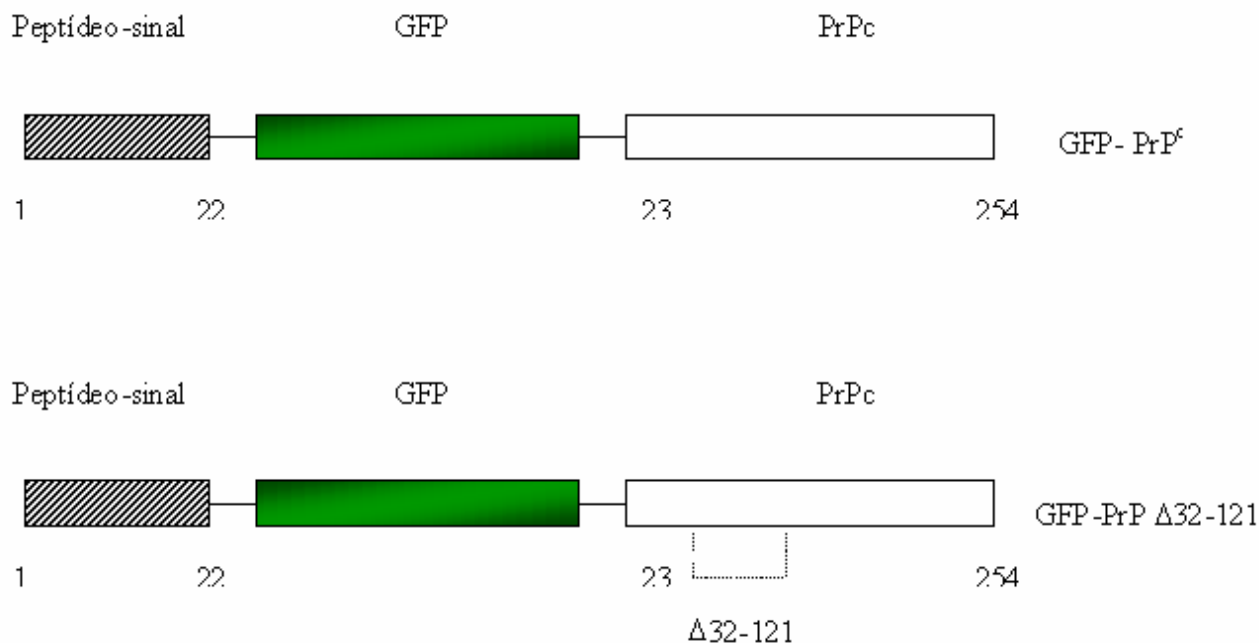


Fig. 3: Representação esquemática das construções. A caixa hachurada representa o peptídeo sinal que foi clonado a 5' de GFP (verde) e a caixa branca representa a região dos aminoácidos 23 a 254 de PrP^c e a linha pontilhada destaca a deleção que vai do resíduo 32 ao 121 na construção do mutante.

As demais construções usadas no projeto foram gentilmente cedidas por outros grupos. Dinamina I WT e mutante K44A (Zhang e cols., 1997) foram cedidas pelo Dr. Marc G. Caron (Department of Cell Biology, Duke University). GFP-GPI (Nichols e cols., 2001) e AP180-C (Ford e cols., 2001) que codifica a região C-terminal da proteína adaptadora AP180 foram cedidos pelo Dr. Benjamin J. Nichols (MRC Laboratory of Molecular Biology, UK). As construções de GFP-Rab7 WT e mutantes foram cedidos pelo Dr. Stephen S. G. Ferguson (J. P. Robarts Research Institute and Department of Physiology, University of Western Ontario). O transportador vesicular de acetilcolina em fusão com GFP (GFP-VACHT) foi descrito anteriormente (Santos e cols., 2001).

3.2 - Cultura de células e transfecção:

As células SN56 foram gentilmente cedidas pelo Prof. Bruce Wainer, Department of Pathology, Emory University school of Medicine, Atlanta, GA. Células SN56 são células derivadas da fusão de neurônios do septo com células de neuroblastoma da linhagem N18TG2 que apresentam uma série de características colinérgicas como

expressão de proteínas de vesículas sinápticas e canais de cálcio (Barbosa e cols., 1999). Essas células são mantidas em DMEM ou OptiMEM (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina e 1 mM de glutamina. Células N2a infectadas com cepa 22L de prion de camundongo são cultivadas em meio OptiMEM (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina e 1 mM de glutamina. Todas as linhagens celulares são mantidas a 37°C em atmosfera umedecida com 5% CO₂. Células SN56 foram repicadas na proporção 1:10 a cada 4 dias e N2aPS/22L foram repicadas na mesma proporção a cada 3 dias.

Para o método de transfecção baseado em lipossomas catiônicos (Lipofectamina 2000, Gibco); as células foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro (22mm X 22mm) numa densidade de 5×10^4 células por lamínula, 24 horas antes da transfecção e mantidas em meio contendo 10% de soro. Geralmente, 1µg de DNA foi usado juntamente com 2,5µl de lipofectamina para cada placa, no entanto em experimentos de co-transfecção foram usados de 3 a 4µg de DNA por placa (com aumento equivalente de lipofectamina) na proporção de 1:2 para GFP-PrP^c ou GFP-GPI e dinamina I WT ou Dinamina K44A ou 1:4 para GFP-PrP^c e AP180-C. Quatro horas após a transfecção as células foram diferenciadas por 48 horas com 1mM de dibutilil cAMP em meio sem soro e visualizados em Microscópio Confocal. Para a transfecção usando Effectene (Qiagen), Células N2aPS/22L e SN56 foram plaqueadas em placas de 35mm (6-well – Costar) ou placas Delta T (Biotechs) na proporção de 1:20. As células N2aPS/22L foram transfectadas no dia seguinte com 1µg de DNA (GFP-Rab7 WT e mutantes) e 20 µl de effectene. Já as células SN56 foram diferenciadas por um dia em meio sem soro com 1mM de dibutilil cAMP antes da transfecção com 500ng de DNA (GFP-Rab7 Q67L ou GFP- VACHT) e 12,5µl de effectene. As células transfectadas em placas de 35mm foram mantidas por 4 dias e então, lisadas para detecção de PrPres. As células transfectadas em placas Delta T foram visualizadas em microscópio confocal em diferentes dias depois da transfecção (protocolos descritos pelos fabricantes).

3.3 - Ensaio de internalização de PrP^c:

Após 48 horas de transfecção com GFP-PrP^c e GFP-PrPΔ32-121 ou co-transfecção com GFP- PrP^c e dinamina K44A ou dinamina WT ou AP180, as células SN56 foram

levadas ao microscópio confocal. As células foram perfundidas com meio MEM (GIBCO) na ausência ou presença de 100, 250 ou 500 μ M de cobre. As imagens foram adquiridas nos tempos 0, 5, 15 e 30 ou 0, 2, 5, 10 minutos depois do começo da perfusão. A análise quantitativa destes experimentos foi feita usando o programa Metamorph (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA). Para isso, nós delimitávamos manualmente as áreas de interesse (no caso, membrana plasmática, região perinuclear e toda a célula) e o programa nos fornecia os valores totais da fluorescência daquela área e esta análise era repetida para as imagens adquiridas nos tempos seguintes. Este processo de delimitação manual da área foi repetido duas vezes para cada seção óptica e a variação foi menor que 3%. A intensidade da fluorescência de cada região foi expressa como uma porcentagem da fluorescência total da célula para cada um dos tempos e a variação da fluorescência foi normalizada em relação a porcentagem da fluorescência da primeira imagem obtida (tempo zero).

3.4 - Marcação de organelas em SN56 com Bodipy-TR, Transferrina, LysoTracker, toxina da cólera, Dextran e FM4-64:

Para a marcação com Bodipy-TR (vermelho) ou FL (verde), as células foram lavadas com meio HBSS/HEPES (137mM de NaCl, 4mM de KCl, 1,2mM de MgSO₄, 2mM de CaCl₂, 10mM de glicose e 25mM de HEPES) 48 horas após a transfeção e incubadas por 30 minutos a 4 °C com 5 μ M de bodipy-TR/BSA ou 1,25 μ M de bodipy-FL (Molecular Probes). As células foram novamente lavadas com meio HBSS/HEPES gelado e incubadas por mais 30 minutos a 37 °C. Depois desta incubação, as células foram novamente lavadas e visualizadas no microscópio confocal, onde as imagens foram adquiridas.

Para a marcação de endossomas, as células foram incubadas por no mínimo 2 horas na ausência de soro e então, transferrina-alexa568 ou -alexa488 (Molecular Probes) foi adicionada ao meio de cultivo das células numa concentração final de 40 μ g/ml. Após 20-40 minutos de incubação a 37 °C, as células foram lavadas 3X com PBS 1X (58mM de Na₂HPO₄, 17mM de NaH₂PO₄ e 68mM de NaCl) e fixadas em paraformaldeído 3% por 20 minutos a temperatura ambiente ou mantidas em meio de cultura sem soro para visualização no microscópio confocal.

A marcação de lisossomas foi feita incubando as células por 40 minutos a 37 °C com 100nM LysoTracker Green DND-26 (Molecular Probes) em meio de cultura. Em seguida, as células foram lavadas com o meio de cultura e visualizadas em microscópio confocal.

A subunidade B da toxina da cólera–alexa488 foi usada pra marcar “rafts” na membrana e vesículas provenientes de endocitose dependente destes. Para isso, as células foram incubadas com 5µg/ml de cólera toxina por 30 minutos a 37 °C. As células foram então lavadas em meio de cultura e levadas ao microscópio.

Dextran-alexa flúor 488 (10,000MW) foi usado como marcador de endocitose de fase fluida e portanto, de endossomas tardios e lisossomas. As células foram incubadas com 500µg/ml por 12 horas a 37 °C em meio de cultura. As células foram então lavadas e visualizadas.

O corante anfipático FM4-64 também foi usado para marcar organelas endocíticas. Para isso, ele foi adicionado diretamente ao meio de cultura das células numa concentração final de 16µM. Após 20 minutos de incubação a 37 °C, as células foram lavadas em meio MEM (Sigma) por 3X e levadas ao microscópio confocal.

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

Marcador fluorescente	Absorção (nm)	Emissão (nm)
EGFP	484	510
Alexa-568	578	603
Alexa-488	495	519
Texas Red (TR)	589	617
Fluoresceína (FL)	505	512
Green DND - 26	504	511
FM4-64	558	734

3.5 – Tratamento de células SN56 com Brefeldin A:

Células SN56 marcadas com Bodipy-TR foram tratadas com 10µg/ml de Brefeldin A (BFA - SIGMA) durante 30 minutos a 37°C em meio HBSS/HEPES. Em seguida, as células foram lavadas e visualizadas em microscópio confocal.

3.6 – Tratamento de células SN56 com Cicloheximida:

Células SN56 expressando GFP-PrP^c foram tratadas com 200µg/ml de cicloheximida por 4 horas a 37°C em meio DMEM (Invitrogen). Nos últimos 30 minutos de tratamento, o corante FM4-64 era adicionado para marcação de endossomas. Então, as células eram lavadas 3 vezes em meio MEM (Invitrogen) e levadas ao confocal.

3.7 – Imunoblot:

Cultura de células SN56 com cerca de 90% de confluência foi ressuspensa em PBS e centrifugada a 800g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram homogeneizadas em tampão de lise (100mM de Tris pH 7.4; 150mM de NaCl; 1mM de EDTA; 1% de Triton X-100; 0,1% SDS; 1% de deoxicolato de sódio e inibidor de proteases) (Boehringer Mannheim, Indianápolis ou coquetel de inibidores de protease, SIGMA – Nestes experimentos foi usado o dobro da concentração indicada pelos fabricantes). Extratos de córtex cerebral e de pulmão de rato foram preparados por homogeneização do tecido em tampão de lise (20mM de Tris-HCl pH 7,6; 125mM de NaCl; 10mM de EGTA e o inibidor de protease). Então, os restos celulares foram separados por centrifugação a 1.000g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado em um novo tubo. A proteína total nos extratos foi quantificada pelo método de Bradford. Para detecção de clatrina (180kDa) foram aplicados 100µg de extrato de SN56 e córtex em gel desnaturante de poliacrilamida de 8% e para detecção de caveolina 1 (22kDa) foram aplicados 300µg de extrato de SN56 e 20µg de extrato de pulmão de rato em gel de 15% (SDS-PAGE). As proteínas foram submetidas a eletroforese e em seguida foram imobilizadas em membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas por 1 hora com 5% de leite Molico em PBS/0,1% Tween-

20 e em seguida, incubadas com o anticorpo primário por 4 horas na mesma solução anterior (anticorpo monoclonal de camundongo anti-clatrina na concentração de 1:300 e o anticorpo policlonal de coelho anti-caveolina1 na concentração de 1:1000 – Transduction Labs). Os anticorpos secundários (anticorpo anti-IgG de camundongo ou de coelho conjugados com peroxidase – SIGMA) foram incubados na mesma solução por 1 hora. As proteínas detectadas foram reveladas por quimioluminescência usando o kit ECL-PLUS (Amershan-Pharmacia Biotech).

3.8 – Precipitação e detecção de PrPres:

Células transfectadas com confluência de cerca de 95% foram lavadas com PBS e lisadas em tampão de lise (PBS 1X pH 7,4; 0,5% de Triton X-100 e 0,5% de deoxicolato de sódio). Os restos celulares foram separados por centrifugação a 1000g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido para um novo tubo e a proteína total foi dosada através do kit BCA (Pierce). As amostras foram normalizadas e cerca de 100 a 300µg de proteína total foi submetida a proteólise com 20µg/ml de proteinase K (PK) por 30 minutos a 37°C. Amostras de 3 a 5µg de extrato foram separadas para detecção de PrP total das células sem tratamento com PK. Esta reação foi bloqueada pela adição de 1mM de PefaBloc (Roche) e incubação no gelo por 5 minutos. As amostras foram incubadas a 37°C por 10 minutos e foi adicionado o tampão PTA (4% de PTA - sodium phosphotungstic acid, 0,17M de MgCl₂ e pH de 7,4 ajustado com NaOH) pré-aquecido a 37°C para uma concentração final de 0,3%. As amostras foram então incubadas a 37°C com agitação por 2 horas. Depois desta incubação, as amostras foram centrifugadas em velocidade máxima usando centrífuga de mesa por 30 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi aspirado cuidadosamente e o pellet foi ressuscitado em 12-15µl de tampão de amostra para posterior eletroforese.

As amostras foram então fracionadas em gel NuPAGE 10% Bis-Tris em tampão de corrida MES (Invitrogen). Em seguida, as proteínas foram imobilizadas em membrana PVDF (Millipore Immobilon-P). A membrana foi bloqueada em 1X TBS (50mM de Tris pH 7,5; 150mM de NaCl), 0,05% Tween-20 e 5% de leite (Blotto – Biorad) durante 1 hora. Em seguida, o anticorpo primário anti-PrP D13 (anticorpo recombinante Fab que reconhece o epítipo entre os resíduos 96-106 da proteína prion - InPro Biotechnology) foi adicionado na proporção de 1:10.000 em TBS/0,05%Tween e 5% de

Blotto. Após 1 hora de incubação com o primário, a membrana foi lavada 3 vezes em TBS/0,05%Tween e incubada por mais 1 hora com o anticorpo secundário anti-Fab conjugado com fosfatase alcalina na proporção de 1:10.000. Depois de mais 5 lavagens com TBS/Tween, a membrana foi incubada por 5 minutos com o substrato Attaphos (Promega) que é um substrato fluorescente da fosfatase alcalina. O excesso de Attaphos foi removido e a membrana foi guardada protegida da luz até secar. Depois de seca, a membrana é colocada dentro de uma folha plástica e é escaneada no sistema de imagens Storm (Amershan Biosciences – Molecular Dynamics) com o comprimento de onda adequado para excitação, bem como o filtro de emissão. Amostras de PrPres fluorescente foram corridas em gel NuPAGE e diretamente escaneada em sistema Typhoon (Amershan Biosciences – Molecular Dynamics) como os filtros ajustados para detecção de alexa568.

3.9 – Marcação de PrPres com alexa 568:

Preparação de fração de microsossomos a partir de cérebros de camundongo normal ou infectado com Chandler PrPres com sintomas avançados da doença foi feita como já descrito (Baron e col., 2002). A purificação de PrPres a partir de camundongo ou hamster infectado com PrPres (Ch, 87V ou 263K) com sintomas avançados foi feita como descrito por Raymond & Chabry (2004). Amostras de Microsossomos, PrPres purificado, fibrilas de PrP^c recombinante agregado “in vitro” ou fibrilas de A/ β 1-42 foram incubadas com 1mg/ml do corante fluorescente alexa568 (Alexa flúor 568 – Molecular Probes) para reação de conjugação. A reação de conjugação foi incubada a temperatura ambiente no escuro por 1 hora com agitação periódica e então, guardada a 4°C no escuro. No dia seguinte, a reação foi centrifugada por 30 minutos a 21.000g. O pellet foi ressuscitado em PBS estéril com 10mM de glicina para bloquear as moléculas de corante livres e incubado a temperatura ambiente. Em seguida, o material foi novamente centrifugado e lavado com uma solução estéril de PBS/glicina. Na última centrifugação, os controles, microsossomos e PrPres marcados com alexa568 foram ressuscitados em PBS estéril e a fluorescência das amostras foi analisada em gel NuPAGE 10% Bis-Tris (Invitrogen) e em seguida escaneado em sistema de imagens Typhoon (Amershan Biosciences – Molecular Dynamics) com o comprimento de onda adequado para excitação, bem como o filtro de emissão.

3.10 – Infecção de células SN56 com PrPres fluorescente:

Células SN56 foram plaqueadas na diluição 1:20 (10% de confluência) em placas Delta T (Bioptechs) e no dia seguinte foram diferenciadas com 1mM de cAMP na ausência de soro por um dia. Em seguida, estas células foram tratadas com 16ng de PrPres fluorescente (Chandler, Ch microssomos, 87V ou 263K) ou a quantidade equivalente de fluorescência das amostras controles (fibrilas de A/ β 1-42 ou fibrilas de PrP^c recombinante agregado “in vitro”). Após 1 hora de incubação, as células foram visualizadas em microscópio confocal e após mais 3 horas, o meio foi substituído por meio novo com soro. As células foram colocadas de volta na incubadora e foram visualizadas todos os dias por um período que variou entre 5 a 10 dias consecutivos. As imagens foram obtidas usando um sistema confocal “Spinning-disk” UltraView da Perkin-Elmer acoplado a um microscópio Nikon Eclipse TE-2000-S usando uma objetiva de imersão em óleo (60X, 1,4 N.A.) ou o sistema confocal Bio-Rad MRC 1024 acoplado a um microscópio Zeiss com uma objetiva de imersão em água (40X, 1,2 N.A.). Para o processamento de imagens e análises foram usados os programas Lasersharp (Bio-Rad), Confocal Assistant, Adobe Photoshop e ImageJ.

3.11 – Protocolos de Biosegurança:

Todas as técnicas envolvendo células ou material contaminado com PrPres eram realizadas dentro de fluxo laminar. Todo o descarte líquido proveniente de cultivo de células, imunoblots e outros era misturado a LpH (Steris Corp., St. Louis, Mo) e posteriormente descartado como lixo comum. Todo o descarte sólido (ponteiras, garrafas e placas de cultura, tubos, géis e etc) era colocado em garrafas contendo LpH e separado para ser autoclavado e posteriormente incinerado.

4 – Resultados:

4.1 - Distribuição de GFP-PrP^c e GFP-PrPΔ32-121 nas células SN56:

A proteína GFP apresenta massa molecular de 27kDa e PrP^c apresenta de 33 a 35kDa, ou seja ao expressarmos a proteína resultante da fusão das duas, estamos adicionando uma massa molecular quase igual a PrP^c. Além disso, esta proteína requer modificações pós-traducionais e endereçamento para a membrana plasmática. Experimentos iniciais demonstraram que GFP-PrP^c apresenta massa molecular correta e encontra-se nas mesmas regiões celulares que PrP^c endógeno em células SN56 (Lee e cols., 2001). Já havia sido descrito que mutantes de PrP^c com deleção N-terminal apresentavam uma deficiência na endocitose (Shyng e cols., 1995) e por isso, estávamos interessados em avaliar se a distribuição da proteína selvagem e da mutante apresentavam diferenças que pudessem ser detectadas por microscopia óptica. Para avaliarmos o papel da região N-terminal de PrP^c no tráfego da proteína, estudamos por microscopia confocal células SN56 expressando GFP-PrP^c ou o mutante com deleção N-terminal GFP-PrPΔ32-121 (Fig. 4). Cada série de imagens do eixo Z foi projetada num único plano e a fluorescência da membrana e do interior da célula foram quantificadas usando o programa de análise Metamorph (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA). O resultado foi representado num gráfico de frequência cumulativa (Fig. 5). As proteínas de fusão localizaram-se tanto na superfície celular bem como em uma região perinuclear na célula, o que é coerente com a localização de proteínas ancoradas por GPI (Nichols e cols., 2001). Experimentos anteriores já haviam demonstrado que GFP-PrP^c estava corretamente ancorada a membrana por motivo de GPI, já que tratamento das células com PiPLC removeu toda a fluorescência da membrana (Lee e cols., 2001). No entanto, embora as duas proteínas de fusão estejam presentes nas mesmas regiões celulares, a distribuição relativa dessas duas proteínas na superfície celular e na região perinuclear apresentou diferença (Fig. 5). Enquanto GFP-PrP^c apresentava maior acúmulo na região perinuclear, a proteína mutante acumulou-se mais na superfície celular (Fig. 4 e 5). Esses dados estão de acordo com resultados anteriores indicando que a região N-terminal participa do tráfego de PrP^c (Shyng e cols, 1995), e que o mutante parece acumular-se na superfície celular.

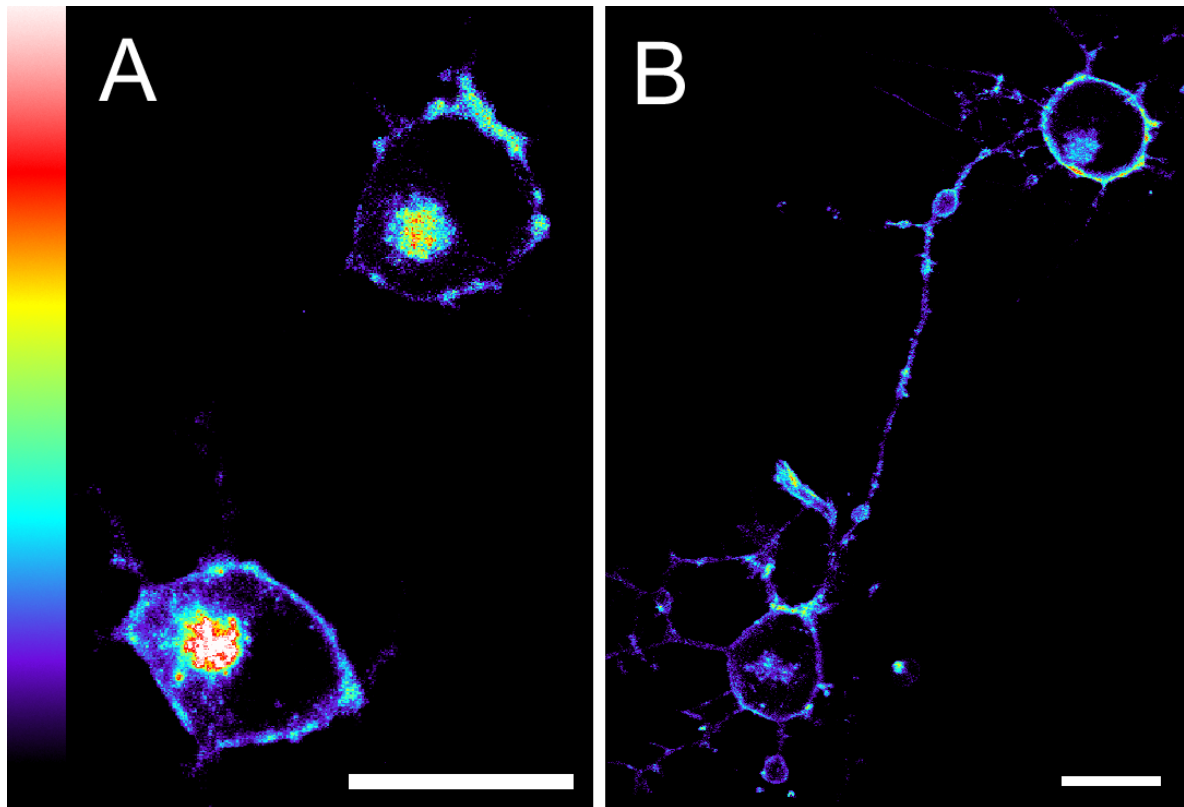


Fig. 4: Distribuição de GFP-PrP^c e GFP-PrPΔ32-121 em células SN56. **A e B:** Reconstrução de imagens série Z de células transfectadas com GFP-PrP^c (**A**) e GFP-PrPΔ32-121 (**B**). GFP-PrPΔ32-121 está localizado preferencialmente na membrana plasmática quando comparado a GFP-PrP^c e apresenta menor acúmulo na região perinuclear.

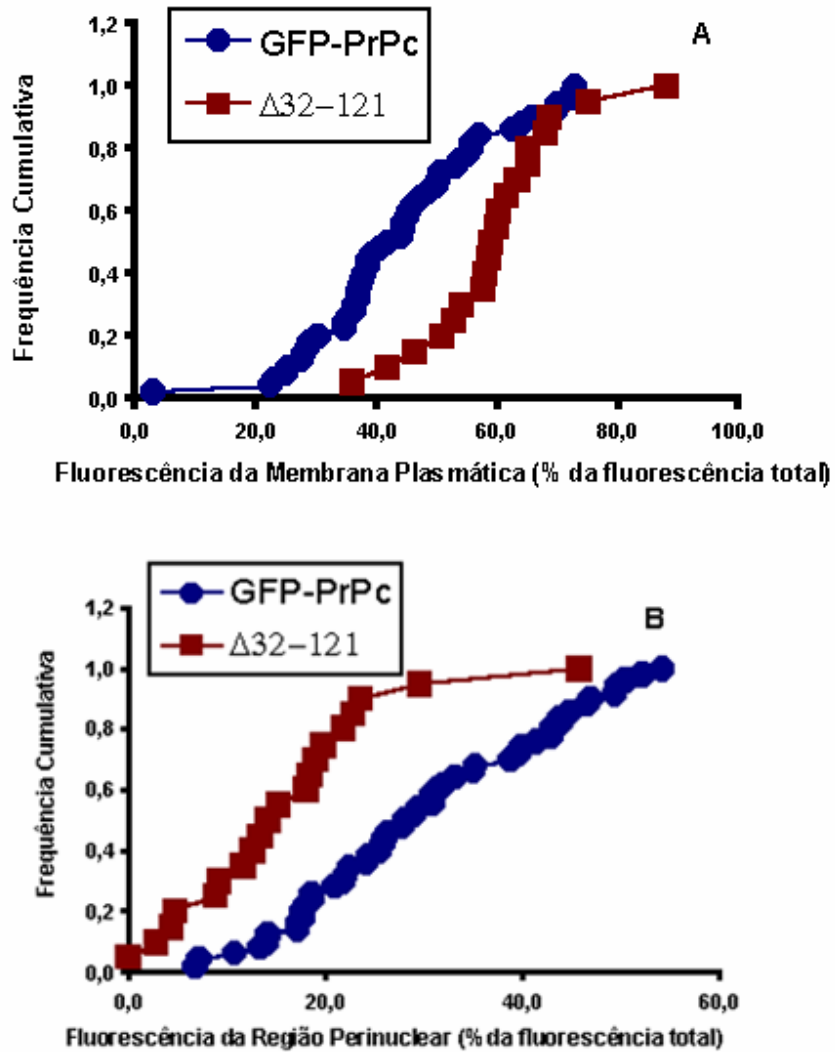


Fig. 5: Gráfico de frequência cumulativa para a distribuição da fluorescência na membrana plasmática (A) e na região perinuclear (B) de células SN56 transfectadas com GFP-PrP^c (círculo, n=50) e GFP-PrPΔ32-121 (quadrado, n=20). A proteína mutante acumulou menos na região perinuclear que a selvagem e em algumas células expressando GFP-PrPΔ32-121 esta região foi ausente. As diferenças na distribuição foram estatisticamente significantes ($p < 0.02$ pelo método estatístico Kolmogorov-Smirnov).

Além disso, esses experimentos indicam que a distribuição de PrP^c pode ser avaliada de maneira quantitativa por microscopia óptica.

