

ANA PAULA LAPPAS GIMÉNEZ

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INTERAÇÕES
REALIZADAS PELA PROTEÍNA PRION CELULAR NO
SISTEMA OLFATÓRIO**

Curitiba
2012

ANA PAULA LAPPAS GIMÉNEZ

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INTERAÇÕES
REALIZADAS PELA PROTEÍNA PRION CELULAR NO
SISTEMA OLFATÓRIO**

Dissertação apresentada como
requisito parcial à obtenção do
título de Mestre pelo Programa
de Pós-Graduação em
Microbiologia, Parasitologia e
Patologia Básica da
Universidade Federal do Paraná

Orientadora Prof.^a Dr.^a Adriana
Frohlich Mercadante.

Curitiba
2012

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Giménez, Ana Paula Lappas

Identificação e caracterização de interações realizadas pela proteína prion celular no sistema olfatório. / Ana Paula Lappas Giménez. – Curitiba, 2013.

87 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Adriana Frohlich Mercadante

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica.

1. Prions 2. Olfato I. Título II. Mercadante, Adriana Frohlich III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica.

CDD (20. ed.) 591.21826



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

**“IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INTERAÇÕES
REALIZADAS PELA
PROTEÍNA PRION CELULAR NO SISTEMA OLFATÓRIO”**

Por

ANA PAULA LAPPAS GIMÉNEZ

**Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos
professores:**

Adriana F. Mercadante
Profª. Drª. Adriana Frohlich Mercadante (presidente)

Giseli Klassen
Profª. Drª. Giseli Klassen

Nilson Ivo Tonin Zanchin
Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin

Profª. Drª. Sheila Maria Brochado Winnischofer
Membro suplente

Curitiba, 15 de março de 2013.

Aos meus pais.

*“Enquanto houver vocês do outro lado,
aqui do outro eu consigo me orientar.” (TM).*



VOU DEIXAR ELAS BEM
AFIADAS, AÍ VOU TER
GARRAS QUE NEM AS SUAS.



SEM GARRAS RETRÁTEIS,
SEM DEDÕES DO PÉ
OPOSITORES, SEM CAUDA
PREËNSIL, SEM OLHOS
COMPOSTOS, SEM PRESAS,
SEM ASAS...

SUSPIRO...



WETA

Bill Watterson

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, **Teodora**, por todo o carinho do mundo, por nunca me deixar desistir e por ser sempre meu porto seguro. Amo você.

Ao meu pai, **Aniceto**, por me servir de exemplo de comprometimento e responsabilidade. Sinto sua falta.

Ao meu irmão **Victor**, pelo incentivo, por ser o melhor irmão que eu poderia ter, por me compreender e brigar comigo sempre que preciso. Amo você.

Ao meu marido **Vinícius**, por ficar comigo na faculdade nos finais de semana e ser pé quente, por todo amor e dedicação. Amo você.

À minha orientadora, professora **Adriana Frolich Mercadante**, pela confiança, pela atenção e amizade.

Aos professores **Silvio Zanata** e **Lia Nakao**, pela atenção e discussões científicas.

À minha mais que amiga, minha irmã, **Mariana Atherino**, por toda ajuda nos experimentos e todo apoio emocional.

A todo o pessoal do **Laboratório de Neurobiologia**.

À **CAPES** e **REUNI** pelo apoio financeiro.

“E aqueles que foram vistos dançando foram julgados insanos por aqueles que não podiam escutar a música.”

Friedrich Nietzsche

RESUMO

A proteína príon celular (PrP^c) é uma glicoproteína de 33-35 kDa ligada à membrana através de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Está presente em diversos tecidos, sendo encontrada com maior abundância nos neurônios do sistema nervoso. Uma modificação conformacional de PrP^c para sua isoforma patogênica (PrP^{Sc}) é responsável pelas encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs). Apesar de PrP^c ser conservado entre várias espécies, só recentemente a função fisiológica dessa proteína começou a ser elucidada. Vários dados indicam que PrP^c seja uma proteína envolvida em complexos multiprotéicos e, dependendo das interações realizadas, desempenhe funções diferentes, tais como: neuritogênese, neuroproteção, adesão celular, regulação da função sináptica, entre outros. Evidências na literatura indicam que PrP^c está presente no sistema olfatório (no epitélio e bulbo olfatórios) e participa na discriminação do olfato. A forma patogênica dessa proteína, PrP^{Sc}, encontra-se amplamente depositada em células do sistema olfatório e sua presença em secreções nasais, sugere que o epitélio olfatório seja uma via de transmissão das doenças. Com a finalidade de tentar elucidar o papel fisiológico de PrP^c no olfato, o presente trabalho teve como objetivo identificar ligantes dessa proteína, através da varredura de uma biblioteca de cDNA de epitélio olfatório pelo sistema de duplo-híbrido em leveduras. Para isso, construiu-se uma isca correspondente à PrP^c a qual foi expressa de maneira estável nas leveduras e não se mostrou capaz de auto-ativar os genes repórteres da sistema de duplo-híbrido. Empregou-se essa isca na varredura de uma biblioteca de cDNA de epitélio olfatório através da técnica de *mating* e após as etapas de seleção, 10 possíveis candidatos a ligantes de PrP^c foram identificados. De modo geral, são ligantes envolvidos nas vias de transporte de vesículas e citoesqueleto ou na apoptose. Ensaios de co-immunoprecipitação e de *pull down* foram utilizados para a confirmação de algumas dessas interações. Apenas a ligação de beta-catenina com PrP^c foi confirmada por *pull-down*, sugerindo um papel relevante dessa interação nos processos sinápticos e de indução de morte neuronal. Novos ensaios deverão ser realizados para a confirmação das demais interações. O presente trabalho contribuiu na identificação de ligantes inéditos de PrP^c, o que pode ajudar na elucidação de seu papel fisiológico, nas compreensão das bases moleculares do olfato, bem como na determinação de alvos terapêuticos para as doenças relacionadas.

Palavras-chave: PrP^c, duplo híbrido em leveduras, epitélio olfatório.