4.2 - Dupla marcação das células expressando GFP-PrP^c ou GFP-PrP Δ 32-121 com Bodipy-TR, Transferrina ou FM4-64:

As proteínas de fusão GFP-PrP^c e GFP-PrP Δ 32-121 se distribuíram pela membrana plasmática e também acumularam em região perinuclear. Shyng e cols. (1993) demonstraram que PrP^c cicla constantemente entre membrana plasmática e compartimentos endocíticos sugerindo que a região perinuclear marcada com GFP-PrP^c e GFP-PrP Δ 32-121 poderia ser composta por endossomas. Também foi sugerido que proteínas ancoradas por GPI ciclaram entre a membrana plasmática e o Golgi (Nichols e cols., 2001; Nichols., 2002), embora exista controvérsia e alguns autores apresentem evidências que algumas dessas proteínas encontram-se em endossomas (Maxfield & Mayor, 1997; Mayor e cols., 1998). Além disso, como estas proteínas estão sendo sintetizadas continuamente, o Golgi também seria um bom candidato para esta marcação.

Para investigar quais organelas intracelulares constituíam a região perinuclear marcada com GFP-PrP^c e GFP-PrP Δ 32-121, nós utilizamos uma série de marcadores específicos para organelas citoplasmáticas. Células SN56 transfectadas com estas construções e marcadas com Bodipy-TR, Transferrina ou FM4-64 foram levadas ao microscópio confocal e as imagens foram adquiridas. Estas imagens foram analisadas usando o programa Adobe Photoshop.

Bodipy TR C₅ ceramida e Bodipy FL C₅ ceramida (Molecular Probes) produzem marcação do Complexo de Golgi (Lim e cols., 2001; Michaelson e cols., 2001; Xu e cols., 2002). No entanto, Bodipy TR tem sido pouco utilizado e apresenta uma marcação bem mais fraca que o bodipy FL. Em nossos experimentos de dupla marcação, tivemos que usar o Bodipy TR (vermelho) já que PrP^c estava sendo expresso em fusão com GFP (verde). Inicialmente, a especificidade da marcação do Bodipy TR foi confirmada pela dupla marcação de células com os dois corantes (TR e FL) que apresentaram uma excelente colocalização e também através de tratamento com Brefeldin A (BFA) (Figs. 6). Brefeldin A é um metabólito de fungos que bloqueia o transporte de proteínas no Golgi e causa a redistribuição deste com o retículo

endoplasmático (Lippincott-Schwartz e cols., 1991). Células marcadas com estes corantes e tratadas com BFA apresentaram marcação difusa dos mesmos confirmando que eles se associam especificamente ao Complexo de Golgi intacto, marcação esta que se perde com o tratamento por BFA (Fig. 6).

As células expressando GFP-PrP^c ou GFP-PrP Δ 32-121 e marcadas com Bodipy TR apresentaram colocalização parcial. Este dado sugere que tanto PrP^c quanto o mutante de deleção N-terminal acumulam-se no Golgi (Figs. 7 e 8), confirmando dados anteriores em que outras construções de GFP-PrP^c selvagem apresentaram colocalização com diferentes marcadores de Golgi como a enzima MannII, em células HeLa e com giantina, em células BHK (Negro e cols., 2001; Ivanova e cols, 2001).

Uma possibilidade que exploramos foi que outros compartimentos celulares além do Golgi poderiam apresentar GFP-PrP^c. Um desses compartimentos corresponde a organelas envolvidas na via endocítica clássica, como por exemplo, os endossomas primários e endossomas de reciclagem. Transferrina se liga ao seu receptor na superfície celular e é internalizada pela via clássica dependente de clatrina. Nesta via, transferrina passa primeiramente por endossomas primários próximos à membrana e se acumula numa região perinuclear que corresponde aos endossomas de reciclagem (Sonnichsen e cols., 2000). Células expressando as proteínas de fusão e marcadas com transferrina-alexa568 também apresentaram colocalização parcial na região perinuclear sugerindo que PrP^c pode ser internalizada por uma via comum à transferrina, ou pelo menos compartilha alguns intermediários endocíticos com esta, provavelmente endossomas de reciclagem (Figs. 9 e 10). O mutante de deleção N-terminal e PrP^c apresentaram distribuição idêntica em endossomas de reciclagem, sugerindo que a diferença entre eles está relacionada a taxa de endocitose e que o tráfego intracelular permanece inalterado. Estes dados foram confirmados mais tarde por Sunyach e cols. (2003) que demonstraram que a região N-terminal de PrP^c, mais precisamente 2 resíduos de lisina nesta região, é suficiente para sinalizar a internalização da molécula.

Os corantes da família FM, como o FM 4-64, são bastante interessantes pois não apresentam toxicidade às células, só apresentam fluorescência forte quando inseridos na folha externa da bicamada lipídica e não atravessam a membrana livremente porque apresentam um grupamento carregado. Estas características tornam estas moléculas muito úteis no estudo de reciclagem de vesículas, mecanismos gerais de endocitose e

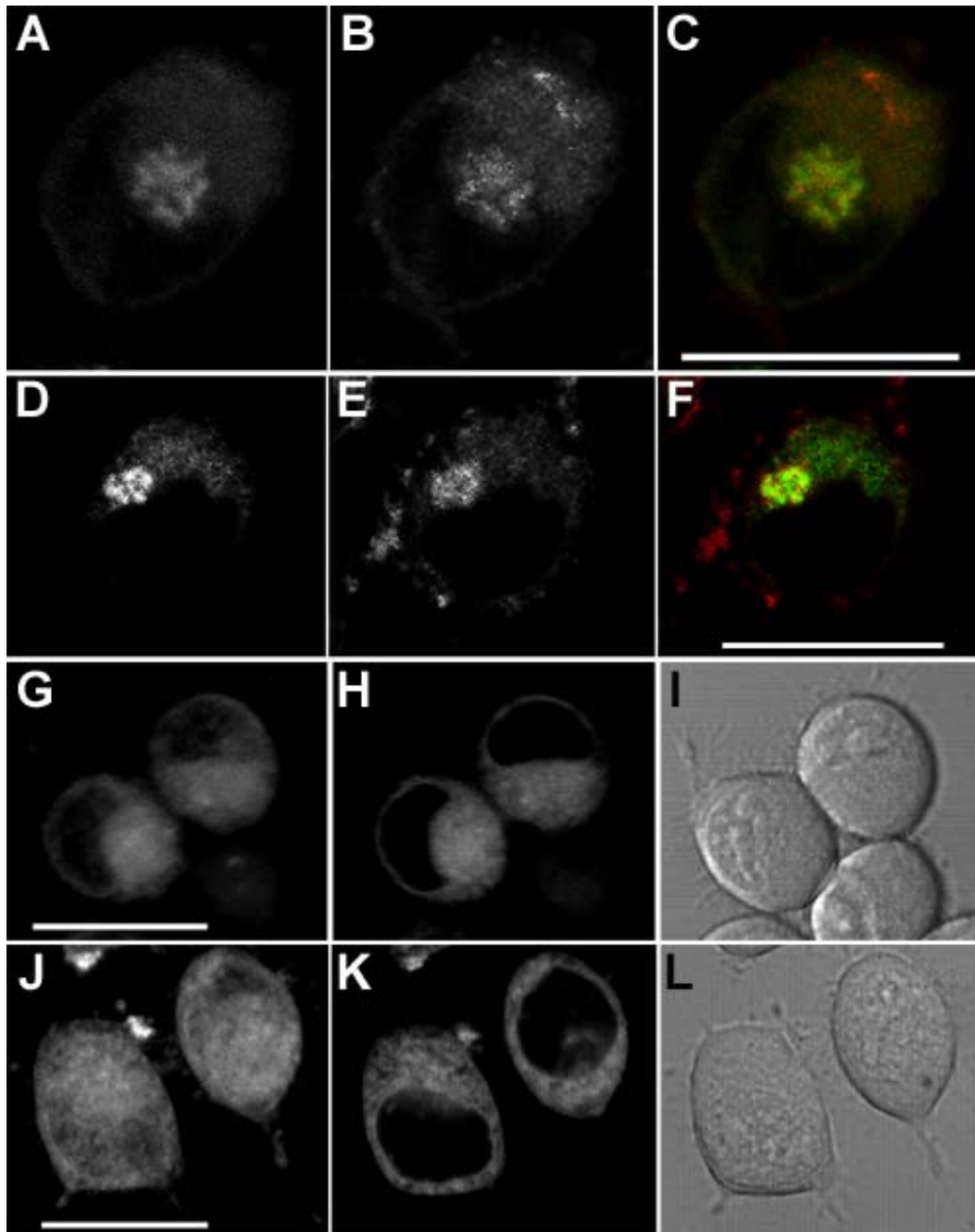


Fig. 6: Células SN56 marcadas com Bodipy FL (A e D) e TR (B e E) apresentaram alta colocalização (C e F) na marcação de Golgi. Reconstrução de imagens de série Z (G e J) ou fatia óptica (H e K) de células marcadas com Bodipy-FL (G e H) ou Bodipy-TR (J e K) e tratadas com Brefeldina A apresentando fluorescência dispersa no citoplasma. Barra: 20 μ m.

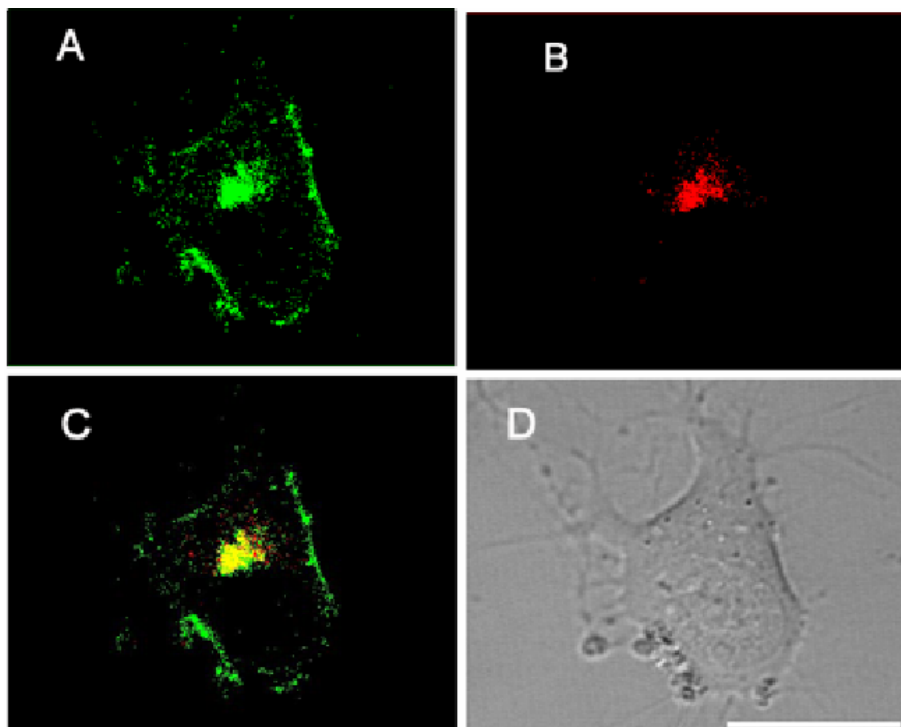


Fig. 7: GFP-PrP^c apresentou colocalização com o marcador de Golgi, Bodipy-TR. Células SN56 transfectadas com GFP-PrP^c (A) foram marcadas com Bodipy-TR (B) e as imagens foram sobrepostas (C). D: Imagem de luz transmitida (DIC). Barra: 20 μ m.

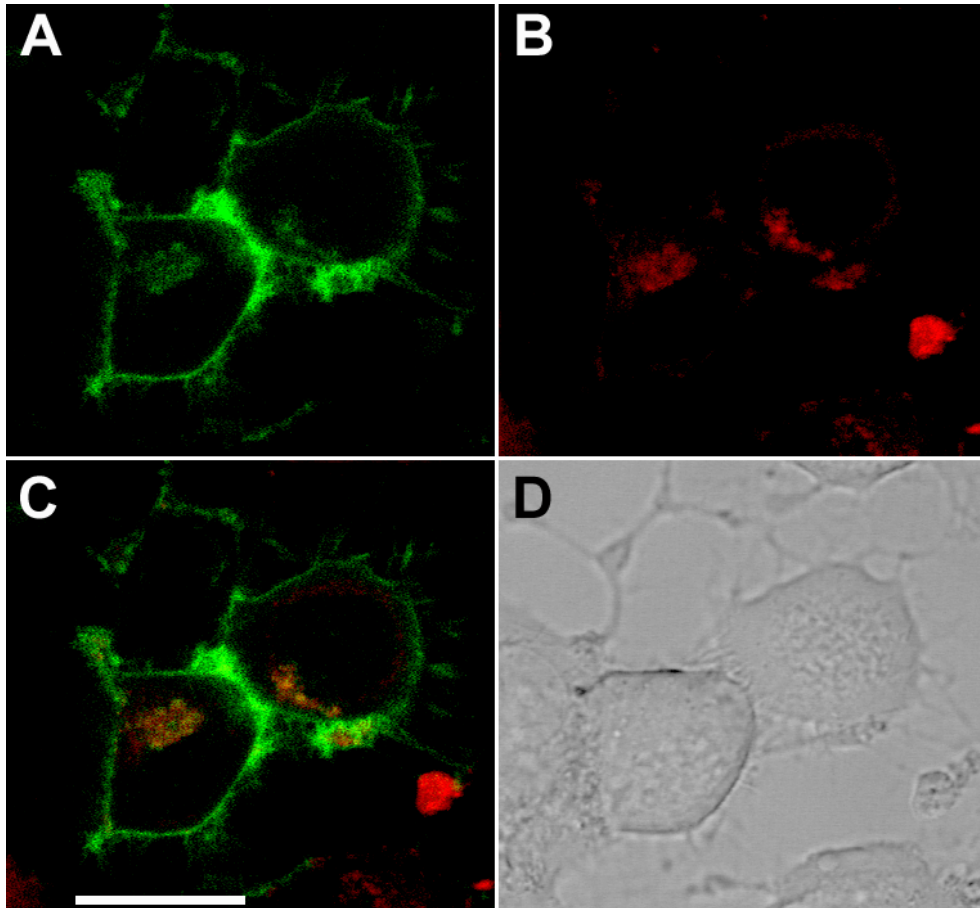


Fig. 8: GFP-PrP Δ 32-121 apresentou colocalização com o marcador de Golgi, Bodipy-TR. Células SN56 transfectadas com GFP-PrP Δ 32-121 (A) foram marcadas com Bodipy-TR (B) e as imagens foram sobrepostas (C). D: Imagem de luz transmitida (DIC). Barra: 20 μ m.

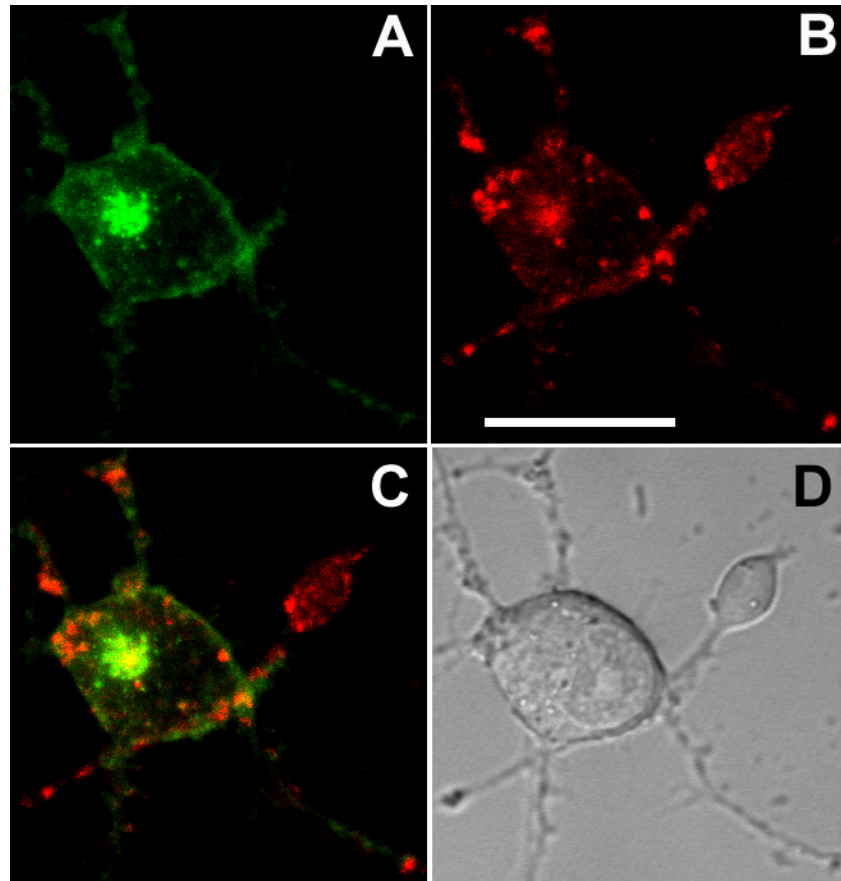


Fig. 9: GFP-PrP^c apresentou colocalização parcial com o marcador de endossomas, Transferrina. Células SN56 transfectadas com GFP-PrP^c (A) foram marcadas com Transferrina (B) e as imagens foram sobrepostas (C). D: Imagem de luz transmitida (DIC). Barra: 20 μ m.

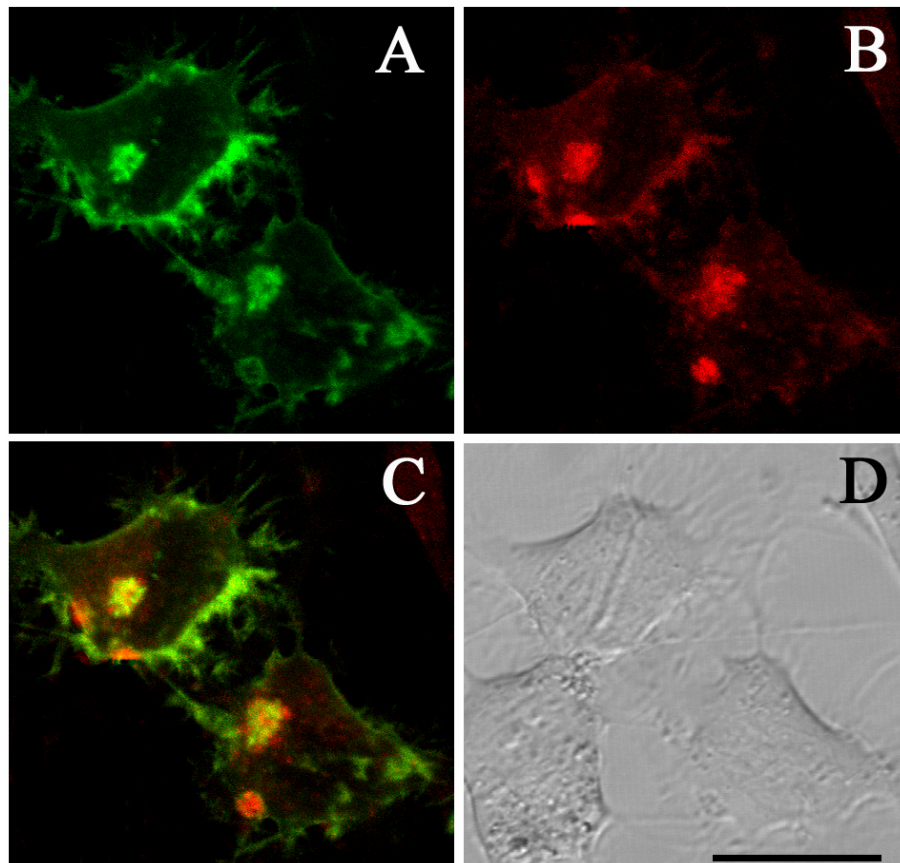


Fig. 10: GFP-PrP Δ 32-121 apresentou colocalização parcial com o marcador de endossomas Transferrina. Células SN56 transfectadas com GFP-PrP Δ 32-121 (A) foram marcadas com Transferrina (B) e as imagens foram sobrepostas (C). D: Imagem de luz transmitida (DIC). Barra: 20 μ m.

marcação de endossomas. O corante FM4-64 é um corante excelente para experimentos de dupla marcação com GFP, pois emite fluorescência no comprimento de onda de 640nm e portanto, a possibilidade de interferência entre a emissão da fluorescência das duas moléculas é nula. A marcação de FM4-64 em células SN56 expressando as proteínas de fusão também mostrou colocalização parcial na região de endossomas de reciclagem (Figs. 11 e 12). Estes dados confirmam os resultados com a transferrina, já que FM4-64 marca organelas endocíticas como endossomas primários e de reciclagem, embora de uma maneira menos específica.

Estes dados indicam que GFP-PrP^c se acumula numa região perinuclear que provavelmente corresponde à proteína presente no Golgi e endossomas de reciclagem. Para avaliarmos a contribuição das proteínas recém sintetizadas a esta marcação perinuclear, nós tratamos células expressando GFP-PrP^c com cicloheximida, um potente inibidor de síntese protéica. Nas condições usadas, a cicloheximida foi capaz de bloquear 97% da síntese protéica de células SN56 (dados não mostrados) e ainda assim, a maioria das células transfectadas apresentou uma região perinuclear com marcação fraca positiva para GFP-PrP^c. Esta marcação fraca colocalizou parcialmente com FM 4-64 (Fig. 13). Isto sugere que parte da marcação detectada na região perinuclear corresponde à proteína recém sintetizada no Golgi e o restante se deve à reciclagem de GFP-PrP^c para compartimentos endocíticos, como os endossomas de reciclagem e até mesmo para o Golgi.

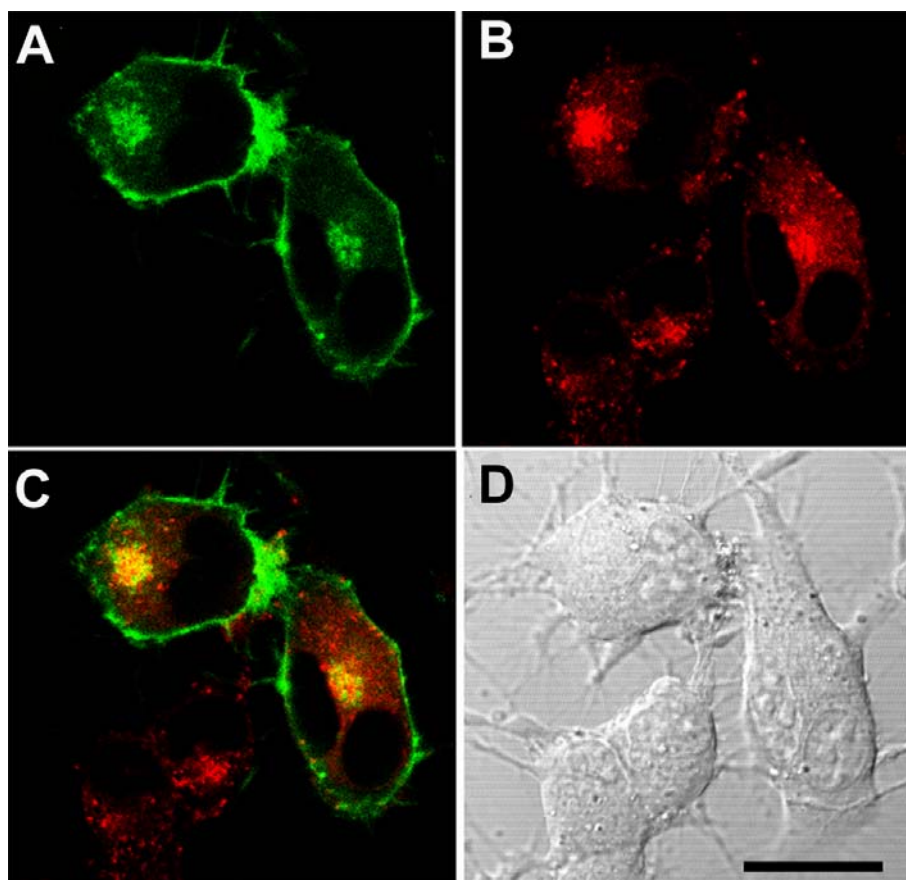


Fig. 11: GFP-PrP^c apresentou colocalização parcial com o marcador de endossomas, FM4-64. Células SN56 transfectadas com GFP-PrP^c (A) foram marcadas com FM4-64 (B) e as imagens foram sobrepostas (C). D: Imagem de luz transmitida (DIC). Barra: 20 μ m.

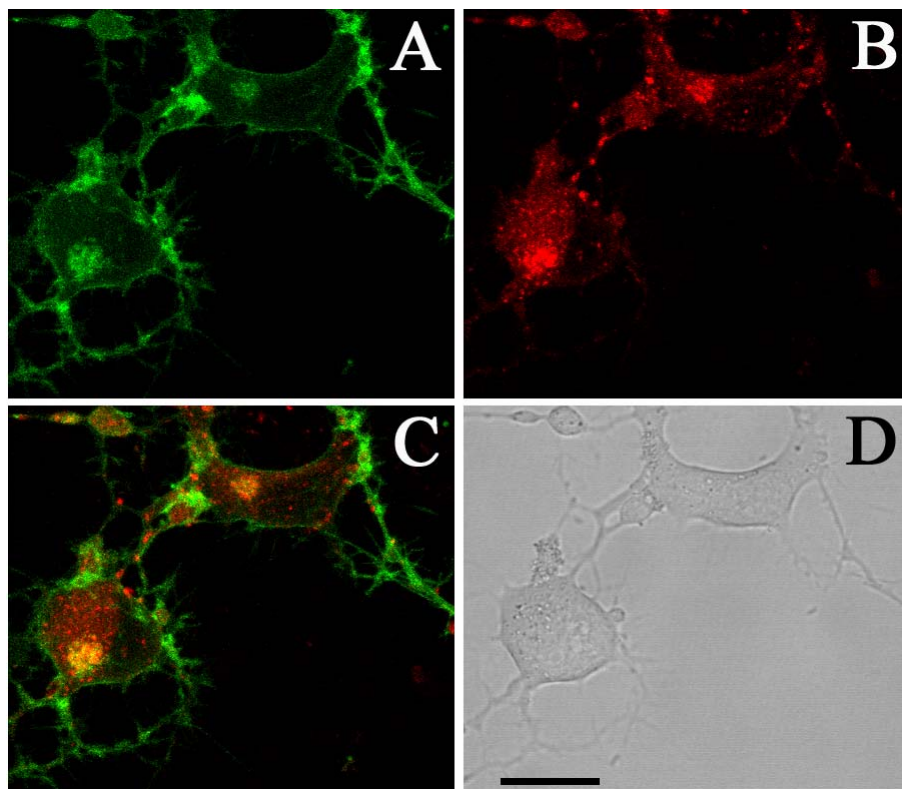


Fig. 12: GFP-PrP Δ 32-121 apresentou colocalização parcial com o marcador de endossomas, FM4-64. Células SN56 transfectadas com GFP-PrP Δ 32-121 (A) foram marcadas com FM4-64 (B) e as imagens foram sobrepostas (C). D: Imagem de luz transmitida (DIC). Barra: 20 μ m.

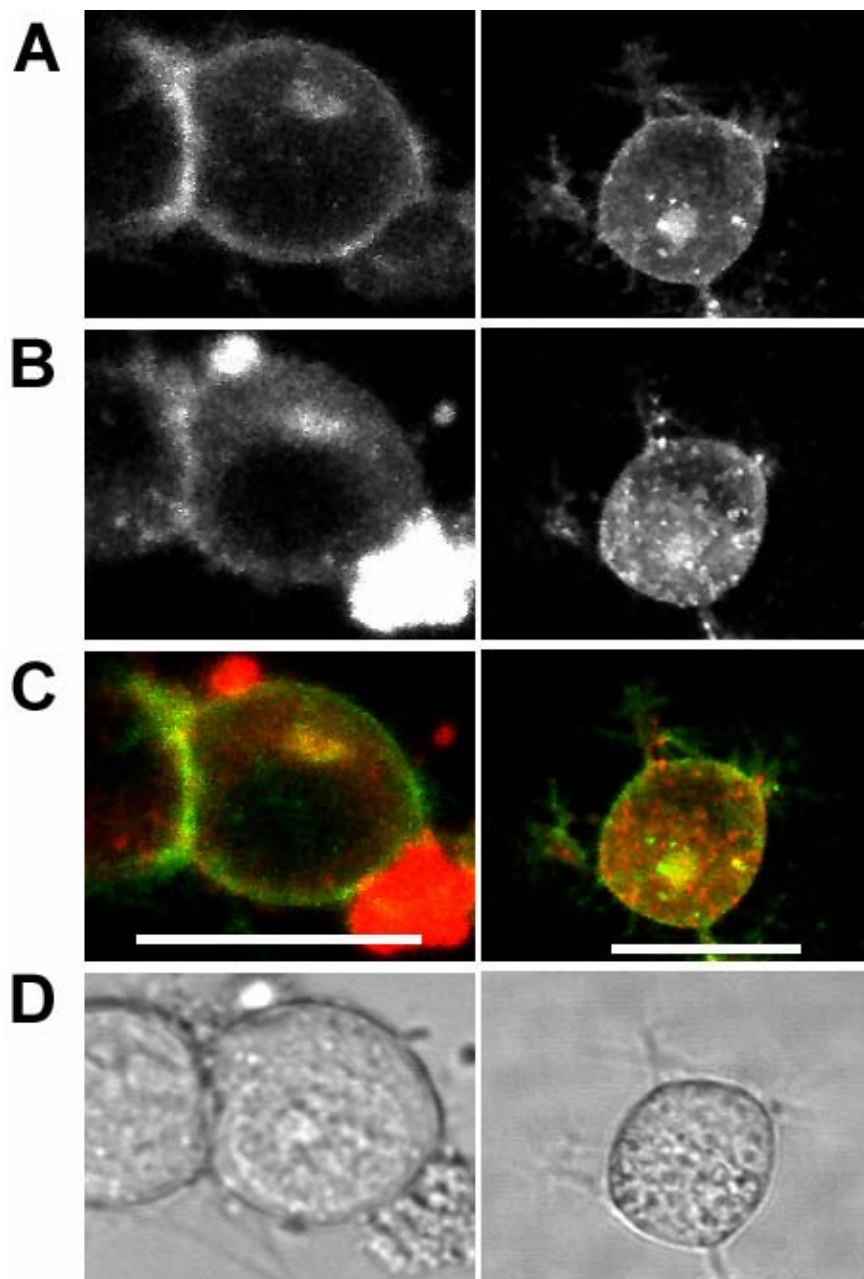


Fig. 13: Células SN56 expressando GFP-PrP^c foram tratadas com cicloheximida (A) e marcadas com FM4-64 (B). As imagens foram sobrepostas (C) e indicam uma colocalização parcial. D: Imagem de luz transmitida (DIC). Barra: 20 μ m.

4.3 - Ensaio de internalização de GFP- PrP^c e GFP-PrP Δ 32-121:

A endocitose de PrP^c de galinha pode ser induzida por concentrações extracelulares de cobre na faixa micromolar (Pauly & Harris, 1998). Esse processo é pouco estudado, e nada se sabe sobre os mecanismos envolvidos. Além disso, pouco se sabe sobre o destino de PrP^c internalizado em células. A etiquetagem de PrP^c com GFP propiciou a visualização de PrP^c em células vivas e nos permitiu seguir a endocitose da proteína. Para isso, foi desenvolvido um ensaio de perfusão de cobre em células vivas conforme descrito no item 3.3. Na presença de cobre, a fluorescência da membrana é reduzida rapidamente indicando que GFP-PrP^c sofreu internalização. Esta diminuição de fluorescência na membrana é acompanhada por um aumento na fluorescência da região perinuclear, sugerindo que após internalização GFP-PrP^c é direcionado para organelas intracelulares. Estes dados confirmam trabalhos anteriores mostrando o papel indutor do cobre na endocitose de PrP^c (Pauly & Harris, 1998; Perera & Hooper, 2001) e visualiza pela primeira vez, este processo em células vivas (vídeo 1 – CD em anexo). Entretanto, o mutante GFP-PrP Δ 32-121 não foi capaz de sofrer internalização após exposição ao cobre. Estes dados sugerem a importância da região N-terminal para a internalização e confirmam que o cobre aumenta a taxa de endocitose dessas proteínas (Fig. 14 e 15). Estes dados também comprovam que a proteína de fusão GFP-PrP^c além de ser expressa, modificada e corretamente direcionada para membrana plasmática é funcional. A concentração de cobre mais comumente usada nos experimentos foi a de 500 μ M, embora todas as outras concentrações de cobre usadas (100 e 250 μ M) também tenham induzido a endocitose de GFP-PrP^c de maneira dependente de concentração (dados não mostrados). A possibilidade de induzir de maneira sincronizada a internalização de GFP-PrP^c permite que possamos estudar mecanismos envolvidos nesse processo.

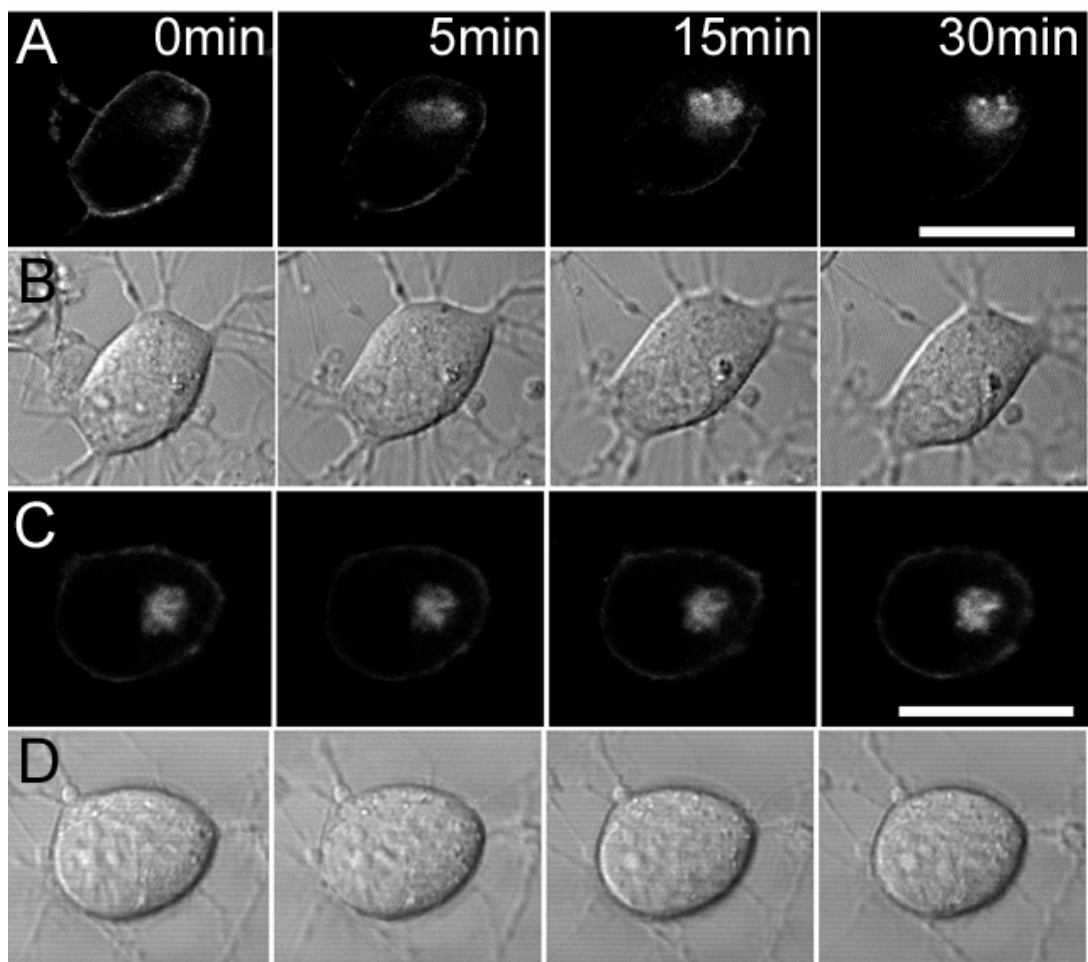


Fig. 14: Indução da endocitose de GFP-PrP^c por cobre (500μM). Células SN56 foram transfectadas com GFP-PrP^c e perfundidas com MEM com ou sem cobre (A e C). As imagens foram adquiridas nos tempos 0, 5, 15 e 30 minutos. (B e D) correspondem às imagens de luz transmitida (DIC). Barra: 20μm.

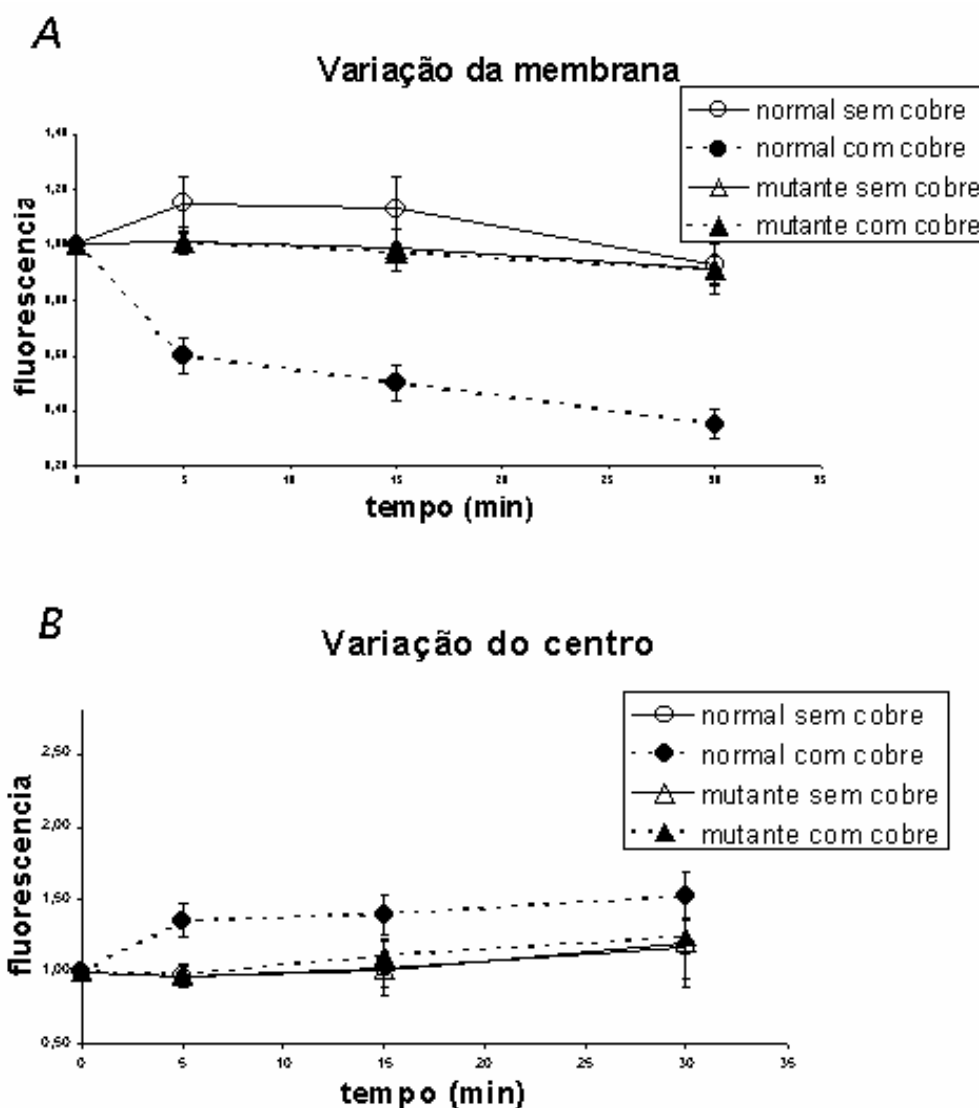


Fig. 15: Internalização de GFP-PrP^c e GFP-PrP Δ 32-121 em resposta ao cobre (500 μ M). Os gráficos representam a variação da fluorescência normalizada na membrana plasmática (A) e na região perinuclear (B) durante a perfusão. Células transfectadas com GFP-PrP^c e perfundidas em MEM sem cobre (círculo aberto, n=23), células transfectadas com GFP-PrP^c e perfundidas em MEM com cobre (círculo fechado, n=20), células transfectadas com GFP-PrP Δ 32-121 e perfundidas em MEM sem cobre (triângulo aberto, n=10) e células transfectadas com GFP-PrP Δ 32-121 e perfundidas em MEM com cobre (triângulo fechado, n=9).

4.4 - Avaliação do papel da dinamina na internalização de PrP^c:

Dinamina é uma GTPase responsável pela fissão de vesículas recém-formadas na membrana plasmática, sendo que o mutante de dinamina K44A perde esta atividade GTPásica e portanto, a capacidade de promover a fissão de vesículas. Esta proteína tem participação importante na endocitose dependente de clatrina, na endocitose via caveolae e endocitose dependente de “rafts”, dois processos de endocitose independentes de clatrina. O mecanismo pelo qual PrP^c sofre endocitose ainda é bastante discutido, por isso nós resolvemos investigar os processos envolvidos na endocitose desta proteína.

Para avaliar o papel da dinamina neste processo, células SN56 foram co-transfectadas com GFP-PrP^c e dinamina-I selvagem ou dinamina-I K44A. As células expressando dinamina-I K44A captam menos eficientemente FM4-64 ou transferrina e tem sua a diferenciação bloqueada (Barbosa e cols, 2002). Células co-transfectadas com GFP-PrP^c e dinamina-I selvagem não apresentaram diferença na distribuição de GFP-PrP^c que se acumulou na membrana plasmática e na região perinuclear composta de Golgi e endossomas de reciclagem. Já as células expressando dinamina-I K44A apresentaram GFP-PrP^c acumulado em estruturas tubulo-vesiculares próximas à membrana. A superfície celular apresentou uma marcação muito fraca e muitas vezes ausente, assim como a região perinuclear. Estes dados sugerem que GFP-PrP^c presente na membrana foi direcionado a vesículas para ser internalizado, explicando a redução de GFP-PrP^c na membrana e acúmulo em vesículas e túbulos próximos à superfície celular. Como a dinamina-I K44A não é capaz de promover a fissão destas vesículas, a proteína não foi encaminhada para a região perinuclear, e esta foi composta apenas por proteínas recém sintetizadas no Golgi. Isto explica a ausência ou redução de GFP-PrP^c na região perinuclear. Portanto, a endocitose constitutiva de GFP-PrP^c foi alterada na presença de Dinamina mutante (Fig. 16). Estas células também não se diferenciaram e apresentaram redução, ou em alguns casos, bloqueio da captação de FM4-64. No entanto, em algumas células pudemos notar que as estruturas túbulos-vesiculares positivas para GFP-PrP^c também acumularam FM4-64, indicando que estas estruturas mantinham contacto com meio extracelular, já que após dois dias de expressão de K44A, o corante FM4-64 ainda tinha acesso a estas estruturas (Fig. 17).

Uma vez que a endocitose constitutiva de GFP-PrP^c requer a participação de dinamina I, resolvemos avaliar se a endocitose induzida por cobre também envolveria esta proteína. Para isto, fizemos um ensaio de internalização usando 500µM de cobre como descrito nos itens 3.3 e 4.3. Conforme já descrito nestas seções, utilizamos o programa Metamorph (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA) para quantificarmos a intensidade de fluorescência das regiões de interesse como membrana plasmática e região perinuclear. No entanto, células expressando K44A apresentam uma redistribuição de GFP-PrP^c da membrana plasmática para vesículas próximas à membrana, dificultando a delimitação manual desta região. Na tentativa de resolver este problema, a sobreposição da imagem de luz transmitida e da fluorescência foi usada para delimitar os limites da célula. Ainda assim, a quantificação da fluorescência da membrana foi dificultada pela influência da fluorescência das vesículas associadas a ela bem como, pela variação individual observada na marcação da membrana, gerando dados dispersos. Esta variação ocorre porque algumas células apresentam GFP-PrP^c na membrana e em outras, toda a proteína já foi deslocada para as vesículas. Portanto, a quantificação da intensidade da fluorescência na região perinuclear é o parâmetro ideal para avaliarmos a taxa de endocitose em células expressando K44A, já que esta região não sofre nenhuma influência das variáveis descritas acima. Estas análises mostraram que o cobre não foi capaz de promover a internalização de GFP-PrP^c em células expressando dinamina-I K44A, como pode ser visto na Fig.18, que mostra que não houve diminuição significativa da fluorescência na membrana plasmática nem aumento na região perinuclear. No entanto, o controle, expressando dinamina-I selvagem, apresentou um aumento de fluorescência de quase 50% na região perinuclear que correspondeu a uma queda da fluorescência na membrana plasmática sugerindo que dinamina-I tenha um papel crítico nos processos de endocitose constitutiva e induzida por cobre de GFP-PrP^c. Os mesmos resultados foram obtidos usando 250µM de cobre (dados não mostrados).

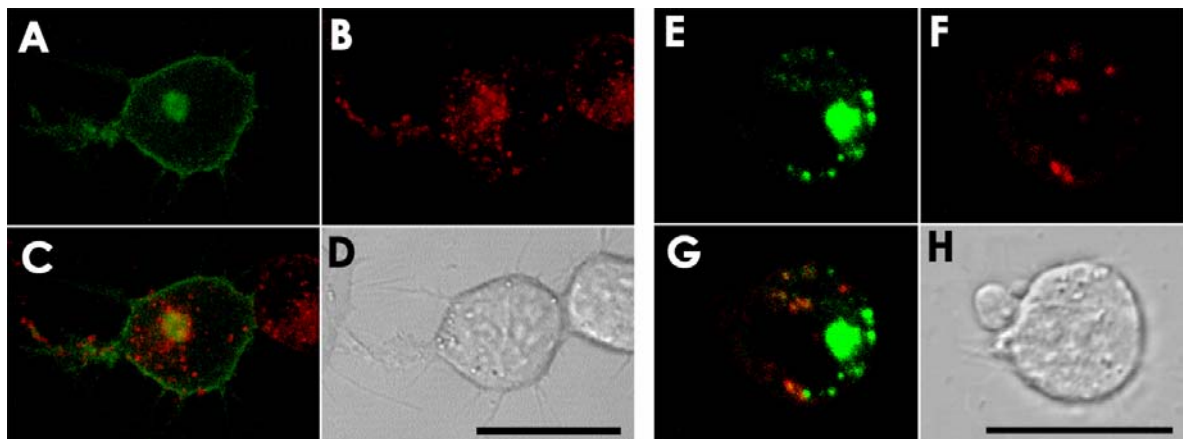


Fig. 16: Células co-transfectadas com GFP-PrP^c e Dinamina-I selvagem (A) são capazes de captar FM4-64 normalmente (B). A sobreposição de (A) e (B) é mostrada em (C). Em (E), célula co-transfectada com GFP-PrP^c e Dinamina-I K44A apresentando muitas vesículas de GFP-PrP^c próximas à membrana que praticamente não apresentou fluorescência. Esta célula (F) teve a captação e FM4-64 inibida, restrita a vesículas presas à membrana. A sobreposição de (E) e (F) é mostrada em (G). Em (D) e (H) mostram as imagens de luz transmitida das células (DIC). Barra=20µm.

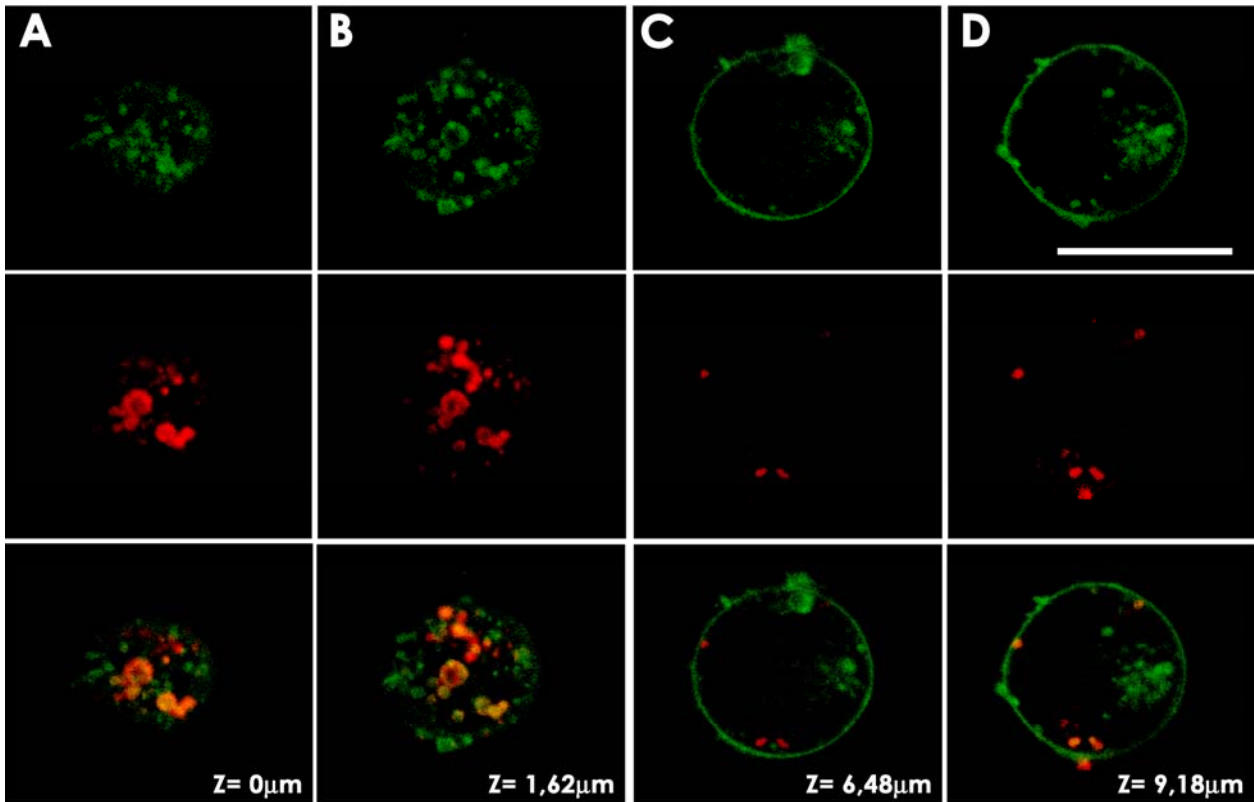


Fig. 17: Célula co-transfectada com GFP-PrP^c e Dinamina-I K44A. (A e B) correspondem a fatia ótica no topo da célula mostrando estruturas tubulo-vesiculares com acúmulo de GFP-PrP^c (verde) e FM4-64 (vermelho). (C e D) correspondem a fatia óticas no centro da célula mostrando fraca marcação de GFP-PrP^c na membrana e região perinuclear. Algumas vesículas associadas à membrana também podem ser vistas. A marcação com FM4-64 se resume à estas estruturas associadas à superfície. A sobreposição de GFP-PrP^c (verde) e FM4-64 (vermelho) é mostrada na linha inferior. Barra=20μm.

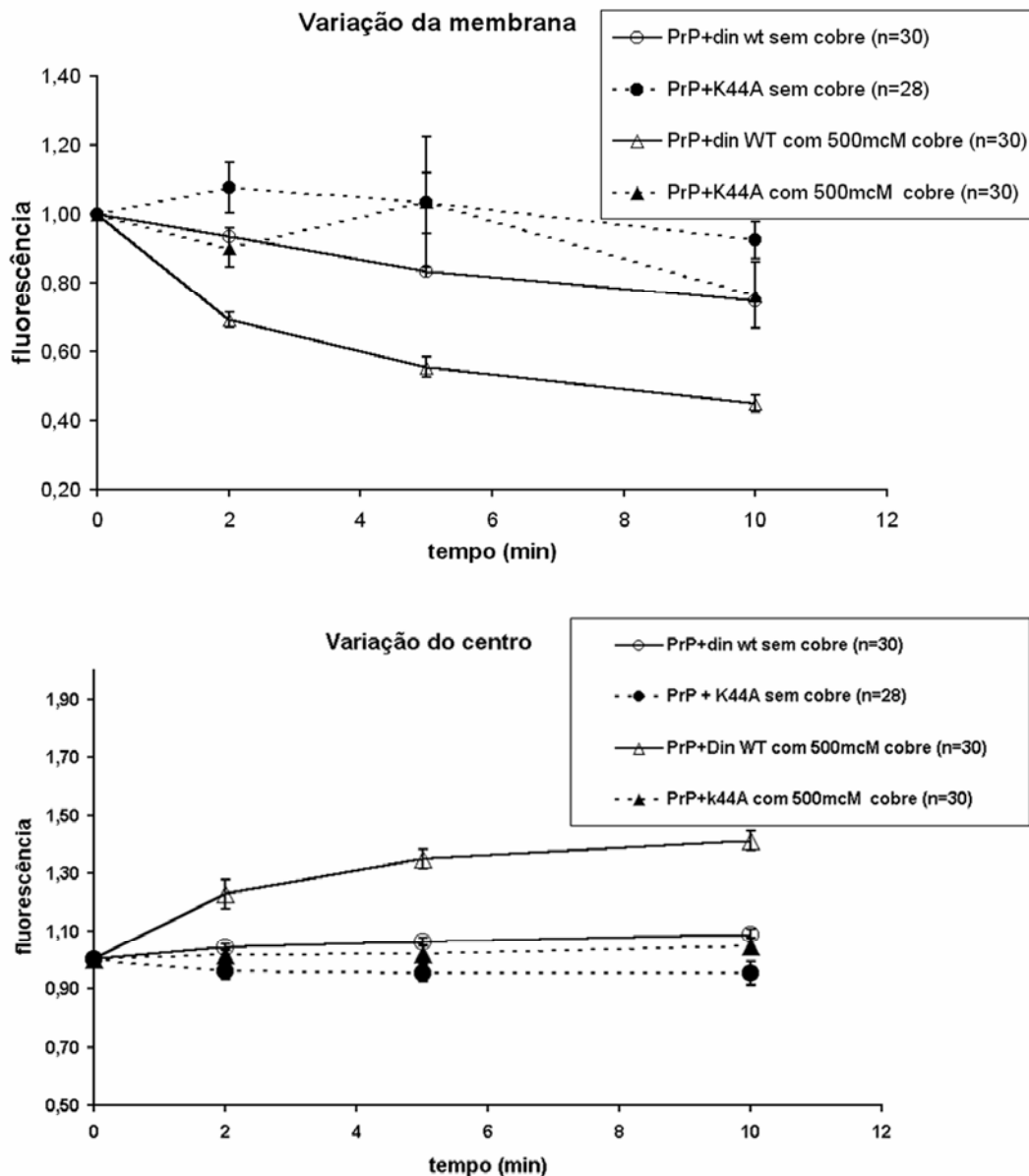


Fig. 18: Ensaio de internalização em células co-expressando GFP-PrP^c e Dinamina-I K44A ou Dinamina-I selvagem na presença de cobre (500µM). O gráfico representa a variação da fluorescência normalizada na membrana plasmática e região perinuclear durante a perfusão. Células co-transfectadas com GFP-PrP^c e Dinamina-I selvagem perfundidas em MEM sem cobre (círculo aberto, n=30), células co-transfectadas com GFP-PrP^c e Dinamina-I K44A perfundidas em MEM sem cobre (círculo fechado, n=28), células co-transfectadas com GFP-PrP^c e Dinamina-I selvagem perfundidas em MEM com cobre (triângulo aberto, n=30) e Células co-transfectadas com GFP-PrP^c e Dinamina-I K44A perfundida em MEM com cobre (triângulo fechado, n=30).

4.5 - Papel do motivo GPI na endocitose de PrP^c:

Os resultados anteriores indicam que GFP-PrP^c é direcionado à vesículas positivas para dinamina e dependem desta proteína para sofrer internalização. Entretanto, GFP-PrP^c se associa à membrana através de motivo GPI e não apresenta região citoplasmática que possa sinalizar este direcionamento. Uma possibilidade é que o motivo de GPI seria suficiente para direcionar proteínas à vesículas positivas para dinamina-I. Para testar essa possibilidade, nós usamos a construção GFP-GPI. Esta construção codifica uma proteína fluorescente (GFP-27kDa) ancorada à superfície celular por GPI. Células SN56 foram co-transfectadas com GFP-GPI e dinamina-I selvagem ou dinamina-I K44A e visualizadas no confocal 48 horas após transfecção. Células expressando dinamina selvagem ou o mutante apresentaram distribuição idêntica de GFP-GPI sugerindo que o motivo de GPI não é responsável pela seleção de GFP-PrP^c para vesículas positivas para dinamina (Fig. 19). Além disso, também sugere que proteínas ancoradas por GPI podem apresentar diferentes mecanismos de endocitose dependendo de sua seqüência e possíveis interações protéicas.

4.6 - Papel da clatrina na internalização de PrP^c:

Já que a dinamina-I participa tanto do mecanismo dependente de clatrina como de mecanismos independentes como caveolae (Oh e cols., 1998) ou rafts (revisto por Pelkmans & Helenius, 2003), nós resolvemos avaliar a participação de clatrina no processo de internalização de GFP-PrP^c. AP180 é uma proteína adaptadora capaz de recrutar clatrina para a endocitose. Expressão da porção C-terminal desta proteína leva à redução na taxa de endocitose dependente de clatrina (Ford e cols., 2001). Esta região contém o sítio de ligação a clatrina e conseqüentemente funciona como um competidor nesta associação, deslocando a clatrina dos sítios de endocitose na membrana plasmática. Células SN56 co-transfectadas com GFP-PrP^c e AP180-C captaram 75% menos transferrina fluorescente (marcador clássico da endocitose dependente de clatrina) que células transfectadas apenas com GFP-PrP^c (Fig. 20). A endocitose constitutiva de GFP-PrP^c não parece ter sido alterada pela expressão de AP180-C, já que não houve diferença na distribuição dessa proteína nas células co-transfectadas (Fig. 21).