ABSTRACT

The cellular prion protein (PrP^c) is a 33-35 kDa glycoprotein, bound to cell membrane via a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. It is present in many tissues and is found in greater abundance in neurons of the nervous system. A conformational change of PrP^c to its pathogenic isoform (PrP^{Sc}) is responsible for diseases named transmissible spongiform encephalopathies (TSEs). While PrP^c is conserved among different species, only recently the physiological function of this protein began to be elucidated. Several data indicate that PrP^c is involved in different functions, such as neuriteogenesis, neuroprotection, cell adhesion, regulation of synaptic function, among others. Evidence in the literature indicate that PrP^c is present in the olfactory system (olfactory epithelium and bulb) and participates in the olfaction discrimination. The pathogenic form of the protein, PrP^{Sc}, is largely deposited in the cells of olfactory system and its presence in nasal secretions suggests transmission of diseases via olfactory epithelium. In order to address the physiological role of PrP^c in olfaction, the present study aimed to identify ligands of this protein by screening a cDNA library of olfactory epithelium using the yeast two-hybrid system. For this, a bait corresponding to PrP^c was constructed and was stably expressed in yeast and was not able to self-activate the reporter genes of the two-hybrid system. We applied this bait to screen the olfactory epithelium cDNA library through the technique of mating. At the end of process selection 10 potential candidates for PrP^c ligands were identified. Most of them are involved in vesicle trafficking pathway, cytoskeletal and apoptosis. Co-immunoprecipitation and pull down assays were used to confirm some of these interactions. Only the binding of PrP^c with beta-catenin was validated by pull-down, suggesting a role of this interaction in the processes of synaptic and neuronal death induction. Other experiments should be performed to confirm the others interactions. This work contributed to the identification of novel PrP^c molecular patterns, which may help in the elucidation of PrP^c physiological role, in understanding the molecular basis of smell, as well as for determining therapeutic targets for diseases.

Key-words: PrP^c, yeast two-hybrid system, olfactory epithelium.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. TESTE DE EXPRESSÃO DA ISCA CORRESPONDENTE À PrP ^C POR <i>WESTERN BLOTTING</i>	47
FIGURA 2. ENSAIO DE AUTO-ATIVAÇÃO DA ISCA	48
FIGURA 3. TESTE PARA SELEÇÃO DE COLÔNIAS	51
FIGURA 4. PCR DO LISADO DE LEVEDURAS	52
FIGURA 5. <i>MATING</i> CRUZADO	56
FIGURA 6. DOMÍNIOS ENCONTRADOS DAS PROTEÍNAS LIGANTES DE PrP ^C	57
FIGURA 7.	
FIGURA 8. <i>WESTERN BLOT</i> DA IMUNOPRECIPITAÇÃO	58
FIGURA 9. <i>WESTERN BLOT</i> REFERENTE AO <i>PULL DOWN</i>	59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. LIGANTES FISIOLÓGICOS PUTATIVOS DA PROTEÍNA PRÍON	22
TABELA 2: RELAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DAS COLÔNIAS POSITIVAS PARA SELEÇÃO	35
TABELA 3. RESUMO DA VARREDURA POR DUPLO-HÍBRIDO COM A ISCA CORRESPONDENTE À PrP ^C	51
TABELA 4. PROTEÍNAS EM FASE COM O PLASMÍDEO	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD – Domínio ativador da transcrição

ADAM23 – Domínio desintegrina e metaloprotease 23

ATP – Adenosina trifosfato

Btf3 – Fator básica de transcrição

cDNA – DNA complementar

Chmp2a – Proteína multivesicular carregada 2A

Col1a2 – Colágeno tipo 1 alfa 2

Col3a1 – Colágeno tipo 3 alfa 1

Ctnnb1 – beta catenina associada à caderina 1

DHC – Cadeia pesada da dineína

DMH – Núcleo dorsomedial do hipotálamo

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DNA-BD – Domínio ligante ao DNA

DO – Densidade óptica

DUBS – Enzimas deubiquitiladoras

Dyn1t1b – cadeia leve da dineína tipo 1

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ER – Retículo endoplasmático

ERAD – Degradação associada ao retículo endoplasmático

ESCRT – Complexo de endereçamento endossomal necessário para o transporte

GPCR – Receptor acoplado à proteína G

GPI – Glicosilfosfatidilinositol

Gsk3 – Glicogênio sintetase quinase 3

GST – Glutathione S transferase

GSTM – GST da família UM

GSTT – GST da família TETA

Hih – Histidina

Hnrnpk – Ribonucleoproteína nuclear heterogênea K

HRP – do inglês, *horseradish peroxidase*

Hsp – Proteína do choque térmico (do inglês, *Heat shock protein*)

IP – Imunoprecipitação

Leu – Leucina

LiAc – Acetato de lítio

LPS – Lipopolissacarídeo

MT – Microtúbulo

MVB – Corpo multivesicular endossomal

N4bp1 – Proteína 1 ligante de NEDD4

NOS – Neurônio olfatório sensorial

OB – Bulbo olfatório (do inglês, *olfactory bulb*)

OE – Epitélio olfatório (do inglês, *olfactory epithelium*)

OEC – Células do epitélio olfatório

ON – Nervo olfatório

ONL – Camada de nervo olfatório

OR – Receptor olfatório (do inglês, *olfactory receptor*)

pb – Pares de base

PCR – Reação em cadeia da polimerase

Pcsk5 – Proproteína convertase subtilina/quexina 5

Pkm2 – Piruvato quinase

Prnp – Gene que codifica para PrP^C

PrP^C – Proteína príon celular

PrP^{Sc} – Proteína príon *scrapie*

RNA – Ácido Ribonucléico

Rpsa – Proteína ribossomal AS

S100A5 – Proteína ligante de cálcio A5

SDS – Dodecil sulfato de sódio

STI1 – do inglês, *Stress inducible phosphoprotein 1*

STUB1 – STIP1 homology and U-Box containing protein 1

TBST – Tampão salino Tris adicionado de Tween-20

Tgfb1 – Fator transformador de crescimento beta 1

TLR – do inglês, *Toll like receptor*

TRP – Domínios repetidos de tetratricopeptídeos

Trp – Triptofano

TSE – Encefalopatia espongiforme transmissível

UPS – Sistema proteossomal via ubiquitina

Ura – Uracil

Vim – Vimentina

VPS – Proteína de triagem vacuolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVO GERAL	17
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 O SISTEMA OLFATÓRIO	18
2.2 PRÍONS E A PROTEÍNA PRÍON CELULAR.....	20
2.3 LIGANTES DE PRÍONS	22
2.4 PrP ^C E PRÍON NO SISTEMA OLFATÓRIO	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 SISTEMA DE DUPLO-HÍBRIDO EM LEVEDURAS	29
3.1.1 Biblioteca de Epitélio Olfatório.....	32
3.1.2 Varredura da biblioteca através de <i>mating</i>	33
3.1.3 Potencial de Transativação	34
3.1.4 Seleção de Colônias Candidatas	35
3.2 LISE DE LEVEDURAS E EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL	36
3.2.1 <i>Beads</i> de vidro – Lavagem Ácida.....	36
3.2.2. Lise de leveduras	36
3.2.3 Precipitação de DNA Plasmidial.....	37
3.2.4 PCR do lisado de leveduras	37
3.3 SEQUENCIAMENTO A PARTIR DA PCR DO LISADO DE LEVEDURAS	38
3.4 PREPARO DE BACTÉRIAS <i>Escherichia coli</i> DH5 α	
ELETROCOMPETENTES.....	39
3.5 ELETROPORAÇÃO	39
3.6 PCR DE COLÔNIA.....	40
3.7 TRANSFORMAÇÃO DE LEVEDURAS EGY48 COM LIGANTES JÁ	
ENCONTRADOS PARA REALIZAÇÃO DE <i>MATING</i> CRUZADO (ADAPTADO	
DE WOODS E GIETZ (2005))	40
3.8 <i>MATING</i> CRUZADO.....	41
3.9 CONFIRMAÇÃO DAS INTERAÇÕES OBTIDAS	42
3.9.1 Co-imunoprecipitação.....	42
3.9.2 <i>Pull Down</i>	44
4 RESULTADOS	46

4.1 RESULTADOS PRÉVIOS	46
4.2 VIABILIDADE DA BIBLIOTECA PARA <i>MATING</i>	48
4.3 POTENCIAL DE TRANSATIVAÇÃO	49
4.4 SELEÇÃO DE COLÔNIAS	50
4.5 PCR DE LEVEDURAS	51
4.6 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS.....	53
4.7 CONFIRMAÇÃO DAS INTERAÇÕES ATRAVÉS DE ENSAIO DE <i>MATING</i> CRUZADO (<i>CROSS-MATING ASSAY</i>)	55
4.8 CONFIRMAÇÃO DAS INTERAÇÕES POR OUTROS MÉTODOS.....	57
4.9 IDENTIFICAÇÃO DOS LIGANTES EM EXTRATOS PROTÉICOS.....	58
4.8.1 Imunoprecipitação (IP)	59
4.8.2 <i>Pull Down</i>	60
5 DISCUSSÃO	61
5.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS DAS INTERAÇÕES OBTIDAS	61
5.2 DISCUSSÃO DOS LIGANTES ENCONTRADOS	64
5.2.1 Vimentina (Vim).....	64
5.2.2 Proteína quinase rica em serina/arginina 2 (SrpK5)	65
5.2.3 Proproteína convertase subtilisina/quexina 5 (Pcsk5).....	67
5.2.4 Fator transformador de crescimento beta 1 (Tgfb1)	68
5.2.5 Glutathione S transferase M1 (Gstm1).....	69
5.2.6 Cadeia leve da dineína (Dyn1t1b)	70
5.2.7 Proteína 1 ligante de NEDD4 (N4bp1)	71
5.2.8 Beta catenina associada à caderina 1 (Ctnnb1).....	72
5.2.9 Proteína multivesicular carregada 2A (Chmp2a).....	74
5.2.10 STIP1 homology and U-Box containing protein 1 (Stub1)	75
6. CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1 INTRODUÇÃO

Como será visto, o objetivo principal do presente trabalho é o de identificar e caracterizar ligantes para a proteína príon celular (PrP^c) no epitélio olfatório. Essa molécula se encontra na superfície de vários tipos celulares e é abundante no sistema nervoso central. Uma de suas propriedades mais notáveis consiste na capacidade de sofrer mudanças estruturais e gerar uma isoforma denominada de Scrapie (PrP^{Sc}), agente etiológico de várias doenças conhecidas como encefalopatias espongiformes transmissíveis. Apesar de PrP^c ser conservado entre várias espécies, só recentemente a função fisiológica dessa proteína começou a ser elucidada. Vários dados indicam que PrP^c seja uma proteína envolvida em complexos multiprotéicos e, dependendo das interações realizadas, desempenhe funções diferentes, tais como: neuritogênese, neuroproteção, adesão celular, regulação da função sináptica, entre outros (MARTINS *et. al.*, 2010). Evidências na literatura indicam que PrP^c está presente no sistema olfatório (no epitélio e bulbo olfatórios) e participa na discriminação do olfato. A forma patogênica dessa proteína, PrP^{Sc}, encontra-se amplamente depositada em células do sistema olfatório e sua presença em secreções nasais, sugere que o epitélio olfatório seja uma via de transmissão das doenças. Assim, a identificação de ligantes de PrP^c no contexto do epitélio olfatório pode trazer pistas importantes de seu papel no olfato e também poderá ajudar no desenvolvimento de terapias para o tratamento e para evitar a transmissão das doenças relacionadas.

Assim, o presente trabalho propõe identificar ligantes de PrP^c através do sistema de duplo-híbrido, usando uma biblioteca de cDNA de epitélio olfatório. As interações obtidas poderão trazer pistas importantes sobre o papel de PrP^c no olfato, ajudar no esclarecimento da transmissão das doenças associadas, além de contribuir para desvendar as bases moleculares do olfato.

1.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo principal identificar e caracterizar interações realizadas entre PrP^c e outras proteínas expressas no epitélio olfatório de camundongo através do sistema de duplo-híbrido em leveduras.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste projeto incluem:

- 1) Realização da varredura da biblioteca de cDNA de epitélio olfatório de camundongo com a isca correspondente à PrP^c (previamente construída) ;
- 2) Identificação dos ligantes obtidos;
- 3) Confirmação das interações obtidas;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O SISTEMA OLFATÓRIO

Uma enorme quantidade de moléculas voláteis, com as mais variadas estruturas químicas, podem ser detectadas e discriminadas pelo sistema olfatório dos mamíferos. Os homens, por exemplo, que apresentam o sentido do olfato pouco desenvolvido em relação aos outros animais, são capazes de reconhecer cerca de 10.000 aromas diferentes. Esse poder discriminatório do sistema olfativo vem sendo amplamente estudado e ainda há muitas questões não respondidas sobre esse assunto.