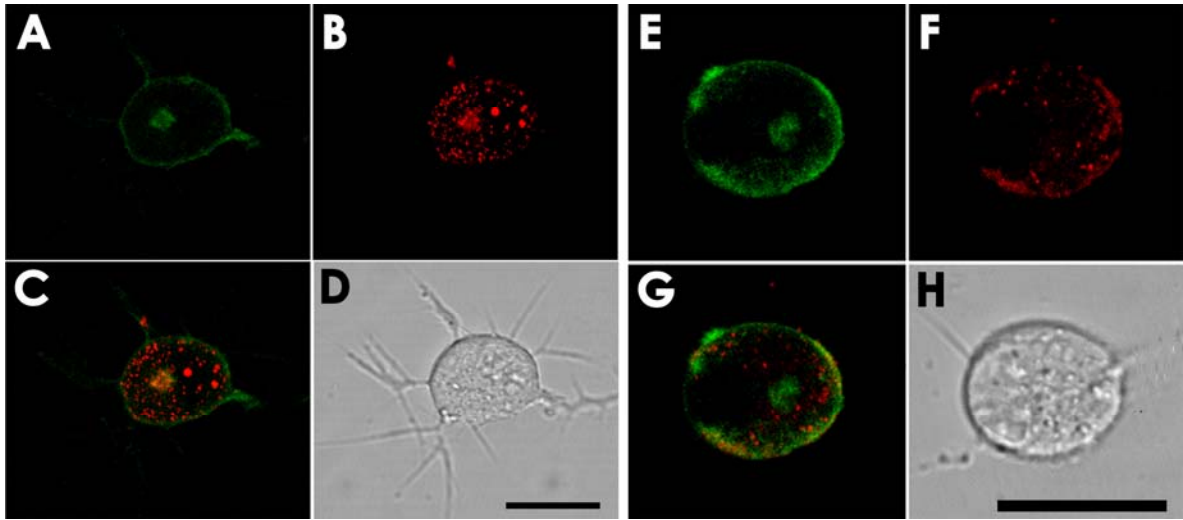


Fig. 19: Células co-transfectadas com GFP-GPI e Dinamina-I selvagem (A) são capazes de captar FM4-64 normalmente (B). A sobreposição de (A) e (B) é mostrada em (C). Em (E), célula co-transfectada com GFP-GPI e Dinamina-I K44A. Esta célula (F) teve a captação e FM4-64 bastante reduzida, porém a distribuição de GFP-GPI não se alterou. A sobreposição de (E) e (F) é mostrada em (G). Em (D) e (H) mostram as imagens de luz transmitida das células (DIC). Barra=20 μ m.

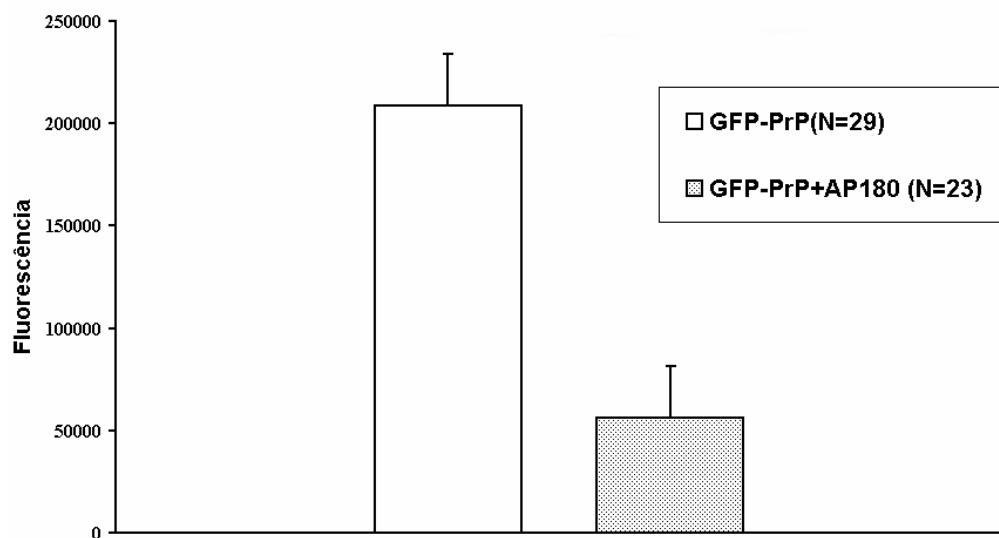


Fig. 20: Avaliação do papel de AP180-C na internalização de transferrina-alexa 568. Células expressando GFP-PrP^c e AP180-C apresentaram uma captação de transferrina 75% menor que as células expressando somente GFP-PrP^c. Para a transfecção das células, a construção AP180-C foi usada numa proporção maior que a de GFP-PrP^c (4X1). GFP-PrP^c funcionou como um marcador, já que a proteína AP180-C não é fluorescente. A análise foi feita usando o programa Metamorph (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA). A área das células transfectadas com GFP-PrP^c foi delimitada e a fluorescência total referente à captação da transferrina foi obtida. Assim, foi feita uma média da fluorescência total da transferrina de células co-transfectadas com GFP-PrP^c/AP180 e das células transfectadas apenas com GFP-PrP^c.

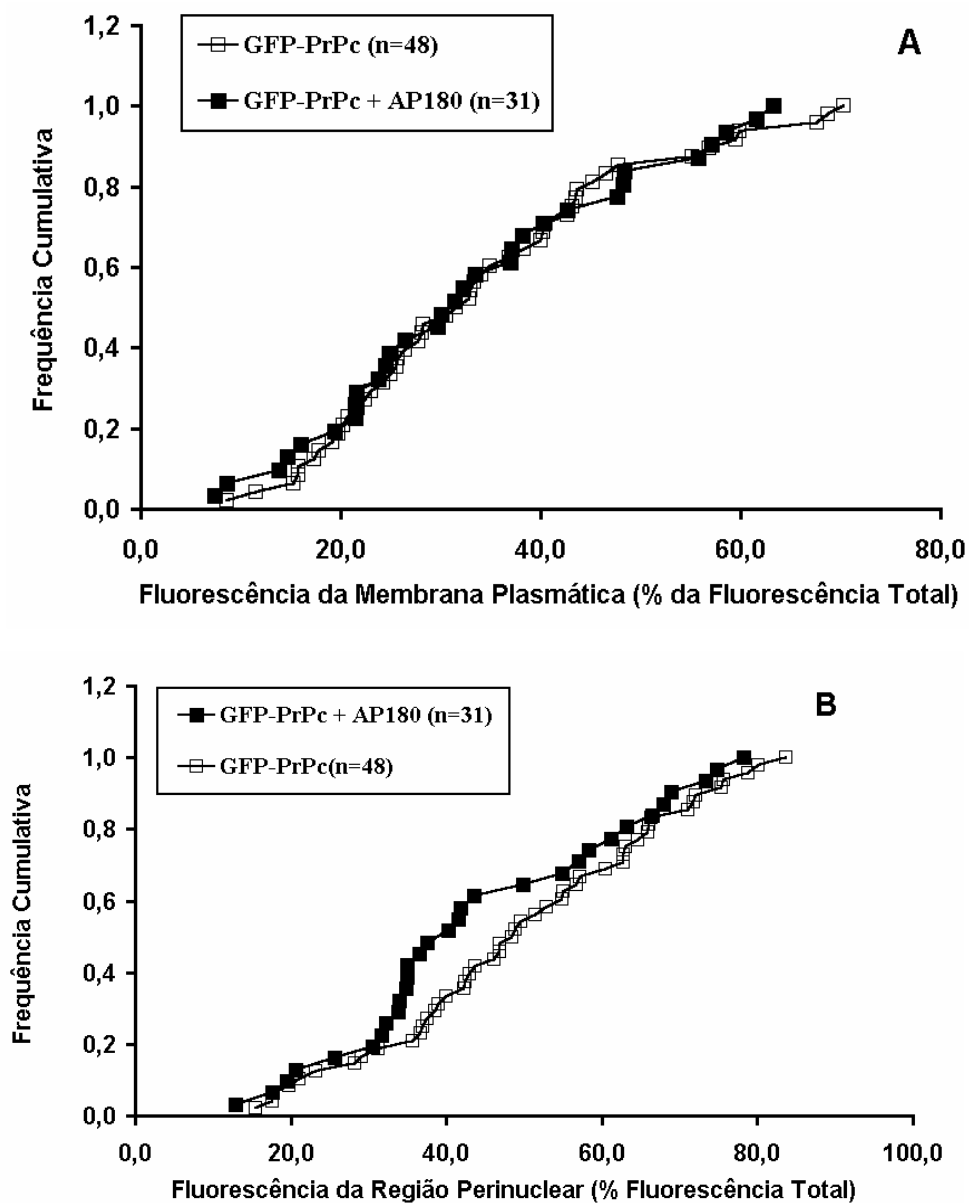


Fig. 21: Gráfico de frequência cumulativa para a distribuição da fluorescência na membrana plasmática (**A**) e na região perinuclear (**B**) de células SN56 transfectadas com GFP-PrP^c (quadrado aberto, n=48) e GFP-PrP^c/AP180 (quadrado fechado, n=31). A distribuição de GFP-PrP^c não foi alterada na presença de AP180-C sugerindo que a clatrina não participe da endocitose constitutiva de GFP-PrP^c. Esta análise foi feita conforme já descrito no item 4.1.

Nestes experimentos, a porcentagem de eficiência de co-transfecção foi avaliada através de imunofluorescência com anticorpos anti-myc, já que a construção AP180-C apresenta este epitopo. Em nossas condições, a eficiência de co-transfecção foi de 95% (dados não mostrados). Para avaliar o envolvimento de AP180-C na endocitose induzida de GFP-PrP^c, também foi feito o ensaio de internalização (Fig. 22) na presença de 500µM de cobre como descrito em ítems anteriores. Este experimento mostrou que a expressão do AP180-C leva a uma redução de cerca de 40% na internalização de GFP-PrP^c nas células expressando GFP-PrP^c e AP180-C em relação ao controle. No entanto, se considerarmos que o AP180-C é capaz de bloquear 75% da endocitose mediada por clatrina (Fig. 20), podemos inferir que o valor de inibição da endocitose de GFP-PrP^c induzida por cobre está subestimado. Normalizando este valor em relação à eficiência do bloqueio da endocitose via clatrina pelo AP180-C, chegamos a uma redução de cerca de 53% na endocitose de GFP-PrP^c em células expressando GFP-PrP^c e AP180 em relação à células expressando apenas GFP-PrP^c. Os dados mostrados no gráfico da Fig. 22 também sugerem que a internalização de GFP-PrP^c induzida por cobre apresente dois mecanismos: um rápido (de 0 a 2 minutos) independente de clatrina e um mais lento (de 2 a 10 minutos) dependente de clatrina.

Além disso, nós também demonstramos em colaboração com Juliana Alves Silva, que GFP-PrP^c ao ser internalizado em resposta ao cobre acumula-se em endossomas positivos para Rab5, sustentando a possibilidade de GFP-PrP^c utilizar a via clássica de clatrina (Magalhães e cols., 2002).

4.7 - Avaliação da expressão de clatrina e caveolina em células SN56:

Os dados acima sugerem que a endocitose de GFP-PrP^c em células SN56 pode envolver mais de um mecanismo. O envolvimento da dinamina e o efeito inibitório parcial de AP180-C sugerem a participação de um mecanismo independente e outro dependente de clatrina. Os mecanismos independentes de clatrina em que a participação da dinamina está descrita até então são caveolae e “rafts”. Portanto, resolvemos avaliar a expressão de clatrina e caveolina 1 (marcadores de mecanismos dependentes de clatrina e caveolae, respectivamente) em células SN56 diferenciadas. Extratos de células SN56 (100µg) e córtex cerebral de rato (100µg) foram incubados com anticorpo contra

a cadeia pesada da clatrina (Transduction Lab) e apresentaram uma banda de 180kDa, que é o tamanho esperado para clatrina. No entanto, caveolina1 não foi detectada por anticorpo específico policlonal (Transduction Lab) em extrato de SN56 (300µg) e foi detectada em extrato de pulmão (20µg), mesmo quando foi usado 15 vezes mais extrato de SN56 que o extrato controle (Fig. 23). Estes dados sugerem que estas células não apresentam o mecanismo de endocitose por caveolae, mas devem apresentar um mecanismo dependente de “rafts”, com participação de dinamina I e independente de clatrina (Pelkmans & Helenius, 2003).

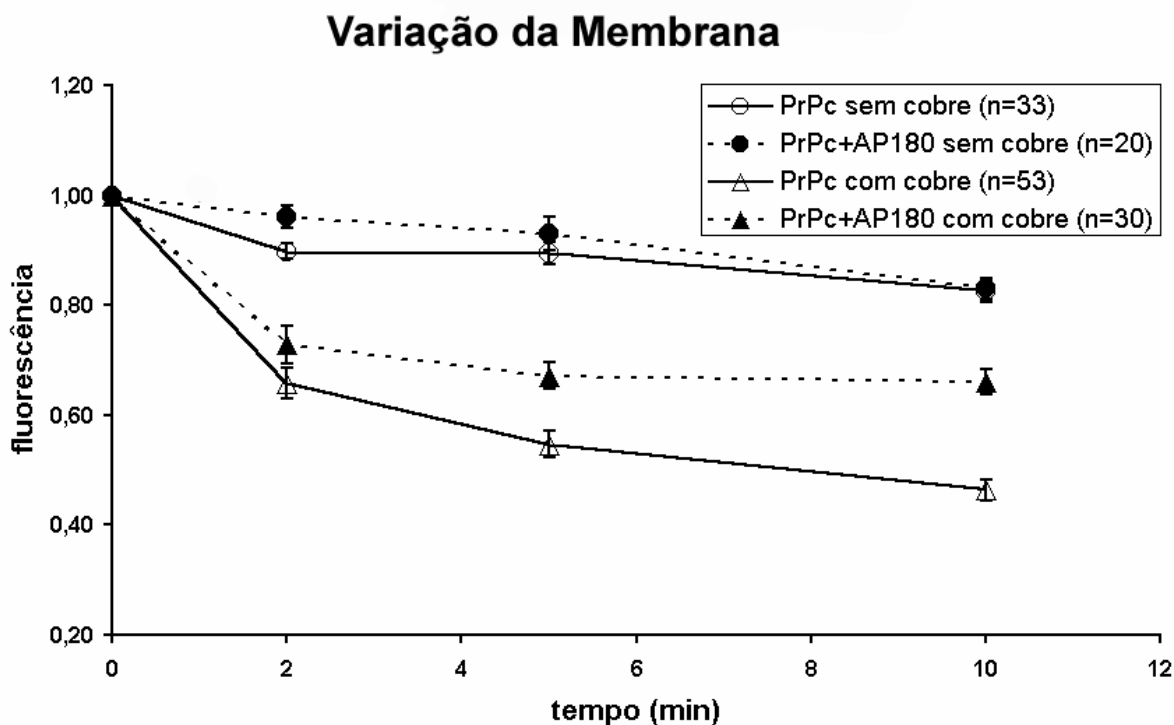


Fig. 22: Ensaio de internalização em células expressando apenas GFP-PrP^c ou GFP-PrP^c e AP180-C na presença de cobre (500 μ M). O gráfico representa a variação da fluorescência normalizada na membrana durante a perfusão. Células transfectadas somente com GFP-PrP^c perfundida em MEM sem cobre (círculo aberto, n=33), células co-transfectadas com GFP-PrP^c e AP180-C perfundidas em MEM sem cobre (círculo fechado, n=20), células transfectadas somente com GFP-PrP^c perfundida em MEM com cobre (triângulo aberto, n=53) e Células co-transfectadas com GFP-PrP^c e AP180-C perfundida em MEM com cobre (triângulo fechado, n=30). As barras representam o erro padrão da média.

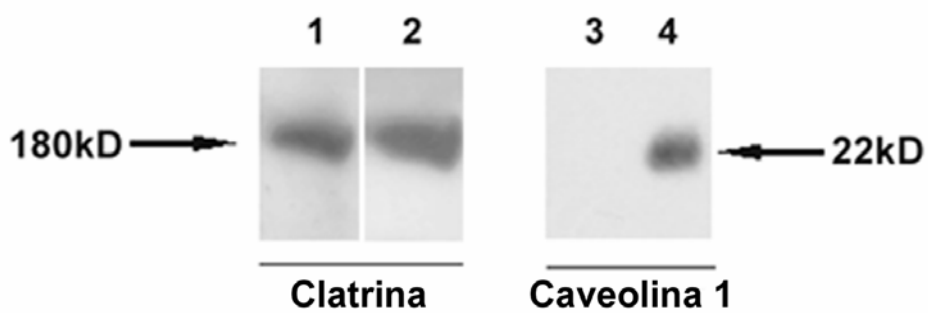


Fig. 23: Imunoblot de clatrina e caveolina 1 em células SN56 diferenciadas. Canaleta 1 e 3 indicam extrato de células SN56. Canaleta 2 indica córtex cerebral de rato e canaleta 4 indica extrato de pulmão. Nas canaletas 1 e 2, foi usado anticorpo anti-clatrina e nas canaletas 3 e 4, foi usado anti-caveolina.

4.8 – Infecção de células SN56 com PrPres fluorescente:

PrPsen e PrPres são bastante diferentes em relação à propriedades biofísicas, meia-vida e distribuição celular e portanto o tráfego intracelular destas duas moléculas pode ser completamente diferente. No processo de infecção, estas duas moléculas têm que se associar para induzir a conversão de PrPsen para PrPres, porém a localização subcelular deste processo ainda não foi definida. O tráfego de PrPsen estudado nesse trabalho pode informar possíveis sítios subcelulares onde a associação destas duas isoformas poderia ocorrer levando à conversão e formação de novas moléculas de PrPres. A capacidade de invadir as células e espalhar pelo sistema nervoso central são fatores críticos para a infecção por prion e desenvolvimento das doenças. No entanto, existem poucas informações de como esta proteína infecta uma célula e é transferida entre elas. Na tentativa de elucidar os eventos relacionados à infecção, tráfego e propagação desta molécula, nós utilizamos PrPres purificado conjugado ao corante fluorescente alexa568 (Molecular Probes). Desta forma, diferentes cepas de PrPres de camundongo (Chandler e 87V), uma cepa de PrPres de hamster (263K) e ainda fração microsomal purificada de cérebro de camundongo normal e infectado com Chandler (Ch microsomas) foram conjugados com a molécula fluorescente (Fig. 24). As principais bandas reconhecidas pelo anticorpo anti-PrP apresentaram fluorescência indicando que a reação de conjugação com alexa 568 foi eficiente.

Células SN56 foram tratadas com 16ng de PrPres fluorescente por 4 horas e visualizadas durante estas primeiras 4 horas e nos dias seguintes durante um intervalo de pelo menos 5 dias (Fig. 25 e 26). Nas primeiras horas depois da adição de PrPres, as células apresentaram grandes agregados fluorescentes associados a sua superfície. No dia seguinte, os agregados de Chandler PrPres (daqui em diante denominado Ch PrPres) começaram a se fragmentar, se difundindo pela superfície da célula e algumas vesículas contendo PrPres fluorescente foram detectadas dentro das células. A internalização de Ch PrPres e concomitante diminuição de agregados associados à superfície celular foram observadas durante os dias seguintes. Entre 3 e 5 dias, as células apresentaram a maior parte da fluorescência contida em vesículas e estruturas tubulares espalhadas pelo citoplasma. Estas vesículas também se acumularam nas extremidades dos neuritos e cones de crescimentos (setas, Fig. 25). Esta localização é bastante interessante já que os neuritos têm o potencial de formar pontos de contato entre células.

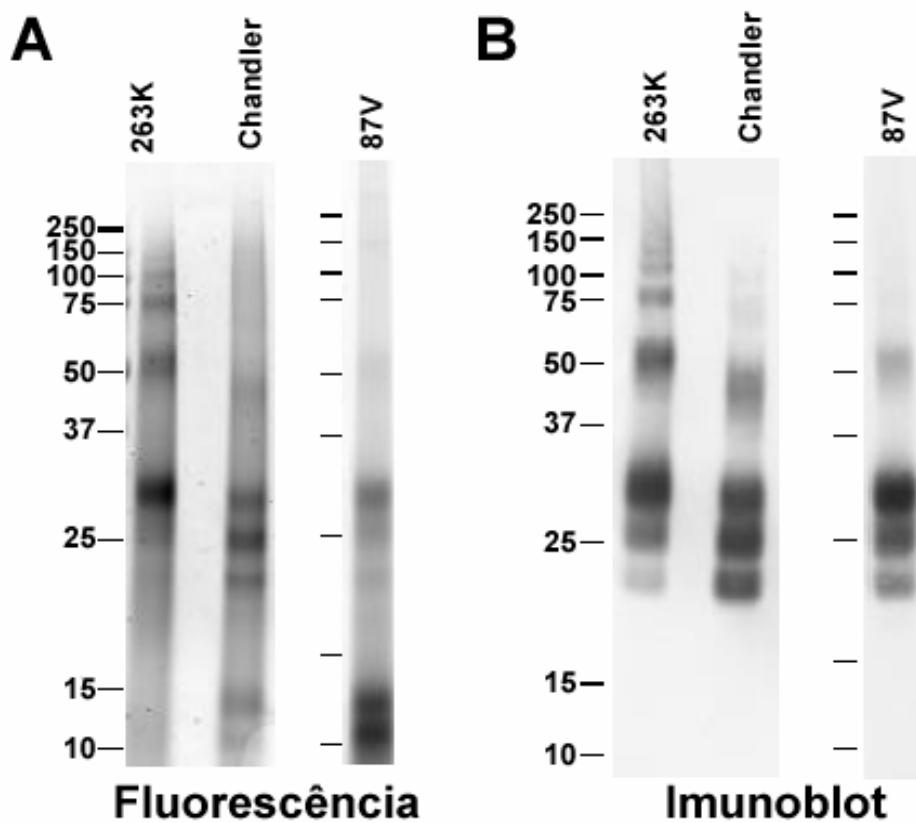


Fig. 24: Fluorescência detectada das amostras de PrPres marcadas com alexa568 e corridas em gel NuPAGE (A), estas proteínas foram transferidas para membrana e em (B) estão as bandas de PrPres detectadas com anticorpo anti-PrP D13.

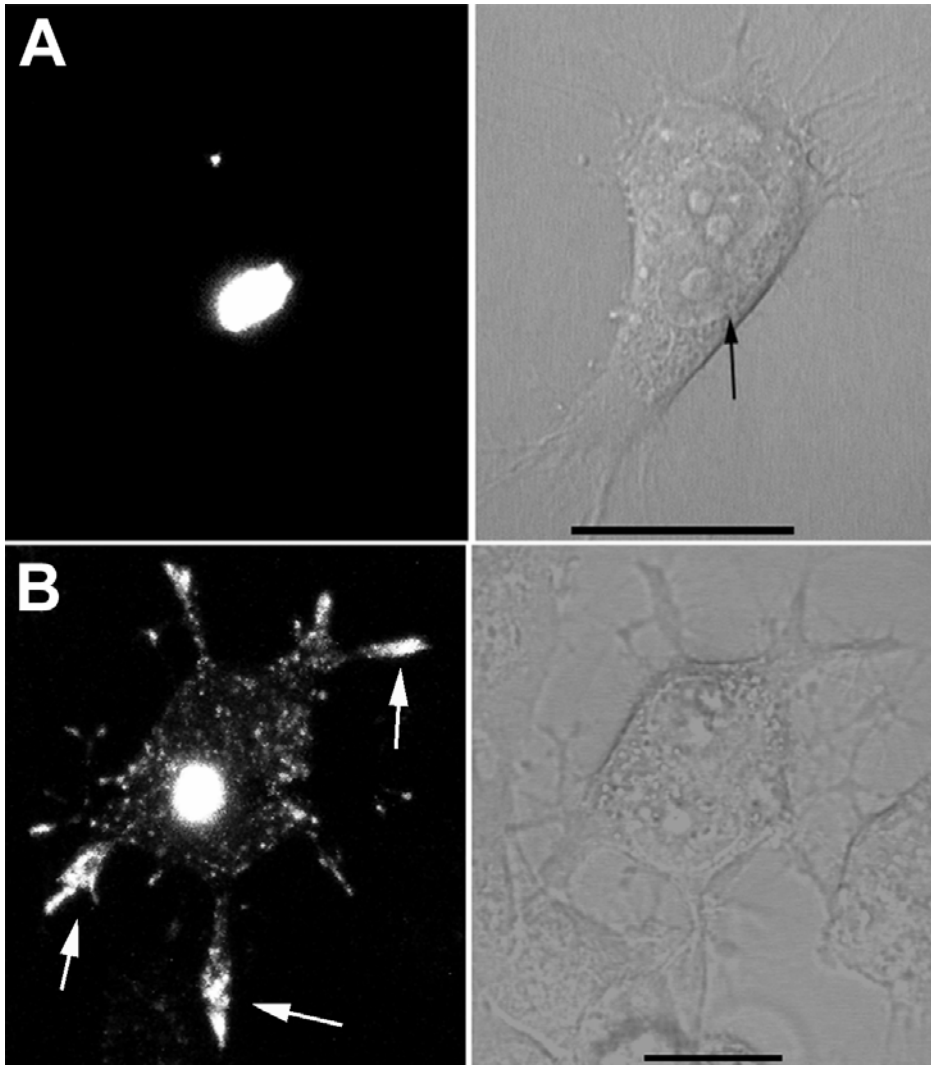


Fig. 25: Células SN56 incubadas com Ch PrPres-alex568. Agregado fluorescente associado à superfície celular poucas horas depois da incubação (A), e após 5 dias a fluorescência se encontra distribuída em vesículas pelo citoplasma e acumuladas na extremidade dos neuritos (B). Barra=20 μ m.

De fato, as vesículas contendo Ch PrPres se movem ao longo do neurito e se acumulam nas extremidades (vídeo 2, CD anexo). Este vídeo mostra que as vesículas fluorescentes no corpo celular são bastante móveis (velocidade variando entre 0.3-5µm/s; mediana = 1.4µm/s; n= 44 vesículas) e podem ser esféricas ou tubulares. Além disso, elas podem apresentar movimento rápido numa direção e bruscamente reverter o movimento para a direção contrária. Outro evento interessante que pôde ser observado neste vídeo é a formação de vesículas a partir do agregado que está sobre a célula. Estas vesículas começam a se formar associadas ao agregado e de repente se desprendem para o interior da célula.

Células tratadas com PrPres 87V e 263K apresentaram grandes agregados fluorescentes na superfície celular nas primeiras horas, assim como Ch PrPres (Fig. 26). No entanto, no dia seguinte poucas células apresentavam PrPres 87V ou 263K em vesículas intracelulares. A maioria das células ainda apresentava agregados associados à superfície celular. No final de 5 dias, apenas 20 e 40% das células apresentaram PrPres 263K e 87V respectivamente, distribuído em vesículas intracelulares contra 70 a 96% das células infectadas com Ch PrPres apresentando esta distribuição no mesmo período. A maior parte das células apresentou agregados associados à superfície celular ou ainda agregados um pouco menores que podiam estar tanto na superfície como no interior da célula, na proximidade da membrana. Estes dados sugerem que as células SN56 são capazes de processar e distribuir Ch PrPres em vesículas intracelulares, mas apresentam uma eficiência reduzida no processamento de agregados de PrPres de 87V e 263K quando comparada com agregados de Ch PrPres.

Para avaliarmos se diferenças no tamanho dos agregados entre estas três cepas poderiam levar a uma diferença na eficiência do processo de fragmentação do mesmo e internalização de PrPres, analisamos a área dos agregados usando o programa ImageJ. Os valores obtidos foram plotados num gráfico de frequência cumulativa que mostrou que os agregados de Ch e 263K apresentam valores de áreas similares, e que os agregados de PrPres 87V apresentam áreas menores. Portanto, estes dados indicam que o tamanho do agregado não seria responsável pela diferença observada, já que duas cepas que apresentam eficiências diferentes no processo (Ch e 263K) não diferem quanto ao tamanho dos agregados (Fig. 27).

Estes resultados são bastante interessantes já que as duas cepas com menor eficiência de internalização e tráfego em SN56 não são capazes de causar infecção prolongada nestas células. PrPres 263K é uma cepa de hamster e portanto é incapaz de

infectar células de camundongo devido à barreira espécie e PrPres 87V, apesar de ser uma cepa de camundongo, tem sua habilidade de infecção associada a presença de um determinado alelo de PrP no hospedeiro. Células SN56 são células de camundongo suscetíveis a infecção por Ch PrPres e resistentes a 87V PrPres (Baron e cols., dados ainda não publicados), sugerindo que o tráfego destas moléculas poderia estar relacionado ao processo infeccioso.

Interessantemente, todas as amostras de PrPres (Ch, 87V e 263K) puderam ser visualizadas em células SN56 mesmo 12 dias depois do tratamento, embora fracamente, provavelmente devido a resistência destas moléculas à proteólise.

Já havia sido demonstrado que PrPres associado a membranas apresenta maior eficiência de infecção (Baron e cols., 2002) e por isso resolvemos avaliar como as células SN56 processam e internalizam PrPres contido em microsossomos. Para isto, microsossomos purificados a partir de cérebro de camundongo normal ou infectado com PrPres Chandler foram marcados com corante fluorescente e adicionados às células. Vale ressaltar que nestas amostras, a maior parte das proteínas fluorescentes não está relacionadas a PrPres e na verdade, a quantidade real de PrPres é mínima. De fato, amostras de microsossomos normal e infectado foram usados para precipitar PrPres e este não pode ser detectado em nenhuma delas (Baron, GS; dados não mostrados).

As células tratadas com microsossomos de Ch PrPres apresentaram várias estruturas fluorescentes enormes provavelmente resultante da associação de microsossomos e também muitas vesículas intracelulares já nas primeiras horas de incubação (Fig. 28). Com 24 horas, as células já apresentavam a maioria da fluorescência distribuída em vesículas intracelulares e acumulada em neuritos, como visto em células tratadas com Ch PrPres após 3 dias. A alta eficiência em internalizar e se distribuir em células SN56 observada para microsossomos pode ser devido às membranas microsossomais se fundirem facilmente à membrana celular e também porque as estruturas formadas pelos microsossomos provavelmente não são tão compactas como os agregados de PrPres. Nenhuma diferença óbvia no comportamento de microsossomos normais ou infectados em células SN56 foi observada, coerente com a composição predominante de proteínas não relacionadas a prion. Tanto os microsossomos provenientes de animal normal quanto de animal infectado permaneceram em cultura por pelo menos 10 dias, embora a intensidade da fluorescência das vesículas e o número de estruturas compostas por microsossomos associados tenham diminuído neste período. Isto ocorre provavelmente devido a grande quantidade de microsossomos associados que permanecem em cultura

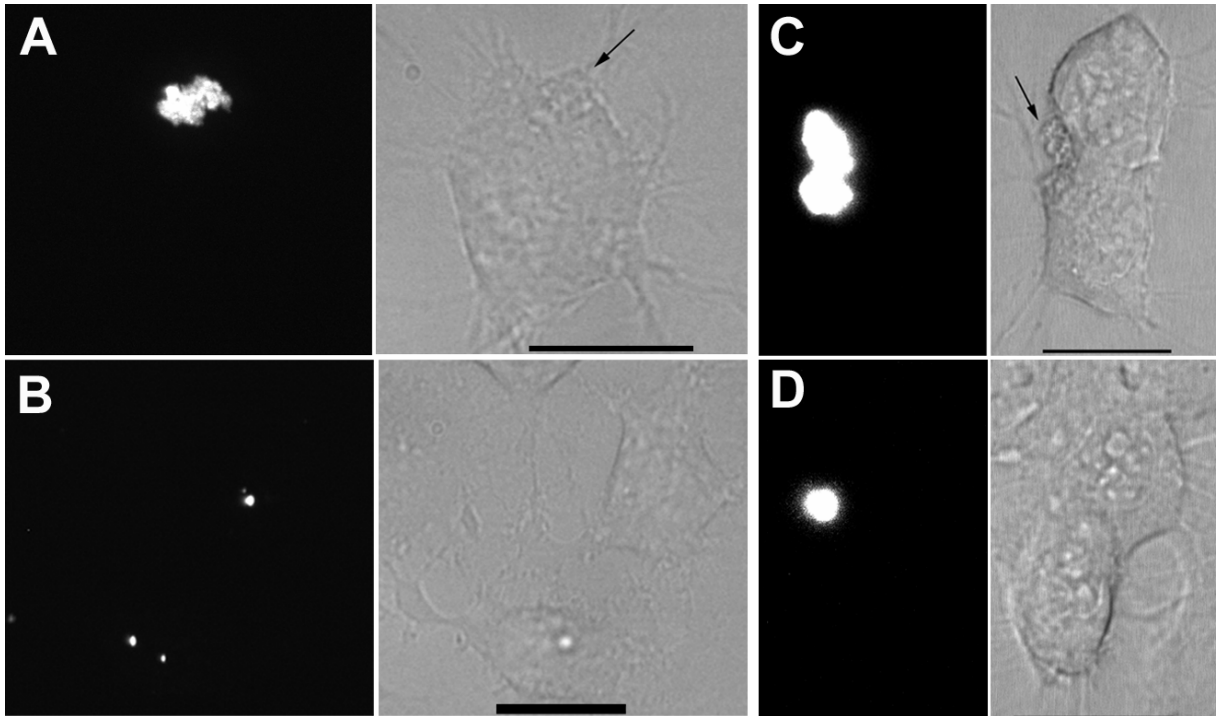


Fig. 26: Células SN56 incubadas com 87V e 263K PrPres-alexa568. Agregado fluorescente de 87V PrPres-alexa568 associado à superfície celular poucas horas depois da incubação (A), e após 3 dias as células não apresentam vesículas distribuídas pelo citoplasma e ainda apresentam pequenos agregados (B). Em (C), um agregado de 263K PrPres-alexa568 sobre as células e depois de 4 dias (D), as células não apresentam vesículas e estão associadas à pequenos agregados. Barra=20 μ m.

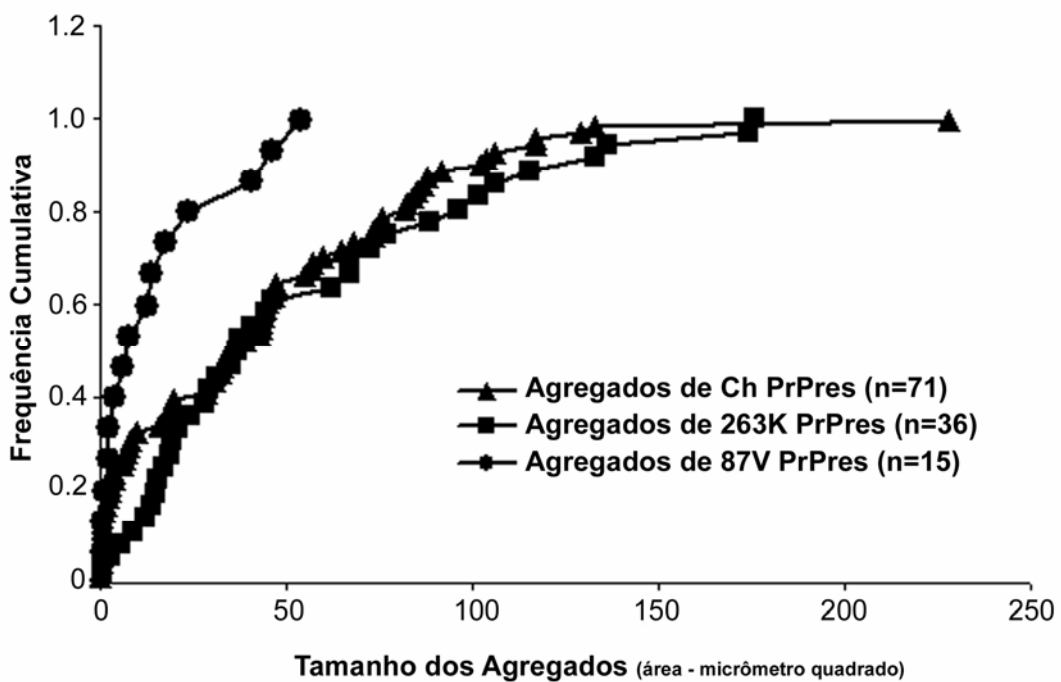


Fig. 27: Gráfico de frequência cumulativa para a distribuição dos valores da área dos agregados entre diferentes cepas. PrPres Ch e 263K apresentaram tamanhos de agregados bem parecidos, enquanto 87V PrPres apresentaram agregados menores que as outras duas cepas.

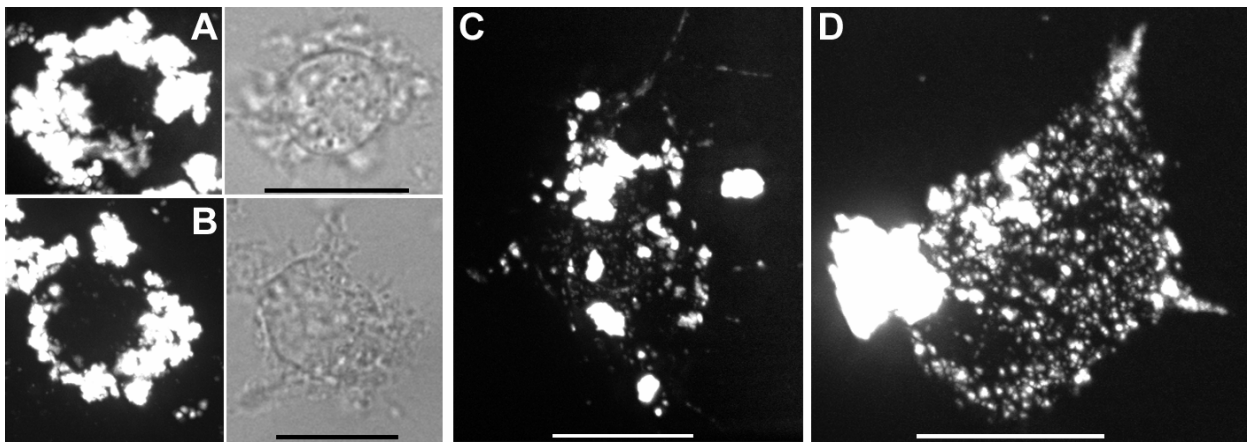


Fig. 28: Células SN56 incubadas com microsossomos-alexa568 de cérebro de camundongos normais e infectados com Chandler. Nas primeiras horas, grandes estruturas, provavelmente microsossomos associados, se depositam sobre às células (**A e B**), e após 4 dias as células apresentam vesículas distribuídas pelo citoplasma e ainda apresentam estruturas grandes associadas à superfície (**C e D**). Células tratadas com microsossomos purificados de cérebro de camundongo sadio (**A e C**) ou microsossomo de cérebro de camundongo infectado com Chandler (**B e D**). Barra=20 μ m.

neste período e portanto, representam fonte constante de material fluorescente a ser endocitado.

Para verificar se a adição da molécula alexa568 tinha algum efeito na infectividade destas amostras, as células SN56 tratadas com PrPres fluorescente foram repicadas por várias passagens para diluir o PrPres adicionado inicialmente e então foram testadas quanto à formação de novas moléculas de PrP resistentes a proteínase K. Após 6 passagens, o PrPres fluorescente adicionado às células foi diluído o suficiente para não ser detectado por imunoblot. Após 13 passagens, as amostras de células tratadas com Ch PrPres e Ch microsossomos apresentaram bandas fracas correspondentes a PrPres. A quantidade de PrPres detectada nestas células após 23 passagens aumentou consideravelmente indicando que Ch PrPres-alexa568 e Ch microsossomos-alexa568 foram capazes de causar infecção prolongada em células SN56 (Fig. 29). A quantidade de PrPres produzida em células infectadas com Ch PrPres e Ch microsossomos foram similares. Entretanto, considerando que a quantidade de Ch PrPres presente na fração de microsossomos era mínima, conclui-se que PrPres associado à membranas apresentou uma alta eficiência de infecção (Baron e cols, manuscrito em preparação). Células infectadas com PrPres 87V e 263K não apresentaram formação de novas moléculas de PrPres, como esperado para estas cepas. Estes dados indicam que a internalização e o tráfego de PrPres em SN56 foi coincidente com o estabelecimento de infecção, caracterizada pela formação de novas moléculas de PrPres.

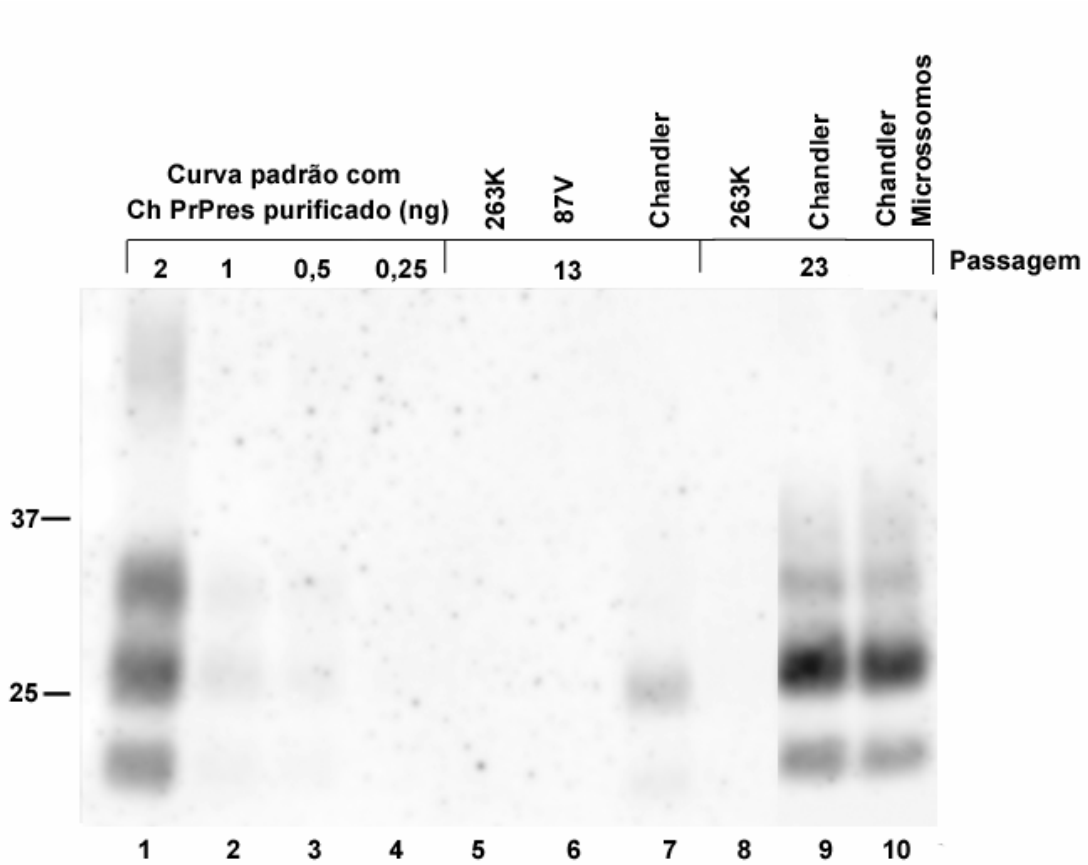


Fig. 29: Células SN56 tratadas com Ch PrPres-alexa568 e Ch microsossomos-alexa568 produzem PrPres persistentemente (canaletas 7, 9 e 10). 87V e 263K PrPres não foram capazes de causar infecção nestas células (canaletas 5, 6 e 8).

4.9 – Tratamento de células SN56 com diferentes fibrilas:

Para avaliar como as células SN56 processam outros tipos de amilóides, fibrilas preparadas “in vitro” a partir de PrP recombinante de camundongo e peptídeos β 1-42 de Alzheimer foram conjugados a alexa568. Foram adicionadas às células quantidades destas amostras com fluorescência equivalente àquela contida na amostra de 16ng de Ch PrPres.

Células tratadas com fibrilas de PrP recombinante (Fig. 30) apresentaram grandes agregados fluorescentes associados à superfície celular nas primeiras horas, e no dia seguinte a maior parte das células apresentou vesículas fluorescentes espalhadas no citoplasma. Estas vesículas também se acumulavam em neuritos e cones de crescimento. Em poucas células, acúmulo numa região perinuclear também foi detectado.

Fibrilas de peptídeos β 1-42 se apresentaram como agregados bem pequenos que se associaram à superfície celular nas primeiras horas (Fig 30). No dia seguinte, a maior parte da fluorescência estava contida em vesículas espalhadas no interior das células.

Estes dados mostram que diferentes agregados podem compartilhar a mesma via de internalização que PrPres em SN56, sugerindo que um mecanismo pouco específico deve estar envolvido neste processo.

4.10 – Localização intracelular de Ch PrPres – alexa568:

A localização de PrPres em vesículas nos leva a questionar quais organelas celulares acumulam a partícula infecciosa. Para isto, resolvemos estudar o tráfego de Ch PrPres, já que este era capaz de causar infecção. Apesar de Ch microssomos também causar infecção e provavelmente com mais eficiência, não analisamos o seu tráfego já que a maior parte das proteínas marcadas não correspondem a PrPres, o que dificultaria a interpretação dos dados.

Na tentativa de identificar as estruturas intracelulares positivas para Ch PrPres-alexa 568, nós fizemos experimentos de dupla marcação com vários marcadores de organelas celulares. Como PrPres está presente em “rafts”, nós usamos a toxina da cólera-alexa488 como marcador de “rafts” e endocitose dependente destes domínios.

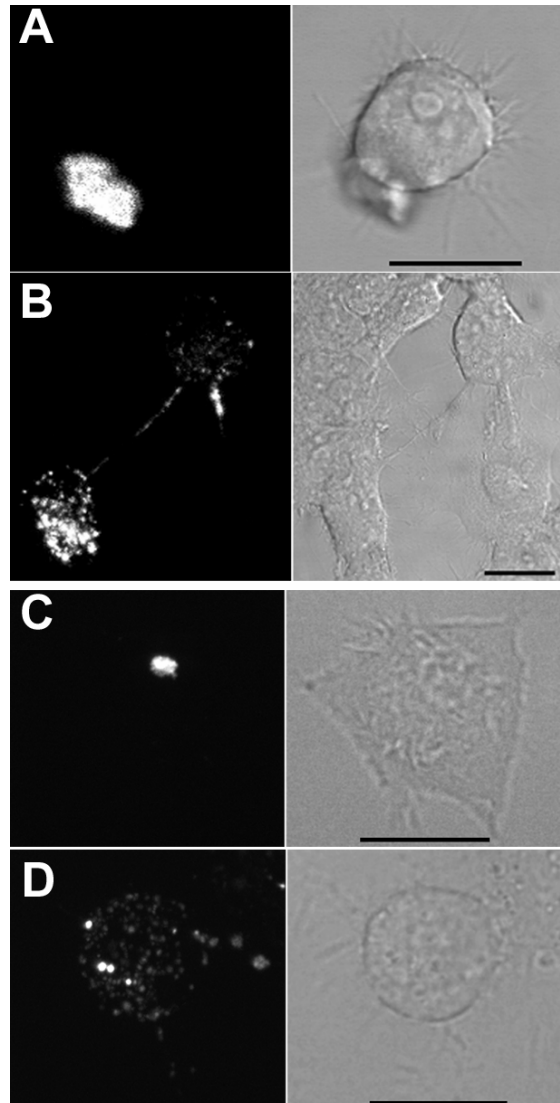


Fig. 30: Células SN56 incubadas com fibrilas de PrP recombinante e fibrilas de peptídeos β 1-42. Agregado fluorescente de PrP recombinante associado à superfície celular poucas horas depois da incubação (A), e após 2 dias as células apresentam vesículas distribuídas pelo citoplasma (B). Em (C), um agregado de fibrilas de peptídeos β 1-42 associado à célula e depois de 3 dias (D), as células apresentam vesículas distribuídas pelo citoplasma. Barra=20 μ m.

Não houve colocalização entre PrPres em vesículas intracelulares e vesículas contendo a toxina da cólera (Fig. 31A e vídeo 3). Muitas vezes vesículas positivas para PrPres se movimentam lado a lado a vesículas positivas para toxina da cólera sem se fundirem (vídeo 3) evidenciando a localização distinta destas duas moléculas em células SN56.

Como PrPsen pode ser detectado em vesículas positivas para transferrina (Magalhaes e cols., 2002; Brown & Harris, 2003; Sunyach e cols., 2003), também avaliamos se PrPres ao ser internalizado pode ser direcionado para a via clássica dependente de clatrina. Nestes experimentos usamos transferrina (marcador da endocitose dependente de clatrina) conjugada a molécula fluorescente alexa488 para marcar células infectadas com Ch PrPres. Nenhuma colocalização entre estas moléculas foi observada (fig. 31B). Estes dados sugerem que Ch PrPres acumula-se em organelas distintas daquelas envolvidas na internalização dependente de “raft”, ou na via clássica dependente de clatrina após sua internalização. Entretanto, como a marcação com estes marcadores ocorre no mínimo 2 dias após a adição de Ch PrPres-alexa568 (tempo mínimo necessário para que ocorra distribuição de PrPres em vesículas) pode haver uma falta de sincronização entre estes eventos. Por outro lado, algumas células apresentam agregados de Ch PrPres-alexa568 em sua superfície durante os quatro primeiros dias, sugerindo uma internalização contínua desta molécula neste período. Neste caso, se uma destas vias estivesse envolvida, uma colocalização pelo menos parcial com um destes marcadores deveria ser observada.

Como Ch PrPres-alexa568 se acumula em vesículas nas extremidades dos neuritos, resolvemos avaliar se ele está presente em vesículas sinápticas positivas para GFP-VACHT (Fig. 32). Esta construção corresponde ao transportador vesicular de acetilcolina em fusão com GFP e se localiza em endossomas primários e de reciclagem no corpo celular e vesículas sinápticas nas extremidades dos neuritos (Santos e cols., 2001; Barbosa Jr e cols., 2002). As vesículas positivas para Ch PrPres-alexa568 não colocalizaram com o marcador de vesículas sinápticas na extremidade dos neuritos e nem com endossomas no corpo celular, confirmando os dados obtidos com transferrina em que colocalização com endossomas não foi detectada.

Já que Ch PrPres-alexa568 não se acumulou em endossomas da via clássica de clatrina, nem vesículas provenientes da endocitose dependente de “rafts” ou vesículas sinápticas, resolvemos tentar marcadores de organelas ácidas, como por exemplo o lisotracker (Fig. 33B). Esta sonda se associa à endossomas tardios e lisossomas devido ao pH ácido. Vesículas marcadas com Lisotracker apresentaram alta colocalização com

vesículas contendo Ch PrPres-alexa568 indicando que após internalização em células SN56, estas moléculas são direcionadas para endossomas tardios e lisossomas. Fibrilas de peptídeos β 1-42, depois de internalizadas também colocalizam em vesículas positivas para lisotracker (Fig. 33C).

Para confirmar a identidade de vesículas contendo PrPres, resolvemos marcar células infectadas com dextran-alexa488 (Fig. 33A). Dextran é um marcador de fase fluida que após endocitose é direcionado para endossomas tardios e lisossomas (revisto por Swanson & Watts; 1995; Pelkmans & Helenius, 2003). Ch PrPres-alexa568 também apresentou colocalização com dextran confirmando que PrPres é direcionado para endossomas tardios e lisossomas (Fig. 33A, vídeo 4).

Como a fluorescência de Ch PrPres-alexa568 se acumula em endossomas tardios e lisossomas, resolvemos avaliar se o corante livre poderia se acumular nestas organelas pelo período de 5 a 10 dias, considerando a hipótese da proteína Ch PrPres-alexa568 ser degradada. No entanto, mesmo usando uma quantidade de corante 1000 vezes maior que a presente nas amostras de PrPres, a marcação em células SN56 foi praticamente nula (Fig. 34). Além disso, extrato de células SN56 após 4 dias de infecção foi corrido em gel NuPAGE e bandas de PrPres foram detectadas, indicando que a fluorescência visualizada neste período se deve principalmente a PrPres intacto, portanto não existe a possibilidade de estarmos visualizando resíduos fluorescentes provenientes da degradação de PrPres (dados não mostrados). Bandas correspondentes a PrPres intacto também foram observadas 4 dias após infecção de células SN56 com prion da cepa 22L (outra cepa de camundongo). Esta cepa também foi capaz de infectar células SN56 de maneira similar a cepa Chandler, se distribuindo em vesículas pela célula e causando a formação de novas moléculas de PrPres (Dados obtidos em colaboração com Kil Sun Lee – Magalhães e cols., manuscrito em preparação).

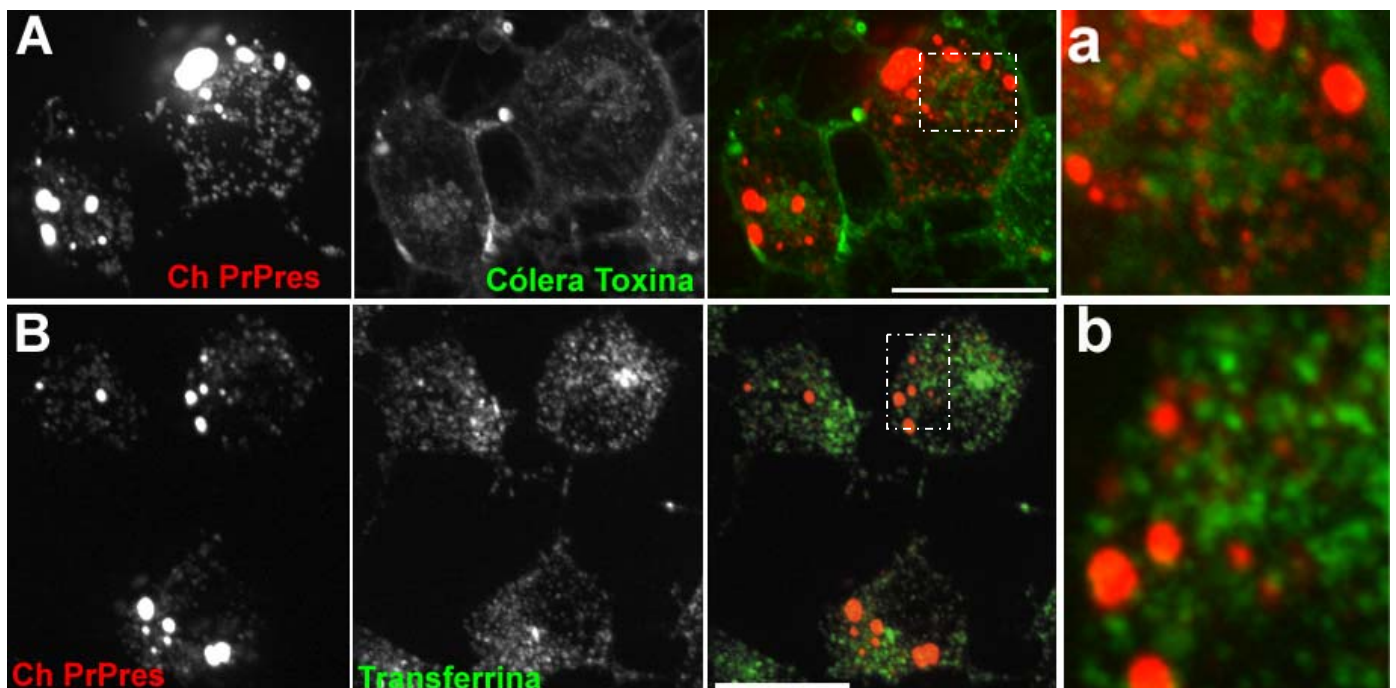


Fig. 31: Células SN56 infectadas com Ch PrPres-alexa568 e marcadas com Cólera toxina (A) e transferrina (B). A sobreposição das imagens mostra que não houve colocalização entre os marcadores e Ch PrPres-alexa568. Em (a) e (b) uma região de cada célula está ampliada pra evidenciar a falta de colocalização. Barra=20 μ m.

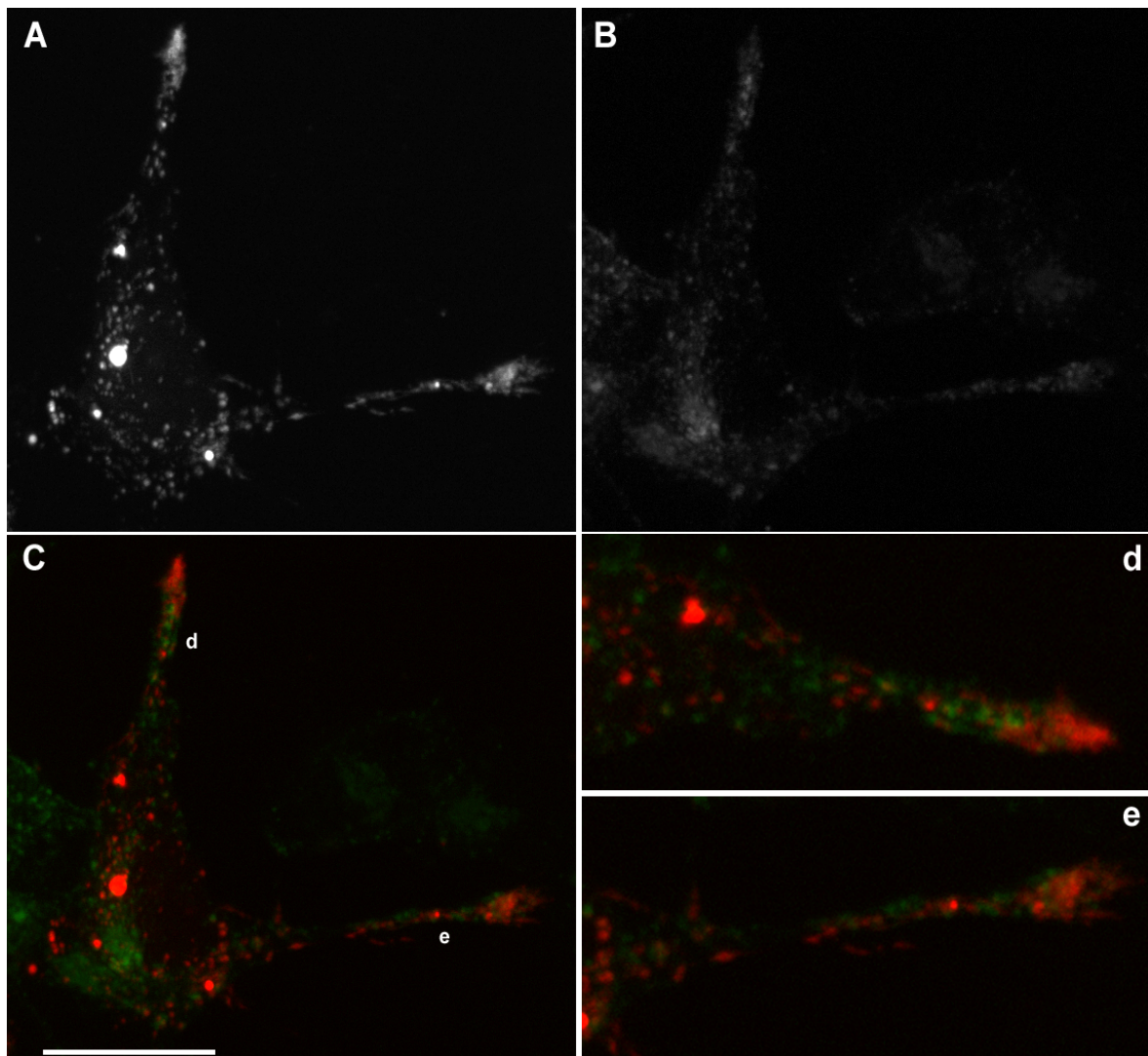


Fig. 32: Células SN56 transfectadas com GFP-VACHT e infectadas com Ch PrPres-alexa568. Em (A), Ch PrPres-alexa568 está distribuído pela células. Em (B), GFP-VACHT se acumula numa região perinuclear, endossomas próximos à membrana e neuritos. A sobreposição das imagens mostra que não houve colocalização entre GFP-VACHT e Ch PrPres-alexa568 (C). Em (d) e (e) os neuritos estão ampliados mostrando que não há colocalização. Barra=20 μ m.