Dois sistemas olfatórios desenvolveram-se na maioria dos animais. O sistema olfatório principal ou comum, que é o sensor do meio ambiente utilizado pelos animais para encontrar comida, por exemplo. Um sistema olfatório secundário ou acessório desenvolveu-se com a função específica de encontrar um parceiro receptivo. Conhecido como sistema vomeronasal, esse sistema olfatório reconhece sinais espécie-específicos produzidos por um dos sexos, e é reconhecido pelo outro, influenciando o comportamento sexual (FIRESTEIN, 2001).

O sistema olfatório é relativamente simples se considerar que, dos receptores periféricos até as áreas ligadas à emoção ou áreas cognitivas, há apenas uma sinapse que acontece no bulbo olfatório e outra nas áreas superiores do sistema nervoso central. Ao contrário das outras modalidades sensoriais dos mamíferos, o olfato não passa as informações pelo tálamo. Ele atinge diretamente o córtex após passar pelo bulbo. Isso significa que o bulbo olfatório é responsável, sozinho, pela realização de todo o processamento sensorial do olfato para que a informação fique em uma linguagem acessível para o resto do cérebro (WILSON, R. I.; MAINEN, 2006).

As substâncias odorantes são detectadas por diversos receptores expressos por neurônios olfatórios sensoriais (NOS) no epitélio olfatório principal. Aparentemente, cada neurônio expressa um único receptor olfatório (OR de *olfactory receptor*), mas ainda há dúvidas quanto a isso. Sabe-se também que um único receptor é capaz de reconhecer mais de um odor, e que vários OR são ativados por um único odorante. Entretanto, substâncias

diferentes ativam grupos de receptores diferentes (MOMBAERTS, 2006; MALNIC *et al.*, 1999; VASSAR *et al.*, 1994). Sendo assim, receptores olfatórios são usados em combinação, de modo que se poderiam gerar mais de um bilhão de diferentes “códigos de odores”, permitindo a identificação de uma quantidade quase ilimitada de substâncias odoríferas (MALNIC, B *et al.* (1999).

As bases moleculares do olfato vêm sendo elucidadas e a descoberta dos ORs se mostrou essencial para o melhor entendimento da capacidade discriminatória deste sentido. Os ORs são membros da superfamília de receptores acoplados à proteína G (GPCR) e são principalmente expressos no epitélio olfatório, localizando-se na membrana celular dos neurônios sensoriais deste tecido. Possuem uma estrutura de sete domínios transmembrana, característico da família GPCR. Cerca de mil genes para esses receptores foram identificados nos mamíferos, fazendo desta a maior superfamília de genes nesses animais. A estrutura genética comum é formada por uma região codificadora sem íntrons de cerca de uma quilobase, terminada por uma região de poliadenilação, além de regiões separadas de éxons não-codificadores (ZHANG *et al.*, 2004; ZHANG & FIRESTEIN, 2002). Apesar da grande variabilidade de receptores, o reconhecimento de odores requer uma estratégia de combinação em que a maioria dos receptores é capaz de reconhecer mais de um odorante (provavelmente relacionados quimicamente). Os receptores são ligados à proteína G e possuem regiões de hipervariabilidade nos locais em que provavelmente ocorre a conexão com os ligantes. Depois que essa interação ocorre, uma cascata de eventos se inicia e transforma a energia química da ligação em um sinal neuronal (através da proteína G).

A técnica utilizada neste trabalho foi o duplo híbrido em leveduras. Ela é uma tecnologia bastante usada nos dias de hoje para detectar interações proteicas *in vivo*. Durante o seu pós-doutorado, a orientadora do presente trabalho padronizou e desenvolveu no laboratório da Dra. Bettina Malnic (Depto. Bioquímica-IQ, USP) um sistema de duplo-híbrido em leveduras para identificar proteínas ligantes de receptores olfatórios. Outra ferramenta importante produzida foi uma biblioteca de cDNA de epitélio olfatório. Varreduras dessa biblioteca com diferentes iscas foram realizadas e atestaram que a representatividade das mensagens do epitélio olfatório foi mantida na biblioteca em questão (KERR *et al.*, 2008; VON DANNECKER *et al.*, 2005). A

técnica está descrita em detalhes no item Material e Métodos. Como será visto, a metodologia do duplo-híbrido foi utilizada para a identificação de ligantes da proteína príon celular (PrP^c), a qual será descrita nos próximos itens, sobretudo no contexto do olfato.

2.2 PRÍONS E A PROTEÍNA PRÍON CELULAR

A proteína príon celular (PrP^c) é uma glicoproteína de 33-35 kDa que é ligada à membrana através de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) após a clivagem de um peptídeo sinal de 22 aminoácidos. A proteína contém uma ponta flexível N terminal de 100 aminoácidos. Três domínios de alfa-hélice inter espaçados por dois domínios de beta-conformação formam um domínio globular (LINDEN *et al.*, 2008). A presença da âncora de GPI parece ter pouco efeito na conformação da proteína na membrana celular, mas ainda não se sabe se pode eventualmente alterar a sua função biológica. (LINDEN *et al.* 2008).

O PrP^c está normalmente presente em vários tecidos e tipos celulares, mas está mais concentrada no sistema nervoso central (BENDHEIM *et al.*, 1992). Nas doenças relacionadas aos príons (doenças priônicas), há uma modificação conformacional da proteína príon celular para uma isoforma insolúvel – que se caracteriza como o principal evento patogênico dessas doenças –, de conformação anormal e resistente a proteases, denominada *príon scrapie* (PrP^{Sc}) (MEYER *et al.*, 1986). Príon *scrapie* (PrP^{Sc}) é o único constituinte das partículas infecciosas denominadas príons [*proteinaceous infectious particle*]. Essa isoforma transmissível ou patogênica da PrP^c é responsável pelas encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSE), um grupo de doenças neurodegenerativas fatais que afetam tanto os homens quanto os animais, também conhecidas como doenças priônicas (BOLTON & McKINLEY, 1982). A PrP^{Sc} acumula-se nas células e em depósitos extracelulares similares a placas, convertendo mais proteínas normais à forma patogênica, disparando a neurodegeneração (WILSON & NIXON, 2009). As doenças priônicas podem ocorrer na forma familiar (Doença de Creutzfeldt-Jacob – CJD), adquirida (Encefalopatia Espongiforme Bovina, Kuru, Doença de

Creutzfeldt-Jacob iatrogênica e variante – iCJD e vCJD) ou esporádica (sCJD), sendo que todas parecem ser transmissíveis sob certas circunstâncias (HEAD *et al.* 2004).