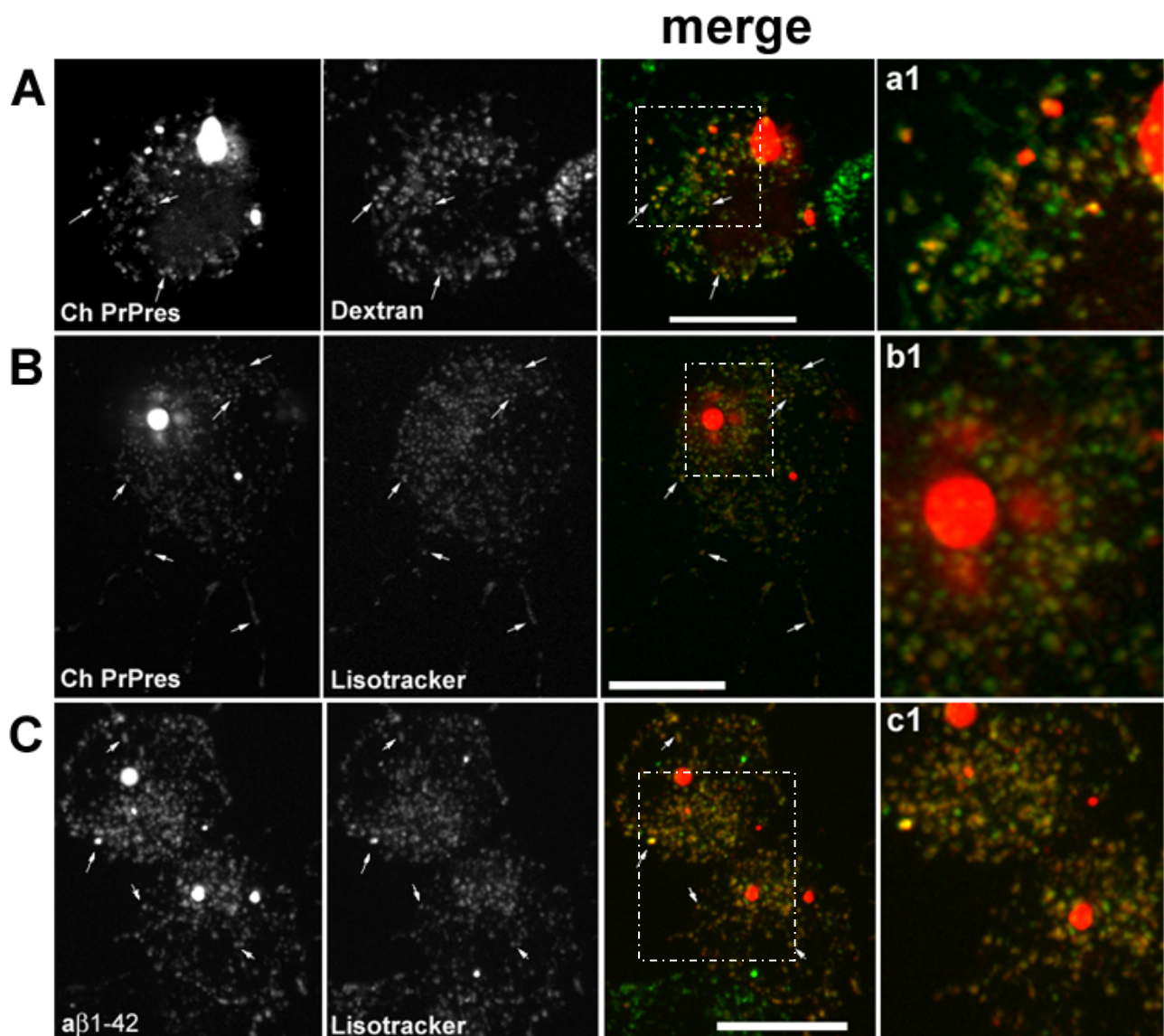


Fig. 33: Células SN56 infectadas com Ch PrPres-alexa568 e marcadas com dextran (A) e lisotracker (B) ou tratadas com fibrilas de peptídeos $\alpha\beta 1-42$ e marcadas com lisotracker (C). A sobreposição das imagens mostra que houve uma boa colocalização entre os marcadores e Ch PrPres-alexa568 ou $\alpha\beta 1-42$. Em (a1), (b1) e (c1) representam uma região ampliada de cada célula pra evidenciar a colocalização. Barra=20 μm .

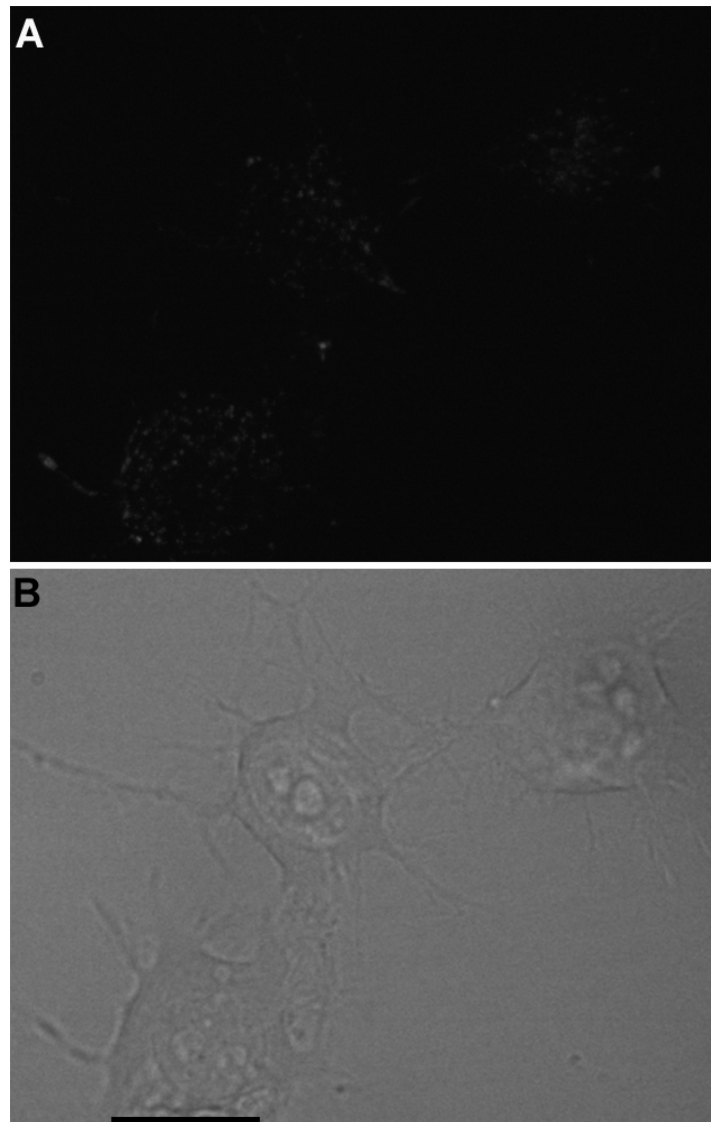


Fig. 34: Células SN56 marcadas com corante alexa 568 livre (A) e imagem de luz transmitida (B). As células SN56 apresentaram sinal fraco quando marcadas com um excesso de 1000 vezes em relação às amostras de PrPres. Barra=20 μ m.

Rab 7 é uma GTPase que se concentra em membranas de endossomas tardios e lisossomas, constituindo um marcador bastante útil para estas organelas. O mutante Q67L gera uma molécula constitutivamente ativa que promove a fusão homotípica destas organelas e como resultado desta fusão, as células apresentam endossomas tardios e lisossomas bem maiores. Para confirmarmos a presença de Ch PrPres-alexa568 em endossomas tardios e lisossomas, nós usamos o mutante constitutivamente ativo de Rab7 etiquetado com GFP (GFP-Rab7 Q67L) como marcador destas organelas. Células SN56 foram transfectadas com esta construção e infectadas com Ch PrPres-alexa568 (Fig. 35). As células apresentaram endossomas de tamanho aumentado contendo PrPres fluorescente (Fig. 35a - setas). Além disso, vesículas positivas para GFP-Rab7 mutante se distribuíram pela célula acumulando em neuritos e cones de crescimento (Fig. 35c - setas). Praticamente todas as vesículas positivas para Ch PrPres-alexa568 colocalizaram com vesículas positivas para Rab7 mutante. Outro dado interessante observado foi que grandes agregados fluorescentes foram internalizados pelas células (Fig. 35b – setas) e foram direcionados para vesículas positivas para Rab7 mutante, indicando que a via de internalização usada além de pouco específica como já mostrado, permite a endocitose de partículas grandes.

Juntos, estes dados mostram que agregados de Ch PrPres-alexa568 se associam à superfície celular, são internalizados por um mecanismo pouco específico independente de clatrina ou “rafts” e em seguida, PrPres é direcionado para endossomas tardios e lisossomas.

4.11 – Mutantes de Rab 7 e formação de PrPres em células N2a:

Os dados de infecção de células SN56 com Ch PrPres fluorescente indicam que estas moléculas se acumulam em lisossomas e endossomas tardios. Então, resolvemos avaliar o papel destas organelas na formação de PrPres em células N2a infectadas com uma outra cepa de PrPres de camundongo, a 22L (N2aPS/22L). As células N2a foram usadas nestes experimentos pois constituem um modelo clássico de células em cultura infectadas por prion e já haviam sido usadas com sucesso em experimentos similares avaliando o papel de Rab4 e Rab6 no processo de formação de PrPres (Béranger e cols., 2002). Para isso, estas células foram transfectadas com construções codificando Rab 7 selvagem e os mutantes Rab 7 Q67L, constitutivamente ativo e o Rab 7 T22N,

dominante negativo e como controle, as células foram submetidas ao protocolo de transfecção na ausência de DNA. As células transfectadas foram mantidas em meio completo e após 4 dias, quando apresentavam uma confluência de cerca de 90%, as células foram lisadas. A quantidade de proteína total nos extratos das células transfectadas foi avaliada e quantidades idênticas de proteína total de cada extrato foram tratadas com proteinase K. PrPres foi precipitado a partir de cada amostra através do método PTA (seção 3.8) e submetido a eletroforese em gel NuPAGE (Invitrogen) (Fig. 36). O resultado de 3 experimentos independentes mostram que células expressando Rab 7 selvagem apresentaram em média um aumento na formação de PrPres de cerca de 30% em relação ao controle sem DNA. Células expressando o mutante constitutivamente ativo Q67L também apresentaram um aumento discreto na formação de PrPres (cerca de 10%) embora a média dos experimentos indique que esta diferença não foi significativa. Já as células expressando o dominante negativo Rab7 T22N apresentaram uma redução de cerca de 24% na formação de PrPres quando comparada ao controle sem DNA (Fig. 37). Estes dados sugerem que o tráfego por endossomas tardios e lisossomas pode ser importante no processo de formação de PrPres.

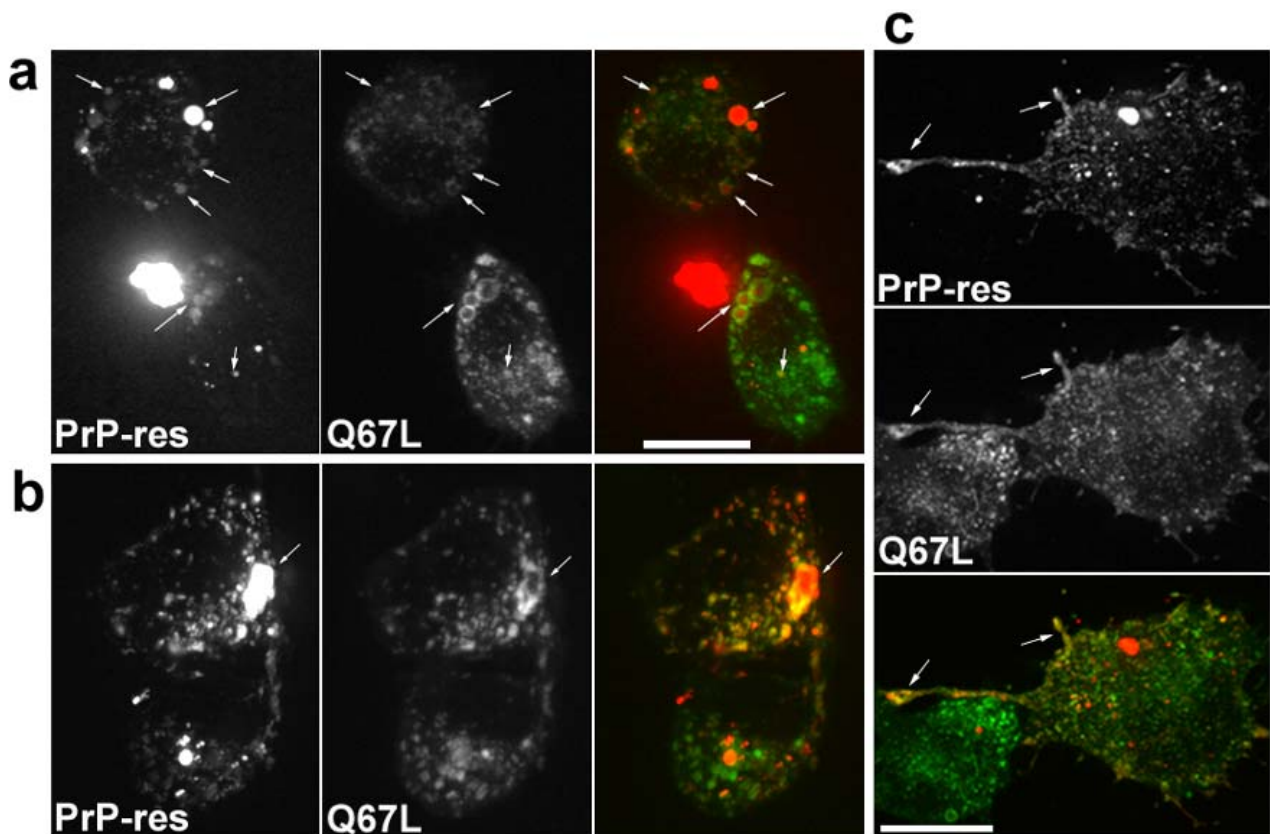


Fig. 35: Células SN56 transfectadas com GFP-Rab 7 Q67L e infectadas com Ch PrPres-alexa568. Em (A), células apresentam grandes endossomas tardios e lisossomas contendo Ch PrPres em seu interior (setas). Em (B), um grande agregado pode ser visto dentro da célula envolto em membranas positivas para Rab 7 mutante (seta). Além disso, estas organelas também se acumulam em neuritos colocalizando com Ch PrPres (C). Barra=20 μ m.

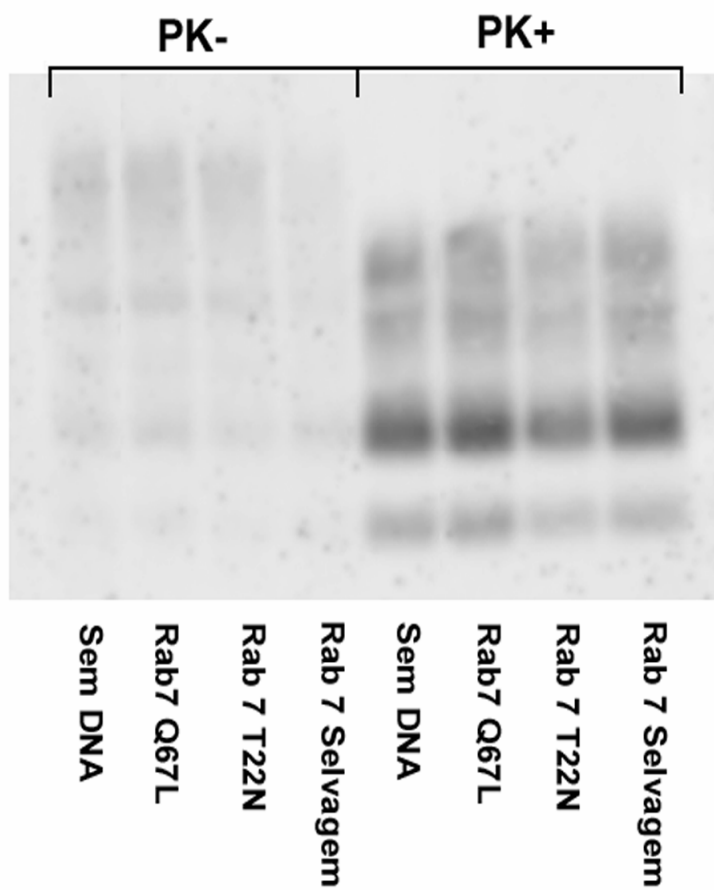


Fig. 36: Produção de PrPres em células N2a infectadas com 22L PrPres e expressando Rab7 e seus mutantes foi avaliada. Células expressando Rab7 selvagem ou o seu mutante constitutivamente ativo (Q67L) apresentaram um aumento discreto na formação de PrPres sugerindo que endossomas tardios e lisossomas podem estar envolvidos neste processo.

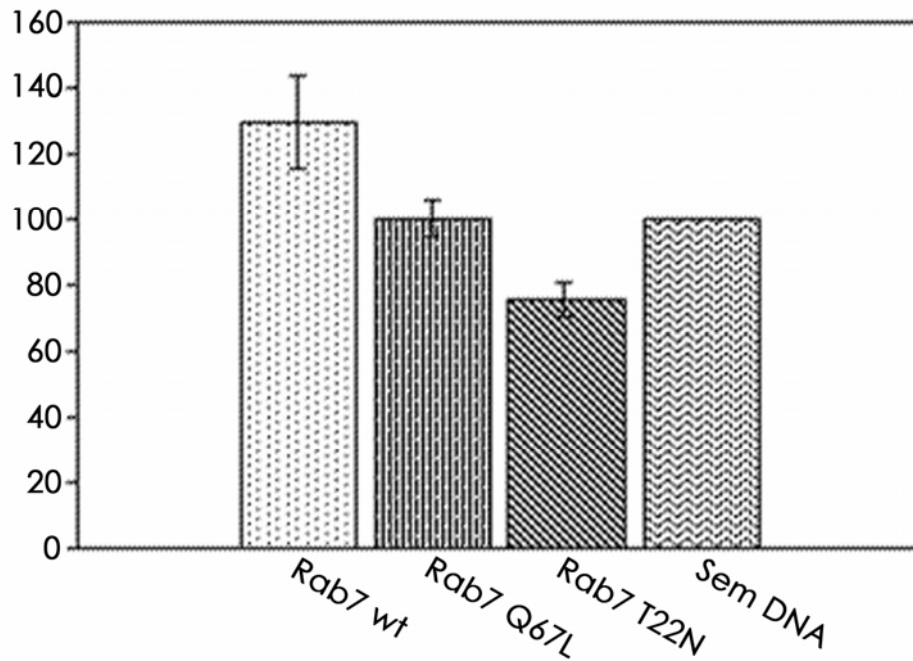


Fig. 37: Gráfico mostrando a quantidade de PrPres produzido em células N2a infectadas com 22L PrPres e expressando Rab 7 ou seus mutantes. Células expressando Rab 7 selvagem apresentaram um aumento na formação de PrPres (30%) e células expressando o dominante negativo Rab7 T22N apresentaram uma redução neste processo (24%). O mutante constitutivamente ativo Rab 7 Q67L embora tenha apresentado aumento discreto (10%) em alguns experimentos, não apresentou diferença significativa em relação ao controle sem DNA. As barras representam o erro padrão da média.

5 – Discussão:

PrP^{sen} ou PrP^c é uma proteína abundante em células neuronais e se apresenta associada à superfície celular através de motivo de GPI (Stahl e cols., 1997; revisto por Prusiner SB, 1998). Na membrana, esta proteína se localiza em “rafts” onde provavelmente exerce a sua função, a qual ainda necessita de ser compreendida integralmente, embora várias possibilidades já tenham sido descritas (Kaneko e cols., 1997; Naslavsky e cols., 1999; Baron e cols., 2002; revisto por Martins e cols., 2002). Esta proteína sensível a tratamento com proteases e constituída principalmente de alfa hélices pode sofrer uma alteração conformacional gerando uma molécula rica em folhas beta (Caughey e cols., 1991; Pan e cols., 1993). Esta isoforma de PrP^{sen} se torna insolúvel em detergentes e resistente a tratamentos com proteases, por isso é denominada PrP^{res} (Caughey e cols., 1990; revisto por Prusiner, 1998). A conversão de PrP^{sen} para PrP^{res} está envolvida no desenvolvimento de várias doenças neurodegenerativas transmissíveis conhecidas como doenças de prion ou TSE (encefalopatas espongiformes transmissíveis). Estas doenças são graves e fatais, caracterizadas por perda neuronal e proliferação de células da glia e podem apresentar origem genética, esporádica ou infecciosa (revisto por Prusiner, 1998; Harris, 1999).

Estas duas isoformas, PrP^{sen} e PrP^{res}, apresentam características biofísicas, localização celular e meia vida bastante distintas apesar de terem a mesma sequência primária de aminoácidos. No entanto, o tráfego intracelular destas moléculas, embora possa seguir vias distintas, deve coincidir em alguma etapa para que haja associação entre elas e formação de novas moléculas de PrP^{res}. Portanto, o estudo do tráfego de PrP^{sen} e PrP^{res} é de extrema importância para o entendimento do papel fisiológico destas duas isoformas e do processo de conversão. Como estratégia para investigarmos o tráfego destas isoformas, usamos moléculas fluorescentes para auxiliar o monitoramento destas proteínas em células vivas de linhagem neuronal SN56.

Uma ferramenta bastante interessante que vem sendo utilizada com sucesso é a expressão da proteína de interesse em fusão com GFP (Green Fluorescent Protein) (Lippincott-Schwartz & Patterson., 2003; Santos e cols., 2001). GFP é uma proteína fluorescente verde descoberta em água-viva que associada à técnicas de biologia molecular (clonagem) e biologia celular (microscopia confocal) têm facilitado o estudo de processos biológicos em células vivas, evitando os artefatos causados pelo uso de

anticorpos e fixação de células e tecidos. Desta forma, a sequência que codifica GFP foi inserida entre a sequência correspondente ao peptídeo sinal e a proteína madura de PrP^c, para evitar que GFP fosse perdido durante as modificações pós traducionais (Lee e cols., 2001). Simultaneamente, outros grupos produziram construções de GFP-PrP^c similares, apresentando diferenças apenas quanto ao posicionamento de GFP sem alteração do comportamento das moléculas expressas (Negro e cols., 2001; Ivanova e cols., 2001; Lorenz e cols., 2002). Lee e cols. (2001) demonstraram que PrP^c apresenta localização idêntica à proteína endógena na membrana plasmática ancorada por GPI e também se acumula numa região perinuclear em células neuronais SN56.

Shyng e cols. (1995) demonstraram que PrP^c de galinha com deleção na região N-terminal apresentava uma deficiência na endocitose e Shmerling e cols. (1998) demonstraram que animais “knockout” para PrP^c expressando esta proteína truncada com deleções na região N-terminal (32 a 121 ou 32 a 134) apresentavam quadros de ataxia e morte neuronal restrita a camada granular do cerebelo. Como estes trabalhos indicaram uma participação importante da região N-terminal no papel fisiológico de PrP^c, resolvemos avaliar a distribuição do mutante de deleção N-terminal (Δ 32 a 121) em células SN56 comparada a proteína selvagem. Para isso, a sequência de PrP^c com deleção entre os aminoácidos 32 e 121 foi clonada em fusão com GFP como descrito anteriormente (seção 3.1; Lee e cols., 2001). Nós verificamos que o mutante GFP-PrP Δ 32-121 apresentou maior acúmulo na membrana plasmática e menor concentração na região perinuclear quando comparado a proteína selvagem GFP-PrP^c, sugerindo que este mutante possa apresentar realmente uma deficiência na endocitose confirmando dados anteriores. De fato, esta deleção compreende o sítio de ligação a cobre localizado entre os aminoácidos 51 a 90 (Hornshaw e cols., 1995; Miura e cols., 1996; Brown e cols., 1997a) e já foi demonstrado que este íon é capaz de induzir a endocitose de PrP^c de galinha (Pauly & Harris, 1998) e camundongo (Lee e cols., 2001; Perera & Hooper, 2001).

A endocitose de PrP^c induzida pelo cobre e dependente da região N-terminal da proteína já havia sido demonstrada por métodos bioquímicos clássicos como o uso de radioisótopos e imunoblots (Pauly & Harris, 1998; Perera & Hooper, 2001), mas a visualização deste processo em células vivas foi alcançada através da etiquetagem desta proteína com GFP. Com esta ferramenta, nós demonstramos que GFP-PrP^c é internalizado após a adição de concentrações micromolares de cobre enquanto que o mutante, GFP-PrP Δ 32-121 não sofre alteração em sua distribuição. Estes resultados

confirmam os dados anteriores indicando que a internalização de GFP-PrP^c é uma resposta específica à presença de cobre e é dependente da região N-terminal. Além disso, demonstram que a proteína de fusão GFP-PrP^c é funcional e uma ferramenta importante no estudo de tráfego de PrP^c.

Os métodos bioquímicos já haviam demonstrado a internalização de PrP^c induzida por cobre, mas a localização subcelular desta proteína após a internalização ainda não havia sido avaliada. Com o uso de GFP-PrP^c, nós verificamos uma diminuição induzida por cobre da fluorescência na membrana e um aumento correspondente da fluorescência numa região perinuclear, indicando que após internalização, GFP-PrP^c é direcionado para compartimentos subcelulares próximos ao núcleo.

A identidade destes compartimentos intracelulares em que GFP-PrP^c e GFP-PrP Δ 32-121 se acumulam próximo ao núcleo foi avaliada através do uso de marcadores para endossomas primários e de reciclagem, como a transferrina e FM4-64 e marcadores de Golgi como Bodipy TR. Nossos resultados indicam que GFP-PrP^c e o mutante GFP-PrP Δ 32-121 se acumulam em endossomas de reciclagem e Golgi (Magalhães e cols., 2002), coerente com dados de outros grupos que também demonstraram PrP^c presente em Golgi (Negro e cols., 2001; Ivanova e cols., 2001; Brown & Harris, 2003) e em endossomas primários e de reciclagem (Laine e cols., 2001; Sunyach e cols., 2003; Brown & Harris, 2003). De fato, quando co-expressamos GFP-PrP^c e o mutante constitutivamente ativo Rab5 Q79L em células SN56, levando à fusão homotípica de endossomas primários e retardando o tráfego de proteínas pela via clássica nesta etapa, pudemos detectar GFP-PrP^c juntamente com transferrina nestes endossomas (Magalhães e cols., 2002).

O mecanismo pelo qual PrP^c é internalizado pelas células ainda não está claro e é alvo de grande discussão. Alguns trabalhos demonstram que PrP^c se encontra em intermediários endocíticos da via clássica dependente de clatrina como endossomas positivos para transferrina e Rab5 (Shyng e cols., 1994 e 1995; Magalhães e cols., 2002; Sunyach e cols., 2003), enquanto outros grupos detectaram esta proteína em domínios caveolae (Vey e cols., 1996; Kaneko e cols., 1997; Naslavsky e cols., 1997; Marella e cols., 2002; Peters e cols., 2003). Dinamina I é uma GTPase importante na fissão de vesículas recém formadas e está envolvida tanto no mecanismo dependente de clatrina (D'Hondt e cols., 2000; McNiven e cols., 2000) como em mecanismos independentes como caveolae e “rafts” (Henley e cols., 1998; Oh e cols., 1998; Pelkmans & Helenius, 2003). O mutante Dinamina I K44A perde a atividade GTPásica e portanto não é capaz

de promover fissão de vesículas recém formadas na membrana. As células expressando este mutante apresentam uma redução na endocitose e um bloqueio no processo de diferenciação (revisto por Schmid & Damke, 1995; McNiven e cols, 2000; Barbosa e cols., 2002). A distribuição de GFP-PrP^c é alterada na presença deste mutante indicando que Dinamina I tem papel importante na endocitose constitutiva de PrP^c. Em células SN56 co-expressando Dinamina I K44A e GFP-PrP^c, esta proteína foi direcionada para estruturas túbulo-vesiculares próximas à membrana, onde ficaram retidas.