Mesmo que a definição de príons tenha sido estabelecida há mais de vinte anos, muito pouco é conhecido sobre a sua função normal. A maioria do que se sabe sobre as funções vem do estudo das doenças provocadas por essas proteínas infecciosas. Apesar de se acreditar que a conversão da proteína normal para a forma PrP^{Sc} implica em um aumento da função tóxica, ainda não foi descartado que a perda da função da PrP^c esteja envolvida nas doenças relacionadas (WILSON & NIXON, 2009). Se este for o caso, o entendimento da função normal da proteína pode ajudar a elucidar o mecanismo molecular das doenças causadas por príons (STEELE, LINDQUIST & AGUZZI, 2007). Parece pouco provável que a proteína PrP tenha evoluído apenas para permitir o desenvolvimento de uma doença fatal e, realmente, funções novas têm sido sugestivamente atribuídas à proteína, relativas ao estresse e comportamento, ao ciclo sono-vigília e memória, por exemplo (LE PICHON *et al.*, 2009; WILSON & NIXON, 2009; LINDEN *et al.*, 2008; STEELE *et al.*, 2007).

O gene *Prnp* possui três (ratos, camundongos, bovinos e ovinos) ou dois éxons (homem, hamster), dos quais um único éxon codifica ambas as proteínas príon celular e a proteína *scrapie*. Portanto, as duas formas dessa proteína apresentam a mesma sequência de aminoácidos. A diferença entre as proteínas geradas por esse gene está na sua estrutura terciária. A forma normal é formada principalmente por cadeias de alfa-hélice, enquanto a patogênica é convertida a, principalmente, uma conformação de “folha pregueada” em beta (LINDEN *et al.*, 2008). Estudos com camundongos nocautes, nos quais o gene que codifica para PrP^c foi removido, demonstraram que esses animais são resistentes às doenças causadas por príons (BÜELER *et al.*, 1993; BÜELER *et al.*, 1992), porém desenvolvem-se normalmente, sem alterações fenotípicas mais grosseiras. Como já mencionado, várias funções biológicas têm sido atribuídas à proteína PrP^c, relativas ao estresse e comportamento, ao ciclo sono-vigília e memória, aos processos de neuritogênese e neuroproteção, de adesão celular, entre outros (revisado por LINDEN *et al.*, 2008). Muitas destas funções foram elucidadas com a

descoberta de ligantes de PrP^c. A seguir serão apresentados alguns dados obtidos da literatura sobre vários ligantes de PrP^c, os quais foram identificados através de várias metodologias, inclusive através do sistema de duplo-híbrido em leveduras, técnica abordada no presente trabalho.

2.3 LIGANTES DE PRÍONS

Há vários trabalhos na literatura que identificaram e/ou caracterizaram ligantes para PrP^c e PrP^{sc}. A Tabela 1 revisa algumas destas interações (revisado por LINDEN *et al.*, 2008).

Ligante	Descrição	Método
Sinapsina 1b	Regulação de liberação de vesículas sinápticas	Duplo-híbrido
PSD-95	Postsynaptic density scaffolding protein*	Biblioteca de cDNA de cérebro de camundongo lambda-gt11
Grb	Proteína adaptadora para receptores de tirosina quinase	Duplo-híbrido
GASP	Proteína de classificação associada à receptor acoplado à proteína G	Biblioteca de cDNA de cérebro de camundongo lambda-gt11
14-3-3	Proteína base intracelular	Sobreposição, MS
CK2	Proteína quina	Sobreposição, SPR
Fyn, ZAP70	Proteína tirosina quinase, solúvel	Co-IP
PTPD1	Proteína tirosina fosfatase	Biblioteca de cDNA de cérebro de camundongo lambda-gt11
Adolase C/zebrina II	Enzima da via glicolítica	Sobreposição, co-IP, MS
Bcl-2	Proteína anti-apoptótica	Duplo-híbrido

Fbx6/Fbxo2	Unidade de reconhecimento de substrato para o complexo ubiquitina ligase	Biblioteca de cDNA de cérebro de camundongo lambda-gt11
GFAP	Proteína de filamento intermediário	Sobreposição
DNA	Ácido nucléico	Medições biofísicas
RNA	Ácido nucléico	EMSA
HNrnp A2B1	Proteína ligante de RNA	Sobreposição, co-IP, MS
Nrf2	Fator de transcrição	Biblioteca de cDNA de cérebro de camundongo lambda-gt11
Pint1	Motivo exonuclease	Duplo-híbrido
Hsp60	Chaperona	Duplo-híbrido
αB-crystalina	Pequeno Hsp indutor de stress	Duplo-híbrido, N-PAGE, biosensor óptico
BiP-Grp78	Chaperona do retículo endoplasmático	Co-IP
Hop/STI1	Co-chaperona	Hidropatia complementar, ensaios de ligação
Laminina	Componente da matriz extracelular	Ensaio de ligação
LRP/LR	Precursor do receptor de laminina/ Receptor de laminina	Duplo-híbrido, ligação celular
NCAM	Molécula de adesão celular	Cross-ligação, Co-IP
LRP1	Scavenger receptor*	Cross-ligação, Co-IP, ensaios de ligação
Beta-distroglicana	Proteína transmembrana	Co-IP, sensibilidade a detergente
APLP1	Proteína tipo precursor amilóide	Biblioteca de cDNA de cérebro de camundongo lambda-gt11
Heparina/Sulfato	Glicosaminoglicanas	SPR, ELISA

heparano
**Proteínas de 50,
56, 64, 72 e 110
kDa**

Não indentificadas

Sobreposição

TABELA 1. LIGANTES FISIOLÓGICOS PUTATIVOS DA PROTEINA PRÍON

FONTE: Adaptado de LINDEN (2008)

NOTA: MS – Espectometria de massa; SPR – surface plasmon resonance; EMSA – Ensaio de motilidade de deslocamento eletroforético; N-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante; ELISA – ensaio imunoenzimático; optou-se por não traduzir a Descrição marcada com *.

A orientadora do presente projeto participou de trabalhos que caracterizaram algumas dessas interações: com as proteínas de matriz extracelular, laminina (GRANER *et al.*, 2000a e 2000b) e vitronectina (HAJJ *et al.*, 2007), com a co-chaperona STI-1 (*stress inducible protein 1*) (MARTINS *et al.*, 1997; ZANATA *et al.*, 2002) e com ADAM23. Como pode ser visto na tabela 1, diferentes trabalhos já utilizaram o PrP^c como isca no sistema duplo-híbrido, com bibliotecas diversas, encontrando diferentes proteínas capazes de fazer a interação com a proteína de interesse. Kurschner e Morgan (1995) utilizaram a proteína Bcl-2 como isca, e, cruzando contra uma biblioteca de cDNA cerebelar, encontraram interação com PrP^c. Sugere-se que o acúmulo de príons patogênicos possa interferir na função dessa proteína, contribuindo para a morte neuronal. A interação entre PrP^c e a proteína do choque térmico (Hsp-60) foi verificada quando foi utilizada uma biblioteca de cDNA de células HeLa (EDENHOFER *et al.*, 1996). O mesmo grupo posteriormente identificou a interação entre a proteína príon celular e o receptor de laminina de 37kDa (RIEGER *et al.*, 1997). Estes pesquisadores atestam que, não só o receptor de laminina está presente na superfície neuronal, juntamente com PrP^c, mas também encontra-se mais concentrado em órgãos em que há maior acúmulo de PrP^{Sc} depositada quando há doenças causadas por príons, como o cérebro e o baço. Spielhauer e Schätzl (2001) procuraram por interações em uma biblioteca de cDNA de cérebro de camundongos BALB/c e encontraram ligações com proteínas de cascatas de sinalização, como Grb2 e Sinapsina1b, sugerindo que PrP^c participe na transdução de sinais, e que, inclusive, a alteração dessas interações pode, futuramente, provar-se como uma abordagem terapêutica das doenças priônicas. Todos os trabalhos citados

evidenciaram o fato de que as ligações são possíveis não apenas *in vitro*, mas também *in vivo*, visto que as proteínas capazes de interagirem entre si encontram-se ou podem encontrar-se no mesmo compartimento celular, seja na membrana plasmática ou no citosol. Mais recentemente, também através do sistema duplo-híbrido em leveduras, outros ligantes de PrP^c foram obtidos, por exemplo, o domínio de tetramerização do canal de potássio (HUANG *et al.*, 2012), a clustrina (XU *et al.*, 2008) e a tetraspanina-7 (GUO *et al.*, 2008). De acordo com alguns autores, essa gama de interações identificadas e caracterizadas indica que a função de PrP^c é condizente com a de uma proteína que serve de plataforma para organização de complexos multiprotéicos (revisado por LINDEN *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2010).

2.4 PrP^c E PRÍON NO SISTEMA OLFATÓRIO

A distribuição de PrP^c no sistema olfatório de camundongos ocorre tanto nos neurônios periféricos quanto nos neurônios centrais, e é restrita a axônios tanto nos NOS do epitélio olfatório quanto nas células mitrais do bulbo olfatório. A glia e as demais células de apoio não parecem expressar a proteína. Porém, as células granulosas apresentam a PrP^c em seus espinhos dendríticos, o que pode indicar uma função pré-sináptica para essa proteína. A presença da proteína príon celular no NOS, nas células mitrais e dendríticas indicam que esta é uma proteína importante para a função do bulbo olfatório (LE PICHON & FIRESTEIN, 2008). Entretanto, outro trabalho cita que, no bulbo olfatório de ratos, o PrP^c está presente tanto em neurônios da camada de células mitrais quanto em células gliais, cercando os glomérulos na camada glomerular. Outras regiões do bulbo olfatório como o plexiforme externo e a camada granular interior não possuem a proteína príon celular (MOLERES & VELAYOS, 2005).

Como já mencionado, a distribuição de PrP^c no cérebro de camundongos é ubíqua, havendo a presença de três isoformas da proteína. A maior e mais abundante das formas inteiras, não clivadas, é a forma diglicosilada, com peso molecular de 33 a 35 kDa, seguida por uma forma monoglicosilada de 30 kDa e finalmente pela isoforma mais leve, não

glicosilada, de 27 kDa. Estruturas como o bulbo olfatório, o córtex cerebral, o estriado e o tálamo apresentam maiores quantidades da proteína, enquanto que estruturas localizadas caudalmente como o hipocampo, o cerebelo e tronco encefálico expressam níveis menores de PrP^c (MOLERES & VELAYOS, 2005). A glicosilação das proteínas já foi ligada à suscetibilidade de conversão conformacional e à diversidade de TSE, podendo afetar também outras propriedades da proteína como a interação com outros ligantes (LINDEN *et al.*, 2008).

O córtex e os tratos olfatórios estão envolvidos tanto na doença CJD hereditária quanto na CJD variante (vCJD). A primeira forma da patogenia é associada a mutações no gene *Prnp*, e a forma variante é marcada pela ausência de mutações ou inserções patogênicas nesse gene, mas com um histórico de exposição dietética ou iatrogênica a fontes infectivas. Entretanto, sabe-se que o polimorfismo do códon 129 tem influência fenotípica tanto nas doenças priônicas hereditárias quanto nas que não têm origem genética (KOVÁCS *et al.*, 2007; ALPEROVITCH *et al.*, 1999).

Em pacientes examinados que apresentavam essas doenças, a proteína príon patológica aparece “depositada” sobre os cílios olfatórios do sistema olfatório principal. Além do epitélio olfatório, a proteína alterada também se encontra sobre o epitélio gustativo e do sistema vômero-nasal, presente tanto no corpo celular quanto nos dendritos apicais das células sensoriais (KOVÁCS *et al.*; 2007; ZANUSSO *et al.*; 2003). Apesar de PrP^c ser igualmente distribuída no epitélio normal olfatório e respiratório, a deposição da proteína patológica parece ser seletiva para o epitélio olfatório, nunca sendo encontrada no epitélio respiratório. A deposição altamente seletiva de PrP^{Sc} nos NOS pode indicar interações com uma das milhares de proteínas receptoras expressadas na porção apical dos cílios desses neurônios. (SBRICCOLI *et al.*, 2009; KINCAID & BARTZ, 2007; ZANUSSO *et al.*, 2003). Nas doenças priônicas, depósitos de príons infecciosos são particularmente pronunciados no trato olfatório. A deposição da proteína infecciosa condiz com o transporte centrífugo através das fibras nervosas olfatórias que descendem do bulbo olfatório. A anosmia tem sido relatada nos pacientes com Creutzfeldt-Jacob, mas deve-se notar que é um sinal comum em doenças neurodegenerativas (KOVÁCS *et al.*; 2007; ZANUSSO *et al.*; 2003), e que, considerando o número de casos da doença de

origem genética, os sinais relacionados a problemas sensoriais estão presentes em apenas 7% do total (KOVÁCS *et al.*, 2002).