No entanto, como GFP-PrP^c é uma proteína ancorada por GPI e não apresenta domínios citoplasmáticos capazes de sinalizar o direcionamento para vesículas positivas pra dinamina I, resolvemos avaliar se o motivo GPI é suficiente para sinalizar esta via. Para isso, co-expressamos GFP-GPI e Dinamina I K44A ou Dinamina selvagem em células SN56. A distribuição de GFP-GPI não foi alterada na presença de Dinamina K44A, indicando que GPI não é responsável pelo direcionamento de proteínas à vesículas positivas para Dinamina. Estes dados sugerem que proteínas ancoradas por GPI podem apresentar diferentes vias de internalização e tráfego, dependentes de sua sequência de aminoácidos e possíveis interações com outras proteínas.

Nosso grupo verificou que dinamina I está envolvida no mecanismo de endocitose constitutiva de PrP^c (Magalhães e cols., 2002) e em seguida resolvemos avaliar o papel desta proteína no mecanismo induzido por cobre. Nossos dados demonstraram que a internalização de GFP-PrP^c por cobre foi abolida na presença do mutante de dinamina, sugerindo que esta proteína também tem papel fundamental na endocitose de PrP^c dependente de cobre.

Como mencionado anteriormente, dinamina I é uma proteína importante em processos de endocitose dependente de clatrina e em alguns independentes como caveolae ou “rafts” (revisto por Pelkmans & Helenius, 2003). Portanto, a participação de dinamina I na endocitose de GFP-PrP^c não esclarece o mecanismo utilizado por esta proteína. Por isso, resolvemos avaliar o papel da clatrina na endocitose de GFP-PrP^c através da participação de AP180, uma proteína adaptadora responsável pelo recrutamento de clatrina para a endocitose. Nós verificamos que a expressão de AP180-C, um fragmento C terminal desta proteína contendo o sítio de ligação a clatrina, é capaz de inibir a endocitose dependente de clatrina em 75% em células SN56 por competição pela ligação a clatrina. Nós também verificamos que estas células, nas condições de diferenciação em que trabalhamos, apresentaram uma expressão razoável da proteína clatrina. GFP-PrP^c não apresentou alteração na sua distribuição constitutiva

em células expressando AP180-C apesar da inibição da endocitose dependente de clatrina. Estes dados sugerem que a endocitose constitutiva de GFP-PrP^c não é exclusivamente dependente de clatrina ou que os 25% restantes da atividade de clatrina são suficientes para manter a taxa normal de endocitose constitutiva de PrP^c nestas células (manuscrito em preparação). Recentemente, Sunyach e cols. (2003) demonstraram que PrP^c está presente em vesículas cobertas por clatrina em cultura primária de neurônios, sugerindo a participação deste mecanismo na endocitose constitutiva de PrP^c nestas células.

A taxa da endocitose de GFP-PrP^c induzida por cobre foi alterada em células SN56 em que a endocitose dependente de clatrina foi inibida. Células expressando AP180-C apresentaram uma redução de cerca de 53% na endocitose induzida por cobre de GFP-PrP^c. Nossos dados sugerem que a curva de internalização de GFP-PrP^c apresenta dois componentes, um rápido e independente de clatrina porém, dependente de dinamina I (inalterado na presença de AP180-C) e um lento dependente de clatrina (53% de inibição na presença de AP180-C). Estes resultados sugerem que a proteína PrP^c apresenta um tráfego intracelular complexo, podendo utilizar diferentes vias de internalização. Mais estudos são necessários para definir se PrP^c internalizada por diferentes mecanismos converge para os mesmos intermediários endocíticos ou ainda, pode seguir por vias intracelulares distintas acarretando talvez uma maior diversidade de funções celulares.

Um mecanismo independente de clatrina e dependente de dinamina I que poderia estar envolvido na endocitose de PrP^c é o caveolae. Este mecanismo requer a presença de caveolina, uma proteína de 22kDa que recobre as vesículas de caveolae gerando um aspecto estriado. Nós verificamos através de métodos bioquímicos que células SN56 diferenciadas não expressam caveolina e portanto, este mecanismo não deve estar envolvido na endocitose de PrP^c independente de clatrina nestas células. No entanto, outro mecanismo como “lipid rafts” que também independe de clatrina e utiliza dinamina I poderia estar envolvido neste processo. De fato, alguns trabalhos demonstram que PrP^c está presente nestes domínios “rafts” (Kaneko e cols., 1997; Naslavsky e cols., 19997; Baron e cols., 2002). Este mecanismo de endocitose é parecido com caveolae, ou seja depende da constituição lipídica da membrana, requer dinamina mas não requer caveolina e aparentemente não apresenta nenhum outro marcador que possa ser usado para identificação. O tráfego dos intermediários

endocíticos provenientes deste mecanismo também não está muito esclarecido, podendo ser diferente do mecanismo de caveolae.

Nossos estudos e de outros grupos tem ajudado a delinear um cenário para internalização e tráfego intracelular de PrP^c (Fig. 38). Esta proteína possivelmente segue a via biossintética comum às proteínas ancoradas por GPI a partir do retículo endoplasmático (ER), passando pelo Golgi e é encaminhada para membrana plasmática através de vesículas de transporte. Uma vez na membrana plasmática, ela pode ser internalizada constitutivamente ou induzida por cobre. O mecanismo principal de endocitose de PrP^c parece ser dependente de clatrina, já que esta proteína foi detectada em vesículas cobertas por clatrina (Sunyach e cols., 2003) em neurônios e em endossomas positivos para Rab 5 e transferrina em células de cultura ou neurônios (Magalhães e cols., 2002; Sunyach e cols., 2003; Brown & Harris, 2003), porém mecanismos independentes de clatrina e dependentes de dinamina também parecem estar envolvidos. Alguns trabalhos sugerem participação de caveolae na endocitose de PrP^c em alguns tipos celulares (Vey e cols., 1996). Em células SN56 diferenciadas, a caveolina não é expressa e portanto, um mecanismo independente de caveolae e clatrina, porém dependente de dinamina I pode está envolvido. Uma possibilidade é o envolvimento do mecanismo de endocitose dependente de “lipid rafts” (Magalhães e cols., manuscrito em preparação).

Outra ferramenta interessante para o estudo de tráfego de proteínas em células vivas é a conjugação de proteínas de interesse purificadas com a molécula fluorescente alexa568. Esta foi a estratégia usada pelo nosso grupo para monitorar o tráfego da isoforma infecciosa PrPres. Desta forma, PrPres de camundongo (Chandler e 87V) e hamster (263K) ou frações microssomais foram purificadas a partir de cérebro de animais doentes e conjugados à molécula fluorescente alexa568. Nossos dados demonstraram que as principais bandas marcadas com alexa568 presentes nas amostras de PrPres foram reconhecidas por anticorpo específico para PrP.

Células SN56 foram então tratadas com PrPres fluorescente e a internalização e tráfego desta proteína foram avaliados num período de pelo menos 5 dias através de microscopia confocal. No período de 3 a 5 dias após a incubação com PrPres, a maioria das células incubadas com Ch PrPres (70 a 90% das células em cultura) apresentou fluorescência distribuída em vesículas espalhadas pelo citoplasma e muitas vezes, acumulada em neuritos, enquanto apenas 20 e 40% das células SN56 incubadas com

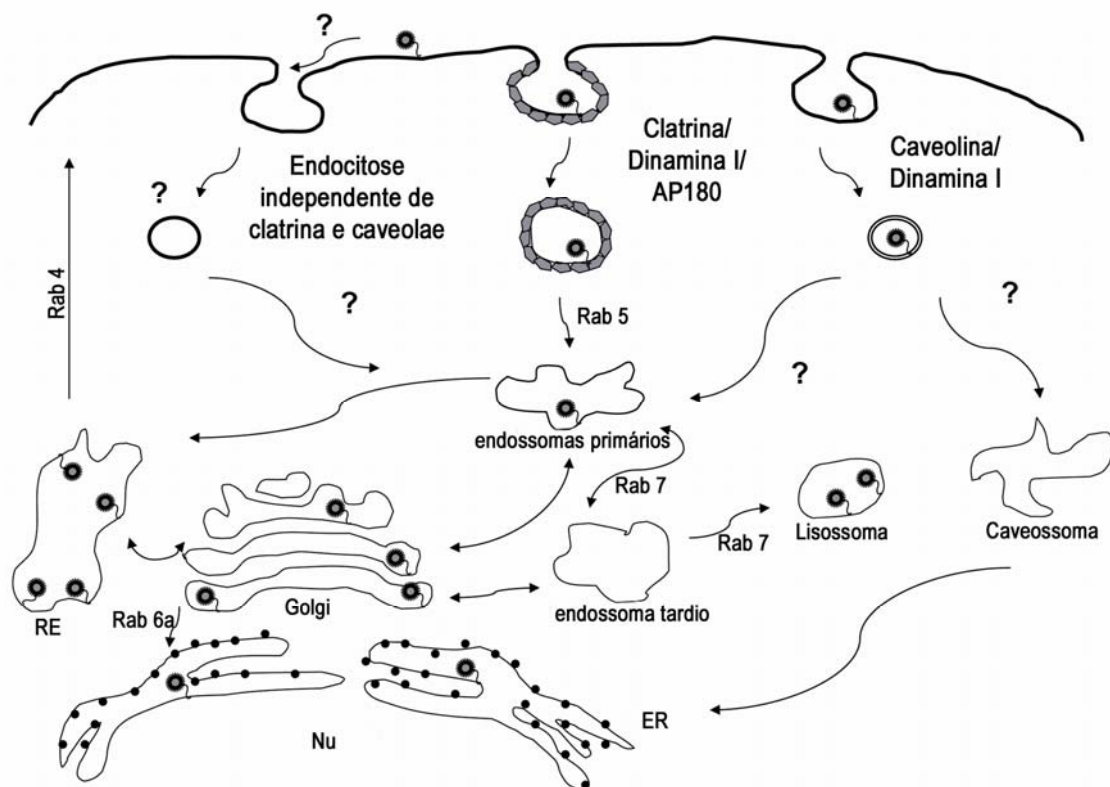


Fig. 38: Endocitose e localização subcelular de PrP^c

263K e 87V PrPres respectivamente, apresentaram esta distribuição em vesículas no citoplasma no mesmo período. Nestes experimentos, a maioria das células em cultura apresentou agregados de tamanhos variados mesmo 5 dias após a incubação. Estes agregados se apresentavam associados à superfície celular ou muitas vezes, pareciam se localizar dentro da célula, sugerindo um mecanismo de endocitose capaz de internalizar grandes partículas. Análise dos valores de área dos agregados de Ch, 263K e 87V PrPres associados às células nas primeiras horas após incubação demonstraram que agregados de Ch e 263K apresentam áreas similares, enquanto 87V PrPres apresentam áreas menores, indicando que a diferença na habilidade de processar o agregado não está relacionada com o tamanho do mesmo. Estes dados sugerem que as células SN56 apresentam uma menor eficiência na internalização e principalmente, na distribuição de 87V e 263K PrPres em vesículas pelo citoplasma da célula. Esta diferença poderia estar relacionada a ausência de co-fatores celulares que auxiliam o processamento e distribuição de PrPres em vesículas no caso de infecção de células com PrPres de espécie diferente (efeito barreira-espécie). Mas também existe a possibilidade de agregados de diferentes espécies e cepas de PrPres apresentarem características biofísicas diferentes, como por exemplo, a estabilidade do agregado, estado de glicosilação das moléculas e associação das fibrilas. De fato, já foi demonstrado que diferentes cepas apresentam susceptibilidade a degradação por proteinase K e proporção das formas deglicosilada, mono e diglicosilada diferentes. Além disso, também foi sugerido que agregados de 87V e 263K são muito bem empacotados dificultando a distinção de fibrilas individuais, enquanto agregados de outras cepas de PrPres de camundongo como ME7 e 139a apresentam fibrilas menos empacotadas (Kacsak e cols., 1986). Desta forma, agregados de tamanhos similares, mas com diferentes níveis de empacotamento das fibrilas poderiam dificultar o processamento e distribuição das moléculas de PrPres para vesículas.

Nossos experimentos também demonstraram que a adição da molécula fluorescente não altera a infectividade de PrPres. Células incubadas com Ch PrPres-alexa568 e mantidas em cultura por várias passagens (pelo menos 23 passagens) apresentaram formação de novas moléculas de PrPres, indicando infecção persistente por prion. No entanto, células incubadas com 87V e 263K PrPres-alexa568 e mantidas em cultura pelo mesmo período não apresentaram formação de novas moléculas de PrPres, ou seja, não foram infectadas. Portanto, a internalização dos agregados e tráfego de PrPres para vesículas no citoplasma das células coincide com o processo de infecção persistente e

sugere que este tráfego pode ter importância para o estabelecimento da infecção. Experimentos anteriores (Gerald Baron, comunicação pessoal) demonstraram que células SN56 eram resistentes à infecção por 263K e 87V PrPres. De fato, já foi descrita uma barreira-espécie que inviabiliza a infecção de células de camundongo por PrPres de hamster (revisto por Prusiner, 1998). E foi demonstrado que a introdução do gene de PrPsen de hamster ou uma chimera de PrPsen de camundongo e hamster em células de camundongo pode neutralizar o efeito da barreira-espécie e tornar estas células sensíveis à infecção por PrPres de hamster (Scott e cols., 1989; 1992). Já 87V é uma cepa de camundongo que apresenta uma peculiaridade; sua habilidade de infecção depende dos alelos (a ou b) para o gene PrP presentes na célula. Esta cepa só é capaz de causar infecção persistente em células de camundongo homozigotas para o alelo b do gene de PrPsen (Carlson e cols., 1994; Nishida e cols., 2000), sugerindo que as células SN56 contenham pelo menos um alelo “a” para o gene de PrPsen.

Microsossomos purificados a partir de cérebro de animais sadios e infectados por Chandler PrPres em estado terminal da doença também foram conjugados à molécula alexa568 e incubados com as células SN56. Já nas primeiras 4 horas, grandes partículas fluorescentes, provavelmente resultante da associação de microsossomos, se ligaram às células e algumas vesículas já podiam ser notadas no interior da célula. Em 24 horas, a fluorescência estava distribuída em vesículas espalhadas pelo citoplasma e acumuladas em neuritos e as células ainda apresentavam microsossomos associados sobre a superfície celular. Tanto microsossomos provenientes de cérebro normal como microsossomos provenientes de animal infectado com Chandler PrPres (Ch microsossomos) apresentaram o mesmo comportamento, provavelmente devido a alta concentração de proteínas não relacionadas à PrPres nestas frações microsossomais. Portanto, estes dados demonstram que PrPres associados à membrana é rapidamente captado pelas células e distribuído em vesículas. Esta facilidade na internalização e tráfego poderiam ter uma implicação na eficiência de infecção. De fato, nossos dados demonstram que a produção de novas moléculas de PrPres em células infectadas por Ch microsossomos é similar a de células infectadas com Ch PrPres purificado, apesar da quantidade de Ch PrPres presente na fração microsossomal ser bastante inferior que a usada nos experimentos com Ch PrPres purificado. Portanto, em nossas condições, Ch PrPres associado à membranas apresentou uma maior eficiência na infecção de células SN56 (Baron e cols., manuscrito em preparação).

Nós também investigamos a internalização e tráfego de amilóides não transmissíveis como fibrilas de β 1-42 (doenças de Alzheimer) e de PrP recombinante em células SN56. Tanto as fibrilas de β 1-42 como as de PrP recombinante apresentaram agregados que se associaram às células nas primeiras horas e após 24 horas a fluorescência se distribuiu em vesículas pelo citoplasma e neuritos. Apesar de haver uma diferença quanto a cinética de internalização e distribuição entre estas fibrilas e os agregados de PrPres, a distribuição da fluorescência em vesículas no citoplasma foi similar. Esta similaridade entre estes amilóides pode refletir um mecanismo comum e pouco específico para internalização e tráfego destas moléculas em células SN56. No caso das fibrilas de PrP recombinante, poucas células apresentaram também um acúmulo na região perinuclear, similar à localização perinuclear de PrPsen, sugerindo que possa haver proteínas com conformação parecida a PrPsen associadas aos agregados de PrP recombinante e que são direcionadas à região perinuclear.

Para avaliação da identidade das vesículas positivas para PrPres no citoplasma e neuritos, alguns experimentos de dupla marcação foram feitos em células SN56 infectadas com Chandler PrPres. Como PrPres e PrPsen são encontrados em domínios “rafts” na membrana (Vey e cols., 1996; Nasvlasky e cols., 1997), nós usamos a toxina da cólera como marcador de endocitose dependente de “lipid rafts”. E como PrPsen também se localiza em vesículas positivas para transferrina (Magalhaes e cols., 2002; Brown & Harris, 2003; Sunyach e cols., 2003), esta proteína foi usada como marcador de endossomas da via clássica dependente de clatrina (endossomas primários e de reciclagem). Ch PrPres-alexa568 não colocalizou com nenhum destes marcadores, sugerindo a possibilidade de PrPres ser internalizado por um mecanismo diferente do dependente de clatrina ou “lipid rafts”. Entretanto, não podemos descartar a possibilidade de falta de sincronização entre os eventos de endocitose de Ch PrPres e toxina da cólera ou transferrina.

Interessados em avaliar se Ch PrPres se acumula em vesículas sinápticas nos neuritos, o que representaria uma alternativa eficaz para a propagação de PrPres entre células no sistema nervoso, nós utilizamos GFP-VACHT como marcador de vesícula sináptica. O transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) se distribui em endossomas primários e de reciclagem no corpo celular e em vesículas sinápticas nos neuritos (Santos e cols., 2001; Barbosa Jr e cols., 2002). Ch PrPres-alexa568 também não colocalizou com GFP-VACHT, sugerindo que PrPres não se acumula em vesículas sinápticas e estas não apresentam um papel importante na transferência de PrPres entre

células SN56. Portanto, outros mecanismos estariam envolvidos na propagação de PrPres entre estas células.

Alguns trabalhos demonstraram que PrPres se localiza em lisossomas em células infectadas (Caughey e cols., 1991; McKinley e cols., 1991). Outros grupos também demonstraram a localização de PrPres em lisossomas em cérebro humano e de camundongo afetado por doenças priônicas (Laszlo e cols., 1992; Arnold e cols., 1995; Grigoriev e cols., 1999). Desta forma, nós também usamos lisotracker, um marcador de organelas ácidas como lisossomas e endossomas tardios e dextran, um marcador de fase fluida que após endocitose é direcionado para estas mesmas organelas (Rejman e cols., 2004). Ch PrPres-alexa568 apresentou alta colocalização com estes dois marcadores, indicando que após internalização Ch PrPres é direcionado para endossomas tardios e lisossomas. A localização de Ch PrPres-alexa568 em endossomas tardios e lisossomas em células SN56 abre outras possibilidades para o mecanismo de propagação de PrPres entre estas células. Uma delas seria os exossomas, que são vesículas membranosas originadas de endossomas tardios e lisossomas com diâmetro variando entre 50 e 100nm (Fevrier e cols., 2004). Uma outra possibilidade seria a exocitose de lisossomas (revisto por Andrews, 2000) ou ainda, os nanotúbulos que são estruturas extremamente finas apresentando cerca de 50 a 200nm de diâmetro que fazem contato entre células adjacentes e podem mediar a transferência de vesículas positivas para lisotracker (Rustom e cols., 2004). Recentemente, Baron e cols. (manuscrito em preparação) demonstraram que pequenas quantidades de PrPres podem ser secretadas pelas células SN56 e são suficientes para causar infecção de uma nova cultura destas células.

Além disso, já foi sugerido que o pH ácido seja um dos requisitos para a alteração conformacional desta proteína (Swietnicki e cols., 1997) e que o sítio de conversão de PrPsen para PrPres em células N2a poderia ser o lisossoma (Caughey e cols., 1991; Caughey & Raymond, 1991). No entanto, também foi demonstrado que em ensaios de conversão “in vitro”, a maior eficiência de conversão foi atingida em pH neutro (Baron e cols., 2002).

Outro ponto interessante é que no caso da doença de Alzheimer, A β 1-42 após ser internalizado também é direcionado para lisossomas em neurônios. O acúmulo destas moléculas nos lisossomas provoca uma alteração na permeabilidade da membrana lisosomal e as enzimas presentes nestas organelas são liberadas no interior da célula, causando toxicidade celular e iniciando o processo de neurodegeneração (Nixon e cols.,

2000). Desta forma, o acúmulo de Ch PrPres em lisossomas também pode ter relevância nos mecanismos de neurodegeneração associada a doenças priônicas.

Alguns controles feitos paralelamente aos experimentos descritos acima, como a incubação de células SN56 com o corante alexa568 livre e a detecção de Ch PrPres intacto 4 dias após incubação com as células, indicam que a fluorescência visualizada durante este período é específica à molécula Ch PrPres-alexa568. Estes dados demonstram que apesar da localização em lisossomas e endossomas tardios, grande parte da proteína não sofre proteólise, coerente com a alta resistência a proteases descrita para PrPres.

A expressão do mutante Rab7 Q67L etiquetado com GFP em células SN56 infectadas com Ch PrPres também confirmou a localização desta proteína em lisossomas e endossomas tardios. Ch PrPres se localizou no interior de grandes vesículas positivas para o mutante de Rab7 tanto no corpo celular quanto no neurito. Além disso, em algumas células pudemos notar grandes agregados dentro da célula recobertos por membrana marcada com GFP-Rab7 Q67L, sugerindo novamente que o mecanismo de internalização envolvido na endocitose de Ch PrPres seja um mecanismo não seletivo e que permita a internalização de grandes partículas como por exemplo a macropinocitose.

Outro modelo biológico clássico, as células N2a persistentemente infectadas com 22L PrPres apresentaram alteração na taxa de formação de PrPres na presença de Rab 7 e dos mutantes Q67L e T22N, confirmando a importância desta organelas no processo de manutenção da infecção. A superexpressão de Rab 7 selvagem aumenta o transporte em direção a endossomas tardios e lisossomas e também causou um aumento discreto na formação de PrPres nestas células. O mutante constitutivamente ativo Q67L também apresentou uma tendência para o aumento na formação de PrPres e o dominante negativo T22N causou uma diminuição na formação de PrPres. Estes dados sugerem que o tráfego para endossomas tardios e lisossomas é importante para a formação de novas moléculas de PrPres em células N2a infectadas com 22L. Portanto, o acúmulo de Ch PrPres em lisossomas pode ser relevante para o mecanismo de conversão e formação de novas moléculas de PrPres, bem como a propagação de PrPres entre as células e ainda, nos processos de neurodegeneração.

Em resumo, nossos dados sugerem que um mecanismo não seletivo, como por exemplo a macropinocitose, poderia ser responsável pela internalização de Ch PrPres em células SN56. A proteína seria então direcionada para endossomas tardios e

lisossomas, que parecem ter uma participação importante no processo de formação de novas moléculas de PrPres. Além disso, a internalização e tráfego de Ch PrPres parece similar a outros amilóides não transmissíveis, sugerindo um processo pouco seletivo. Apesar disso, este tráfego coincide com a infecção persistente destas células, já que cepas que não são capazes de causar infecção apresentam alteração no tráfego. Também demonstramos que Ch PrPres inserido em membranas (Ch microsossomos) é internalizado e distribuído pela célula com mais eficiência e que a formação de PrPres também é mais eficiente.

GFP-PrP^c e Ch PrPres-alexa568 são ferramentas muito úteis no estudo do tráfego e processo de infecção das células. Eles poderão ser usados em estudos futuros para avaliar a colocalização destas duas moléculas e possíveis sítios para conversão. Estudos são necessários para avaliar se GFP-PrP^c pode ser convertido a uma isoforma infecciosa, já que aparentemente a região C-terminal de PrP^{sen} está envolvida na conversão e no caso desta construção, GFP foi adicionado a região N-terminal. Caso seja possível, quais as conseqüências para a fluorescência de GFP, já que esta molécula também poderia ter sua conformação alterada. Além disso, mais estudos serão necessários para avaliarmos quais intermediários endocíticos estão envolvidos na captação de PrPres a partir dos agregados até os lisossomas.

6 – Referências Bibliográficas:

- Aguzzi A, Polymenidou M. (2004) Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell*. **116(2)**:313-27.
- Anderson RG. (1998) The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem*. **67**:199-225.
- Andrews NW. (2000) Regulated secretion of conventional lysosomes. *Trends Cell Biol*. **10(8)**:316-21.
- Arnold JE, Tipler C, Laszlo L, Hope J, Landon M, Mayer RJ. (1995) The abnormal isoform of the prion protein accumulates in late-endosome-like organelles in scrapie-infected mouse brain. *J Pathol*. **176(4)**:403-11.
- Barbosa J JR, Ferreira LT, Martins-Silva C, Santos MS, Torres GE, Caron MG, Gomez MV, Ferguson SS, Prado MA, Prado VF. (2002) Trafficking of the vesicular acetylcholine transporter in SN56 cells: a dynamin-sensitive step and interaction with the AP-2 adaptor complex. *J Neurochem* **82(5)**:1221-8.
- Barbosa J Jr, Massensini AR, Santos MS, Meireles SI, Gomez RS, Gomez MV, Romano-Silva MA, Prado VF, Prado MA (1999) Expression of the vesicular acetylcholine transporter, proteins involved in exocytosis, and functional calcium signaling in varicosities and soma of a murine septal cell line. *J Neurochem*. **73(5)**:1881-93.
- Baron GS, Wehrly K, Dorward DW, Chesebro B, Caughey B. (2002) Conversion of raft associated prion protein to the protease-resistant state requires insertion of PrP-res (PrP(Sc)) into contiguous membranes. *EMBO J*. **21(5)**:1031-40.
- Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C. (1986) Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*. **46(3)**:417-28.
- Beranger F, Mange A, Goud B, Lehmann S. (2002) Stimulation of PrP(C) retrograde transport toward the endoplasmic reticulum increases accumulation of PrP(Sc) in prion-infected cells. *J Biol Chem*. **277(41)**:38972-7.
- Blatch GL, Lassle M, Zetter BR, Kundra V. (1997) Isolation of a mouse cDNA encoding mSTI1, a stress-inducible protein containing the TPR motif. *Gene*. **194(2)**:277-82.
- Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB. (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*. **218(4579)**:1309-11.

- Borchelt DR, Taraboulos A, Prusiner SB. (1992) Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J Biol Chem.* **267(23)**:16188-99.
- Bounhar Y, Zhang Y, Goodyer CG, LeBlanc A. (2001) Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* **276(42)**:39145-9
- Brodin L, Low P, Shupliakov O. (2000) Sequential steps in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Curr Opin Neurobiol.* **10(3)**:312-20.
- Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, von Bohlen A, Schulz-Schaeffer W, Giese A, Westaway D, Kretzschmar H. (1997a) The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature.* **390(6661)**:684-7.
- Brown DR, Schulz-Schaeffer WJ, Schmidt B, Kretzschmar HA. (1997b) Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol.* **146(1)**:104-12.
- Brown DR, Besinger A. (1998) Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem J.* **334 (Pt 2)**:423-9.
- Brown DR, Wong BS, Hafiz F, Clive C, Haswell SJ, Jones IM. (1999) Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem J.* **344 Pt 1**:1-5.
- Brown DR. (2001) Prion and prejudice: normal protein and the synapse. *Trends Neurosci* **24(2)**:85-90.
- Brown LR, Harris DA. (2003) Copper and zinc cause delivery of the prion protein from the plasma membrane to a subset of early endosomes and the Golgi. *J Neurochem.* **87(2)**:353-63.
- Bucci C, Thomsen P, Nicoziani P, McCarthy J, van Deurs B. (2000) Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell.* **11(2)**:467-80.
- Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C. (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature.* **356(6370)**:577-82.
- Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C. (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell.* **73(7)**:1339-47.
- Carlson GA, Ebeling C, Yang SL, Telling G, Torchia M, Groth D, Westaway D, DeArmond SJ, Prusiner SB. (1994) Prion isolate specified allotypic interactions between the cellular and scrapie prion proteins in congenic and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91(12)**:5690-4.