A transmissão lateral sabidamente representa um papel importante na epidemiologia das TSE, mas as vias utilizadas pelos agentes infectivos dos hospedeiros infectados para os sadios não são bem conhecidas. A cavidade nasal é uma forma possível de entrada do agente com um forte apelo: animais possuem sistemas olfatórios bem desenvolvidos, usados amplamente desde a procura por parceiros até a procura por alimentos (KINCAID & BARTZ, 2007).

Em trabalho mais recente, Bessen e colaboradores (2010) realizaram experimentos de infecções em hamsters com PrP^{sc} e os dados obtidos sugerem que a infecção por príons pode ser replicada em altos níveis nos neurônios do epitélio olfatório e que quantidades significativas de PrP^{sc} podem ser recuperadas em lavagens nasais de animais infectados (Bessen *et al.*, 2010). Dessa forma, o epitélio olfatório constitui uma via importante de transmissão das doenças causadas por príons e a identificação de ligantes de PrP^c no contexto deste tecido, objetivo do presente projeto, poderá ajudar no desenvolvimento de inibidores dessa via de transmissão. Camundongos nocautes para o gene *Prnp* (que codifica para PrP^c) mostram comportamento retardado em testes olfatórios e atividade eletrofisiológica alterada na sinapse dendrodendrítica no bulbo olfatório. Apesar disso, esses animais não são anósmicos, ou seja, têm alguma capacidade olfatória. O déficit observado refere-se principalmente à discriminação de odores. Aparentemente, a alteração comportamental observada nos animais nocautes é dependente da expressão de PrP^c no sistema nervoso central, já que animais transgênicos “recuperados” do nocaute que voltavam a expressar PrP^c nos neurônios centrais mas não nos neurônios sensoriais do epitélio olfatório apresentavam respostas normais em testes do olfato. Foi constatado que as células mitraes do bulbo olfatório receberiam uma inibição facilitada nos animais nocaute, com alterações nas propriedades das sinapses dendrodendríticas (LE PICHON *et al.*, 2009). De fato, outro trabalho mais recente mostrou que o PrP^c presente no epitélio olfatório não participa de eventos precoces relacionados com a transdução de sinal do olfato (DIBATTISTA *et al.*, 2011). Entretanto a sua expressão nos neurônios sensoriais, tanto nos dendritos e corpos celulares (em

menor abundância), quanto nos axônios (em maior abundância) é evidente (DIBATTISTA *et al.*, 2011; LE PICHON e FIRESTEIN, 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SISTEMA DE DUPLO-HÍBRIDO EM LEVEDURAS

A Professora Doutora Adriana Frohlich Mercadante, durante o seu pós-doutorado desenvolvido no laboratório da Doutora Bettina Malnic (Departamento Bioquímica – IQ, USP), padronizou e desenvolveu um sistema de duplo-híbrido em leveduras para identificar proteínas ligantes de receptores olfatórios.

A técnica do sistema do duplo-híbrido em levedura baseia-se no fato de que vários reguladores de transcrição nos eucariontes são formados por domínios fisicamente separados e funcionalmente independentes. Esses reguladores contêm um domínio de ligação ao DNA, que se liga a seqüências específicas do promotor, e um domínio de ativação, que direciona o complexo da RNA polimerase II a transcrever o gene que é expresso sob essa promoção. Normalmente, esses dois domínios integram uma mesma proteína. Através da tecnologia do DNA recombinante é possível separar fisicamente esses dois peptídeos que, quando expressos em uma mesma célula, não poderão ativar a transcrição a menos que sejam aproximados fisicamente na região do promotor (BRENT & PTASHNE, 1985).

O sistema duplo-híbrido “DupLex-A™” (OriGene Technologies, Inc.) que utilizamos fornece vetores que permitem a clonagem de genes que codificam para proteínas capazes de interagir entre si e permitem também a co-expressão destas proteínas nas células de levedura em fusão com os domínios de ligação ao DNA (DNA-BD) e de ativação da transcrição (AD) separadamente. Nesse sistema, o DNA-BD vem como parte da proteína LexA de procariontes e o AD é o peptídeo de 88 resíduos (B42) que ativa a transcrição em levedura. A interação entre uma proteína de interesse que é expressa em fusão com o DNA-BD (isca) e uma outra proteína codificada por um gene presente em uma biblioteca de cDNA expressa em fusão com o AD (alvo) cria um novo ativador transcricional capaz de ativar genes-repórteres regulados por operadores LexA. O produto gerado pela expressão destes genes-repórteres faz com que ocorra uma alteração fenotípica na levedura, sendo então possível dizer se houve ou não a interação protéica (AUSUBEL *et. al.*, 1999).

Uma ferramenta importante produzida pela orientadora desse projeto foi uma biblioteca de cDNA de epitélio olfatório de camundongo. Essa biblioteca possui cerca de 2×10^6 clones independentes, com insertos de tamanhos de 300 – 4000 pares de bases (pb). Varreduras dessa biblioteca com diferentes iscas foram realizadas e atestaram que a representatividade das mensagens do epitélio olfatório foi mantida na biblioteca em questão (VON DANNECKER, *et. al.*, 2005; KERR *et. al.*, 2008). Tanto a biblioteca quanto os componentes do *kit* "DupLex-A™ - Yeast Two-Hybrid System" (OriGene) foram gentilmente cedidos pela Dra. Bettina Malnic (IQ-USP) e encontram-se disponíveis no nosso laboratório.

A seguir encontram-se algumas informações sobre as cepas de levedura e os vetores fornecidos neste *kit*.

- Leveduras (cepas):

- EGY48 - MAT α *trp1 his3 ura3 leu2::* 6 LexAop-LEU2

Essa cepa possui o gene repórter LEU2 integrado ao cromossomo, controlado por seis operadores LexA. Quando esse gene é expresso, essa levedura é capaz de crescer em meio sem leucina. A biblioteca de cDNA de epitélio olfatório foi transformada nessa cepa.