- Caughey B, Neary K, Buller R, Ernst D, Perry LL, Chesebro B, Race RE. (1990) Normal and scrapie-associated forms of prion protein differ in their sensitivities to phospholipase and proteases in intact neuroblastoma cells. *J Virol.* **64(3)**:1093-101.
- Caughey BW, Dong A, Bhat KS, Ernst D, Hayes SF, Caughey WS. (1991) Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* **30(43)**:10600.
- Caughey B, Raymond GJ. (1991) The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem.* **266(27)**:18217-23.
- 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. *J Virol.* **65(12)**:6597-603.
- Caughey B, Raymond GJ. (1993) Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells. *J Virol.* **67(2)**:643-50.
- Caughey B, Raymond GJ, Callahan MA, Wong C, Baron GS, Xiong LW. (2001) Interactions and conversions of prion protein isoforms. *Adv Protein Chem.* **57**:139-69.
- Caughey B. (2001) Interactions between prion protein isoforms: the kiss of death? *Trends Biochem Sci.* **26(4)**:235-42.
- Caughey B, Baron GS. (2002) Factors affecting interactions between prion protein isoforms. *Biochem Soc Trans.* **30(4)**:565-9.
- Caughey B. (2003) Prion protein conversions: insight into mechanisms, TSE transmission barriers and strains. *Br Med Bull.* **66**:109-20.
- Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R. (2002) Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J.* **21(13)**:3317-26.
- Colling SB, Collinge J, Jefferys JG. (1996) Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca(2+)-activated K⁺ currents. *Neurosci Lett.* **209(1)**:49-52.
- Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR, Jefferys JG. (1994) Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature.* **370(6487)**:295-7.
- Cordeiro Y, Machado F, Juliano L, Juliano MA, Brentani RR, Foguel D, Silva JL. (2001) DNA converts cellular prion protein into the beta-sheet conformation and inhibits prion peptide aggregation. *J Biol Chem.* **276(52)**:49400-9.

- 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. *Mol Biol Cell*. **12(5)**:1467-79.
- Daude N, Lehmann S, Harris DA. (1997) Identification of intermediate steps in the conversion of a mutant prion protein to a scrapie-like form in cultured cells. *J Biol Chem*. **272(17)**:11604-12.
- Deleault NR, Lucassen RW, Supattapone S. (2003) RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature*. **425(6959)**:717-20.
- D'Hondt K, Heese-Peck A, Riezman H. (2000) Protein and lipid requirements for endocytosis. *Annu Rev Genet*. **34**:255-295.
- Donne, D.G., Viles, J. H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T. L., Cohen, F. E., Prusiner, S.B., Wright, P. E., Dyson, H. J. (1997). Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94(25)**: 13452-7.
- Ellis V, Daniels M, Misra R, Brown DR. (2002) Plasminogen activation is stimulated by prion protein and regulated in a copper-dependent manner. *Biochemistry*. **41(22)**:6891-6.
- Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, Laude H, Raposo G. (2004) Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101(26)**:9683-8.
- Fivaz M, Vilbois F, Thurnheer S, Pasquali C, Abrami L, Bickel PE, Parton RG, van der Goot FG. (2002) Differential sorting and fate of endocytosed GPI-anchored proteins. *EMBO J*. **21(15)**:3989-4000.
- Ford MG, Pearse BM, Higgins MK, Vallis Y, Owen DJ, Gibson A, Hopkins CR, Evans PR, McMahon HT. (2001) Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P₂ and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science* **291(5506)**:1051-5.
- Foster LJ, De Hoog CL, Mann M. (2003) Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100(10)**:5813-8.
- Gabizon R, McKinley MP, Groth D, Prusiner SB. (1988) Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **85(18)**:6617-21.

- Gauczynski S, Peyrin JM, Haik S, Leucht C, Hundt C, Rieger R, Krasemann S, Deslys JP, Dormont D, Lasmezas CI, Weiss S. (2001) The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *EMBO J.* **20(21):**5863-75.
- Glenner GG, Eanes ED, Bladen HA, Linke RP, Termine JD. (1974) Beta-pleated sheet fibrils. A comparison of native amyloid with synthetic protein fibrils. *J Histochem Cytochem.* **22(12):**1141-58.
- Gonzalez-Iglesias R, Pajares MA, Ocal C, Espinosa JC, Oesch B, Gasset M. (2002) Prion protein interaction with glycosaminoglycan occurs with the formation of oligomeric complexes stabilized by Cu(II) bridges. *J Mol Biol.* **319(2):**527-40.
- Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Forlenza OV, Cabral AL, Veiga SS, Juliano MA, Roesler R, Walz R, Minetti A, Izquierdo I, Martins VR, Brentani RR. (2000a) Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Brain Res Mol Brain Res.* **76(1):**85-92.
- Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Martins VR, Jay DG, Brentani RR. (2000b) Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. *FEBS Lett.* **482(3):**257-60.
- Griffith JS. (1967) Self-replication and scrapie. *Nature.* **215(105):**1043-4.
- Grigoriev V, Escaig-Haye F, Streichenberger N, Kopp N, Langeveld J, Brown P, Fournier JG. (1999) Submicroscopic immunodetection of PrP in the brain of a patient with a new-variant of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett.* **264(1-3):**57-60.
- Grimmer S, van Deurs B, Sandvig K. (2002) Membrane ruffling and macropinocytosis in A431 cells require cholesterol. *J Cell Sci.* **115(Pt 14):**2953-62.
- Grunfelder CG, Engstler M, Weise F, Schwarz H, Stierhof YD, Morgan GW, Field MC, Overath P. (2003) Endocytosis of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein via clathrin-coated vesicles, sorting by default in endosomes, and exocytosis via RAB11-positive carriers. *Mol Biol Cell.* **14(5):**2029-40.
- Harris DA. (1999) Cellular biology of prion diseases. *Clin Microbiol Rev.* **12(3):**429-44.
- Harris DA. (2003) Trafficking, turnover and membrane topology of PrP. *Br Med Bull.* **66:**71-85.
- Henley JR, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA. (1998) Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol.* **141(1):**85-99.

- Herms JW, Kretschmar HA, Titz S, Keller BU. (1995) Patch-clamp analysis of synaptic transmission to cerebellar purkinje cells of prion protein knockout mice. *Eur J Neurosci.* **7(12)**:2508-12.
- Hetz C, Maundrell K, Soto C. (2003) Is loss of function of the prion protein the cause of prion disorders? *Trends Mol Med.* **9(6)**:237-43.
- Hill AF, Antoniou M, Collinge J. (1999) Protease-resistant prion protein produced in vitro lacks detectable infectivity. *J Gen Virol.* **80 (Pt 1)**:11-4.
- Horiuchi M, Caughey B. (1999) Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state. *EMBO J.* **18(12)**:3193-203.
- Horiuchi M, Baron GS, Xiong LW, Caughey B. (2001) Inhibition of interactions and interconversions of prion protein isoforms by peptide fragments from the C-terminal folded domain. *J Biol Chem.* **276(18)**:15489-97.
- Hornshaw MP, McDermott JR, Candy JM. (1995) Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochem Biophys Res Commun.* **207(2)**:621-9.
- Hunter N, Foster J, Chong A, McCutcheon S, Parnham D, Eaton S, MacKenzie C, Houston F. (2002). Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J. Gen. Virol.* **83**:2897-905.
- Ivanova L, Barmada S, Kummer T, Harris DA. (2001) Mutant prion proteins are partially retained in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* **276(45)**:42409-21.
- Kaneko K, Vey M, Scott M, Pilkuhn S, Cohen FE, Prusiner SB. (1997) COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94(6)**:2333-8.
- Kanu N, Imokawa Y, Drechsel DN, Williamson RA, Birkett CR, Bostock CJ, Brookes JP. (2002) Transfer of scrapie prion infectivity by cell contact in culture. *Curr Biol.* **12(7)**:523-30.
- Kasczak RJ, Rubenstein R, Merz PA, Carp RI, Robakis NK, Wisniewski HM, Diringer H. (1986) Immunological comparison of scrapie-associated fibrils isolated from animals infected with four different scrapie strains. *J Virol.* **59(3)**:676-83.
- Kirchhausen T, Bonifacino JS, Riezman H. (1997) Linking cargo to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins. *Curr Opin Cell Biol.* **9(4)**:488-95.
- Kirchhausen T. (1999) Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **15**:705-32.

- Kirchhausen T. (2000) Clathrin. *Annu Rev Biochem* **69**:699-727.
- Kocisko DA, Come JH, Priola SA, Chesebro B, Raymond GJ, Lansbury PT, Caughey B. (1994) Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature*. **370(6489)**:471-4.
- Korte S, Vassallo N, Kramer ML, Kretzschmar HA, Herms J. (2003) Modulation of L-type voltage-gated calcium channels by recombinant prion protein. *J Neurochem*. **87(4)**:1037-42.
- Kurzchalia TV, Parton RG. (1999) Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol*. **11(4)**:424-31.
- Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T, Haraguchi K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Saeki K, Matsumoto Y, Yokoyama T, Itohara S, Onodera T. (1999) Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature*. **400(6741)**:225-6.
- Laine J, Marc ME, Sy MS, Axelrad H. (2001) Cellular and subcellular morphological localization of normal prion protein in rodent cerebellum. *Eur J Neurosci*. **14(1)**:47-56.
- Lassle M, Blatch GL, Kundra V, Takatori T, Zetter BR. (1997) Stress-inducible, murine protein mSTII. Characterization of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different kinases. *J Biol Chem*. **272(3)**:1876-84.
- Laszlo L, Lowe J, Self T, Kenward N, Landon M, McBride T, Farquhar C, McConnell I, Brown J, Hope J. (1992) Lysosomes as key organelles in the pathogenesis of prion encephalopathies. *J Pathol*. **166(4)**:333-41.
- Lee E, Knecht DA. (2002) Visualization of actin dynamics during macropinocytosis and exocytosis. *Traffic*. **3(3)**:186-92.
- Lee KS, Magalhaes AC, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Prado MA. (2001) Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. *J Neurochem*. **79(1)**:79-87.
- Legname G, Baskakov IV, Nguyen HO, Riesner D, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB. (2004) Synthetic mammalian prions. *Science*. **305(5684)**:673-6.
- Lim KP, Liu DX. (2001) The missing link in coronavirus assembly. Retention of the avian coronavirus infectious bronchitis virus envelope protein in the pre-Golgi compartments and physical interaction between the envelope and membrane proteins. *J Biol Chem*. **276(20)**:17515-23.
- Lippincott-Schwartz J, Yuan L, Tipper C, Amherdt M, Orci L, Klausner RD. (1991) Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general

- mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell*. 67(3):601-16.
- Lippincott-Schwartz J, Patterson GH. (2003) Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science*. **300(5616)**:87-91.
- Liu T, Li R, Pan T, Liu D, Petersen RB, Wong BS, Gambetti P, Sy MS. (2002) Intercellular transfer of the cellular prion protein. *J Biol Chem*. **277(49)**:47671-8.
- Lysek DA, Wuthrich K. (2004) Prion protein interaction with the C-terminal SH3 domain of Grb2 studied using NMR and optical spectroscopy. *Biochemistry*. **43(32)**:10393-9.
- Lledo PM, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB, Nicoll RA. (1996) Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93(6)**:2403-7.
- Lorenz H, Windl O, Kretzschmar HA. (2002) Cellular phenotyping of secretory and nuclear prion proteins associated with inherited prion diseases. *J Biol Chem*. **277(10)**:8508-16.
- Ma J, Wollmann R, Lindquist S. (2002) Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science*. **298(5599)**:1781-5.
- Ma J, Lindquist S. (2002) Conversion of PrP to a self-perpetuating PrPSc-like conformation in the cytosol. *Science*. **298(5599)**:1785-8.
- Ma J, Lindquist S. (2001) Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98(26)**:14955-60.
- Magalhaes AC, Silva JA, Lee KS, Martins VR, Prado VF, Ferguson SS, Gomez MV, Brentani RR, Prado MA. (2002) Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. *J Biol Chem*. **277(36)**:33311-8.
- Mayor S, Rothberg KG, Maxfield FR. (1994) Sequestration of GPI-anchored proteins in caveolae triggered by cross-linking. *Science*. **264(5167)**:1948-51.
- Mayor S, Sabharanjak S, Maxfield FR. (1998) Cholesterol-dependent retention of GPI-anchored proteins in endosomes. *EMBO J*. **17(16)**:4626-38.
- Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J. (1994) 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol*. **8(2-3)**:121-7.

- Marella M, Lehmann S, Grassi J, Chabry J. (2002) Filipin prevents pathological prion protein accumulation by reducing endocytosis and inducing cellular PrP release. *J Biol Chem.* **277(28)**:25457-64.
- 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. *Nat Med.* **3(12)**:1376-82.
- Martins VR, Linden R, Prado MA, Walz R, Sakamoto AC, Izquierdo I, Brentani RR. (2002) Cellular prion protein: on the road for functions. *FEBS Lett.* **512(1-3)**:25-8.
- Maxfield FR, Mayor S. (1997) Cell surface dynamics of GPI-anchored proteins. *Adv Exp Med Biol.* **419**:355-64.
- McKinley MP, Bolton DC, Prusiner SB. (1983) A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell.* **35(1)**:57-62.
- 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. *Lab Invest.* **65(6)**:622-30.
- McNiven MA, Cao H, Pitts KR, Yoon Y. (2000) The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places. *Trends Biochem Sci.* **25(3)**:115-20.
- Mellman I. (1996) Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **12**:575-625.
- Meyer RK, McKinley MP, Bowman KA, Braunfeld MB, Barry RA, Prusiner SB. (1986) Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **83(8)**:2310-4.
- Michaelson D, Silletti J, Murphy G, D'Eustachio P, Rush M, Philips MR. (2001) Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J Cell Biol.* **152(1)**:111-26.
- Miura T, Hori-i A, Takeuchi H. (1996) Metal-dependent alpha-helix formation promoted by the glycine-rich octapeptide region of prion protein. *FEBS Lett.* **396(2-3)**:248-52.
- Moore RC, Lee IY, Silverman GL, Harrison PM, Strome R, Heinrich C, Karunaratne A, Pasternak SH, Chishti MA, Liang Y, Mastrangelo P, Wang K, Smit AF, Katamine S, Carlson GA, Cohen FE, Prusiner SB, Melton DW, Tremblay P, Hood LE, Westaway D. (1999) Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J Mol Biol.* **292(4)**:797-817.

- Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, Laplanche JL, Lehmann S, Launay JM, Kellermann O. (2000) Signal transduction through prion protein. *Science*. **289(5486)**:1925-8.
- Naslavsky N, Stein R, Yanai A, Friedlander G, Taraboulos A. (1997) Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J Biol Chem*. **272(10)**:6324-31.
- Naslavsky N, Shmeeda H, Friedlander G, Yanai A, Futerman AH, Barenholz Y, Taraboulos A. (1999) Sphingolipid depletion increases formation of the scrapie prion protein in neuroblastoma cells infected with prions. *J Biol Chem*. **274(30)**:20763-71.
- Negro A, Ballarin C, Bertoli A, Massimino ML, Sorgato MC. (2001) The metabolism and imaging in live cells of the bovine prion protein in its native form or carrying single amino acid substitutions. *Mol Cell Neurosci*. **17(3)**:521-38.
- Nichols BJ, Lippincott-Schwartz J. (2001) Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol*. **11(10)**:406-12.
- 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. *J Cell Biol*. **153(3)**:529-41.
- Nichols BJ. (2002) A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex. *Nat Cell Biol*. **4(5)**:374-8.
- Nishida N, Harris DA, Vilette D, Laude H, Frobert Y, Grassi J, Casanova D, Milhavel O, Lehmann S. (2000) Successful transmission of three mouse-adapted scrapie strains to murine neuroblastoma cell lines overexpressing wild-type mouse prion protein. *J Virol*. **74(1)**:320-5.
- Nishimura T, Sakudo A, Nakamura I, Lee DC, Taniuchi Y, Saeki K, Matsumoto Y, Ogawa M, Sakaguchi S, Itohara S, Onodera T. (2004) Cellular prion protein regulates intracellular hydrogen peroxide level and prevents copper-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. **323(1)**:218-22.
- Nixon RA, Cataldo AM, Mathews PM. (2000) The endosomal-lysosomal system of neurons in Alzheimer's disease pathogenesis: a review. *Neurochem Res*. **25(9-10)**:1161-72.
- Nunziante M, Gilch S, Schatzl HM. (2003) Essential role of the prion protein N terminus in subcellular trafficking and half-life of cellular prion protein. *J Biol Chem*. **278(6)**:3726-34.

- Oh P, McIntosh DP, Schnitzer JE. (1998) Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol.* **141(1)**:101-14.
- Paitel E, Alves da Costa C, Vilette D, Grassi J, Checler F. (2002) Overexpression of PrPc triggers caspase 3 activation: potentiation by proteasome inhibitors and blockade by anti-PrP antibodies. *J Neurochem.* **83(5)**:1208-14.
- Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, et al. (1993) Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90(23)**:10962-6.
- Pauly PC, Harris DA. (1998) Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem.* **273(50)**:33107-10.
- Pelkmans L, Helenius A. (2003) Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr Opin Cell Biol.* **15(4)**:414-22.
- Perera WS, Hooper NM. (2001) Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region. *Curr Biol.* **11(7)**:519-23.
- Peters PJ, Mironov A Jr, 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. *J Cell Biol.* **162(4)**:703-17.
- Pfeffer SR. (2001) Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function. *Trends Cell Biol.* **11(12)**:487-91.
- Prado MAM, Alves-Silva J, Magalhães AC, Prado VF, Linden R, Martins VR, Brentani RR. (2004) PrPc on the road: trafficking of the cellular prion protein. *J Neurochem.* **88(4)**:769-81.
- Priola SA, Chesebro B. (1995) A single hamster PrP amino acid blocks conversion to protease-resistant PrP in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells. *J Virol.* **69(12)**:7754-8.
- Prusiner SB. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science.* **216(4542)**:136-44.
- Prusiner SB, McKinley MP, Bowman KA, Bolton DC, Bendheim PE, Groth DF, Glenner GG. (1983) Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell.* **35(2 Pt 1)**:349-58.

- Prusiner SB, Scott M, Foster D, Pan KM, Groth D, Mirinda C, Torchia M, Yang SL, Serban D, Carlson GA, Hoppe PC, Westaway D, DeArmond SJ. (1990) Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell*. **63(4)**:673-86.
- Prusiner SB. (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95(23)**:13363-83.
- Raymond, GJ and Chabry, J. (2004) Purification of the pathological isoform of prion protein (PrP^{Sc} or PrP-res) from transmissible spongiform encephalopathy-affected brain tissue. In Lehmann, S and Grassi, J (eds) *Methods and tools in biosciences and medicine: Techniques in prion research*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 16-26.
- Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. (2004) Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J*. **377(Pt 1)**:159-69.
- Rijnboutt S, Jansen G, Posthuma G, Hynes JB, Schornagel JH, Strous GJ. (1996) Endocytosis of GPI-linked membrane folate receptor-alpha. *J Cell Biol*. **132(1-2)**:35-47.
- Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wuthrich K. (1996) NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature*. **382(6587)**:180-2.
- Riek R, Hornemann S, Wider G, Glockshuber R, Wuthrich K. (1997) NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett*. **413(2)**:282-8.
- Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* **68(4)**:673-82.
- Roucou X, Guo Q, Zhang Y, Goodyer CG, LeBlanc AC. (2003) Cytosolic prion protein is not toxic and protects against Bax-mediated cell death in human primary neurons. *J Biol Chem*. **278(42)**:40877-81.
- Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, & Gerdes HH (2004) Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* **303**: 1007-1010.
- Sakaguchi S, Katamine S, Shigematsu K, Nakatani A, Moriuchi R, Nishida N, Kurokawa K, Nakaoka R, Sato H, Jishage K, et al. (1995) Accumulation of proteinase K-resistant prion protein (PrP) is restricted by the expression level of normal PrP in mice inoculated with a mouse-adapted strain of the Creutzfeldt-Jakob disease agent. *J Virol*. **69(12)**:7586-92.

- Santos MS, Barbosa J Jr, Veloso GS, Ribeiro F, Kushmerick C, Gomez MV, Ferguson SS, Prado VF, Prado MA. (2001) Trafficking of green fluorescent protein tagged-vesicular acetylcholine transporter to varicosities in a cholinergic cell line. *J Neurochem.* **78(5)**:1104-13.
- Schlegel A, Lisanti MP. (2001) Caveolae and their coat proteins, the caveolins: from electron microscopic novelty to biological launching pad. *J Cell Physiol.* **186(3)**:329-37.
- Schmid SL, Damke H. (1995) Coated vesicles: a diversity of form and function. *FASEB J.* **9(14)**:1445-53.
- Schmitt-Ulms G, Legname G, Baldwin MA, Ball HL, Bradon N, Bosque PJ, Crossin KL, Edelman GM, DeArmond SJ, Cohen FE, Prusiner SB. (2001) Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. *J Mol Biol.* **314(5)**:1209-25.
- Scott M, Foster D, Mirenda C, Serban D, Coufal F, Walchli M, Torchia M, Groth D, Carlson G, DeArmond SJ, Westaway D, Prusiner SB (1989) Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell.* **59(5)**:847-57.
- Scott MR, Kohler R, Foster D, Prusiner SB. (1992) Chimeric prion protein expression in cultured cells and transgenic mice. *Protein Sci.* **1(8)**:986-97.
- Seabra MC, Mules EH, Hume AN. (2002) Rab GTPases, intracellular traffic and disease. *Trends Mol Med.* **8(1)**:23-30.
- Sharma DK, Choudhury A, Singh RD, Wheatley CL, Marks DL, Pagano RE. (2003) Glycosphingolipids internalized via caveolar-related endocytosis rapidly merge with the clathrin pathway in early endosomes and form microdomains for recycling. *J Biol Chem.* **278(9)**:7564-72.
- Shyng SL, Huber MT, Harris DA. (1993) A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* **268(21)**:15922-8.
- Shyng SL, Heuser JE, Harris DA. (1994) A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J Cell Biol.* **125(6)**:1239-50.
- Shyng SL, Moulder KL, Lesko A, Harris DA. (1995) The N-terminal domain of a glycolipid-anchored prion protein is essential for its endocytosis via clathrin-coated pits. *J Biol Chem.* **270(24)**:14793-800.

- Shmerling D, Hegyi I, Fischer M, Blattler T, Brandner S, Gotz J, Rulicke T, Flechsig E, Cozzio A, von Mering C, Hangartner C, Aguzzi A, Weissmann C. (1998) Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell*. **93(2)**:203-14.
- Simonic T, Duga S, Strumbo B, Asselta R, Ceciliani F, Ronchi S. (2000) cDNA cloning of turtle prion protein. *FEBS Lett*. **469(1)**:33-8.
- Simons K, Ikonen E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*. **387(6633)**:569-72.
- 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. *J Cell Biol*. **149(4)**:901-14.
- Somsel Rodman J, Wandinger-Ness A. (2000) Rab GTPases coordinate endocytosis. *J Cell Sci*. **113 Pt 2**:183-92.
- Soto C, Castilla J. (2004) The controversial protein-only hypothesis of prion propagation. *Nat Med*. **10 Suppl**:S63-7.
- Hetz C, Maundrell K, Soto C. (2003) Is loss of function of the prion protein the cause of prion disorders? *Trends Mol Med*. **9(6)**:237-43.
- Spielhauer C, Schatzl HM. (2001) PrPC directly interacts with proteins involved in signaling pathways. *J Biol Chem*. **276(48)**:44604-12.
- Stahl N, Baldwin MA, Hecker R, Pan KM, Burlingame AL, Prusiner SB. (1992) Glycosylinositol phospholipid anchors of the scrapie and cellular prion proteins contain sialic acid. *Biochemistry*. **31(21)**:5043-53.
- Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB. (1987) Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell*. **51(2)**:229-40.
- Stuermer CA, 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 J*. **18(14)**:1731-3.
- 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 J*. **22(14)**:3591-601.
- Swanson JA, Watts C. (1995) Macropinocytosis. *Trends Cell Biol*. **5(11)**:424-8.

- Swietnicki W, Petersen R, Gambetti P, Surewicz WK. (1997) pH-dependent stability and conformation of the recombinant human prion protein PrP(90-231). *J Biol Chem.* **272(44)**:27517-20.
- Taraboulos A, Serban D, Prusiner SB. (1990) Scrapie prion proteins accumulate in the cytoplasm of persistently infected cultured cells. *J Cell Biol.* 110(6):2117-32.
- Taraboulos A, Jendroska K, Serban D, Yang SL, DeArmond SJ, Prusiner SB. (1992) Regional mapping of prion proteins in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89(16)**:7620-4.
- Taraboulos A, Scott M, Semenov A, Avrahami D, Laszlo L, Prusiner SB, Avraham D. (1995) Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J Cell Biol.* **129(1)**:121-32.
- Thomsen P, Roepstorff K, Stahlhut M, van Deurs B. (2002) Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol Biol Cell.* **13(1)**:238-50.
- Tobler I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rulicke T, Moser M, Oesch B, McBride PA, Manson JC. (1996) Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature.* **380(6575)**:639-42.
- Vey M, Pilkuhn S, Wille H, Nixon R, DeArmond SJ, Smart EJ, Anderson RG, Taraboulos A, Prusiner SB. (1996) Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93(25)**:14945-9.
- Vilhardt F, Nielsen M, Sandvig K, van Deurs B. (1999) Urokinase-type plasminogen activator receptor is internalized by different mechanisms in polarized and nonpolarized Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell.* **10(1)**:179-95.
- Xu Y, Takeda S, Nakata T, Noda Y, Tanaka Y, Hirokawa N. (2002) Role of KIF3C motor protein in Golgi positioning and integration. *J Cell Biol.* **158(2)**:293-303.
- Walz, R; Amaral, OB.; Rockenbach, IC.; Roesler, R; Izquierdo, I; Cavalheiro, EA.; Martins, VR.; Brentani, RR. (1999) Increased Sensitivity to Seizures in Mice Lacking Cellular Prion Protein. *Epilepsia* **40(12)**:1679-82.
- Weise J, Crome O, Sandau R, Schulz-Schaeffer W, Bahr M, Zerr I. (2004) Upregulation of cellular prion protein (PrP(c)) after focal cerebral ischemia and influence of lesion severity. *Neurosci Lett.* **372(1-2)**:146-50.

- Whittington MA, Sidle KC, Gowland I, Meads J, Hill AF, Palmer MS, Jefferys JG, Collinge J. (1995) Rescue of neurophysiological phenotype seen in PrP null mice by transgene encoding human prion protein. *Nat Genet.* **9(2)**:197-201.
- Wong C, Xiong LW, Horiuchi M, Raymond L, Wehrly K, Chesebro B, Caughey B. (2001) Sulfated glycans and elevated temperature stimulate PrP(Sc)-dependent cell-free formation of protease-resistant prion protein. *EMBO J.* **20(3)**:377-86.
- Wopfner F, Weidenhofer G, Schneider R, von Brunn A, Gilch S, Schwarz TF, Werner T, Schatzl HM. (1999) Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J Mol Biol.* **289(5)**:1163-78.
- Yedidia Y, Horonchik L, Tzaban S, Yanai A, Taraboulos A. (2001) Proteasomes and ubiquitin are involved in the turnover of the wild-type prion protein. *EMBO J.* **20(19)**:5383-91.
- Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, Hajj GN, Chiarini LB, Nomizo R, Freitas AR, Cabral AL, 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 J.* **21(13)**:3307-16.
- Zhang J, Barak LS, Winkler KE, Caron MG, Ferguson SS. (1997) A central role for beta-arrestins and clathrin-coated vesicle-mediated endocytosis in beta2-adrenergic receptor resensitization. Differential regulation of receptor resensitization in two distinct cell types. *J Biol Chem.* **272(43)**:27005-14.
- Zerial M, McBride H. (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2(2)**:107-17.

7 – Anexo:

Uptake and neuritic transport of scrapie prion protein coincident with infection of neuronal cells **Ana Cristina Magalhães**, Gerald S. Baron, Kil Sun Lee, Olivia Steele-Mortimer, David Dorward, Marco A. M. Prado, Byron Caughey. *J Neurosci* **25(21)**: 5207-5216.

Mouse-adapted Scrapie infection of SN56 cells: greater efficiency with microsome-associated versus purified PrP-res. Gerald S. Baron, **Ana C. Magalhães**, Marco A.M. Prado, and Byron Caughey (aceito para publicação no Journal of Virology)

Copper evoked endocytosis of a fluorescent cellular prion protein depends on dynamin and two distinct internalization mechanisms. **Ana C. Magalhães**, Vilma R. Martins, Vania F. Prado, Marcus V. Gomez, Ricardo R Brentani and Marco A.M. Prado (manuscrito em preparação)

PrP^c on the road: trafficking of the cellular prion protein. (2004) Prado MA, Alves-Silva J, **Magalhaes AC**, Prado VF, Linden R, Martins VR, Brentani RR. *J Neurochem.* **88(4)**:769-81.

Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. (2002) **Magalhaes AC**, Silva JA, Lee KS, Martins VR, Prado VF, Ferguson SS, Gomez MV, Brentani RR, Prado MA. *J Biol Chem* **277 (36)**: 33311-8.

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

Todas as imagens obtidas por Microscopia Confocal foram gravadas neste CD para que os membros da banca possam ter acesso aos vídeos e a figuras com alta resolução.

As figuras estão em formato TIF e os vídeos estão em formato AVI na pasta “suplemento” deste CD. Os vídeos também podem ser visualizados em arquivo PPT com uma pequena descrição e setas indicando a região da célula onde o evento citado pode ser visualizado.

*** As figuras deste CD podem ser utilizadas para fins didáticos desde que citada a fonte.**