- RFY206 - MAT α *trp1 Δ ::hisG his3 Δ 200 ura3-52 lys2 Δ 201 leu2-3*

Nessa cepa são inseridos os vetores da isca e o vetor contendo o gene repórter lacZ. A RFY 206 e a EGY 48 são capazes de se juntar e formar células diplóides.

- Vetores:

- Repórter

pSH18-34 - URA3, 2 μ m, Ap^R, 8ops.-lacZ → expressa o gene repórter lacZ.

- Construção da isca

pGilda - HIS3, CEN, Ap^R → possui o promotor GAL1 que permite a expressão da proteína de fusão LexA-isca apenas quando a única fonte de carbono for a galactose. A sequência CEN-centromêro- mantém o plasmídeo em uma única

cópia por célula. Oligonucleotídeos específicos foram utilizados para amplificar a sequência de DNA que codifica para a proteína PrP^c, através da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase). Esse fragmento foi então inserido no vetor pGilda. Após a construção, o vetor correspondente a isca foi transformado em RFY206 e ensaios para averiguar a expressão correta e a não ativação de genes repórteres pela isca (auto-ativação) foram realizados como descrito em Ausubel *et. al.*, 1999. Esses procedimentos foram realizados pelo aluno Mestre Breno Beirão durante o seu mestrado no laboratório de Neurobiologia do Dpto. De Patologia Básica da UFPR.

- Construção da biblioteca

pJG4-5 - TRP1, 2 μ m \rightarrow expressa o domínio de ativação B42, seguido do epítipo HA, em fusão com proteínas da biblioteca de cDNA. Essa expressão está sob a regulação do promotor GAL1, induzível por galactose. Como já mencionado, já temos disponível uma biblioteca de cDNA de epitélio olfatório inserida no vetor pJG4-5 e transformada em leveduras EGY48.

Para varrer uma mesma biblioteca com várias iscas diferentes é necessário que seja feito um *mating* entre a cepa de levedura que expressa a isca e a cepa pré-transformada com a biblioteca de cDNA (AUSUBEL *et al.*, 1999). Essa abordagem permite várias varreduras com diferentes iscas de uma biblioteca transformada uma única vez com alta eficiência na levedura.

Para a realização do *mating*, a biblioteca de cDNA é transformada na cepa de levedura que contém o repórter LEU2 (EGY48). Esse gene, quando expresso, permite o crescimento das células em meio sem leucina. Essa biblioteca pré-transformada pode ser congelada em várias alíquotas e usada em varreduras individuais com diferentes iscas. As iscas são expressas em uma outra cepa, de *mating type* oposto ao da pré-transformada com a biblioteca (RFY206) que também contém o plasmídeo repórter lacZ (pSH18-34). A varredura é feita misturando-se as duas cepas para que haja a formação de diplóides. Estes são então induzidos (com galactose) para a expressão das proteínas da biblioteca e da isca e plaqueados em meio adequado para avaliar a atividade dos genes repórteres e, conseqüentemente, identificar as prováveis interações.

Maiores detalhes sobre a metodologia de varredura através do *mating* encontram-se em Golemis *et. al.*, 2008.

3.1.1 Biblioteca de Epitélio Olfatório

Para a realização da varredura através de *mating* foi utilizada uma biblioteca de epitélio olfatório (OE) construída pela Prof^a Dr^a Adriana Frohlich Mercadante. Esta biblioteca foi produzida a partir de cDNA de epitélio olfatório de camundongos.

Varreduras dessa biblioteca com diferentes iscas foram realizadas e atestaram que a representatividade das mensagens do epitélio olfatório foi mantida na biblioteca em questão (VON DANNECKER *et al.*, 2005; KERR *et al.*, 2008). Essa biblioteca de cDNA possui cerca de 10^6 clones independentes, com insertos de tamanho de 300-4000 pares de bases (média de 0,7 Kb). Brevemente, epitélios olfatórios de camundongos foram isolados e os mRNAs poli (A)+ desse tecido foram obtidos com a ajuda do kit "Poly A Quick Kit" (Stratagene[®]). A síntese do cDNA foi feita usando-se oligonucleotídeos dT (kit "Superscript Choice System for cDNA Synthesis"-Gibco/BRL[®]). Adaptadores permitiram a inserção dos cDNAs nos sítios Eco RI e Xho I do vetor pJG4-5. Os passos seguintes de transformação da biblioteca em bactéria e depois em levedura (EGY 48) foram feitos como descrito previamente em AUSUBEL *et al.*, 1999. Como já foi dito, essa técnica permite várias varreduras, com diferentes iscas, de uma biblioteca transformada uma única vez com alta eficiência na levedura. Assim é possível economizar tempo e material nesse passo da transformação, que normalmente é crítico e limitante.

Antes do *mating* é necessário realizar testes de viabilidade das alíquotas de biblioteca congeladas a serem utilizadas.

Uma série de diluições da alíquota foi realizada, de 10^{-2} a 10^{-7} , cada uma com volume final de 200 μ l. Em placas de meio SD Glicose -Trp, foram esgotados 100 μ l das diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} e as colônias, após crescimento, foram contadas. A partir desse valor, é conhecido o volume necessário para realizar o *mating*, onde é preciso utilizar no mínimo 10x mais células em relação ao tamanho da biblioteca (Clontech, 2000).

O mesmo procedimento foi aplicado para as leveduras EGY 48 transformadas com plasmídeo pJG4-5 vazio. Estas leveduras são usadas como controle durante a varredura e devem ser quantificadas para que se use o mesmo número de células que será usado da biblioteca.

3.1.2 Varredura da biblioteca através de *mating*

Para realizar o estudo de interações de proteína através do sistema de duplo-híbrido é necessário ter os plasmídeos da isca, da biblioteca e do gene repórter em uma mesma célula. Tanto o plasmídeo da isca, o pGilda quanto o plasmídeo repórter pSH18-34 foram transformados na levedura RFY206 (MATa) enquanto que os plasmídeos pJG4-5 que portam a biblioteca de OE estão na levedura EGY48 (MAT α). As leveduras são submetidas a um processo de cruzamento (*mating*), onde as duas linhagens se combinam em uma célula diplóide, compartilhando também seus plasmídeos.

Foram coletadas aproximadamente cinco colônias da *master plate* da levedura RFY 206 transformada contendo tanto o plasmídeo repórter como a isca. Estas colônias foram inoculadas em 10 ml do meio SD glicose -His -Ura e incubadas a 30 °C, sob agitação durante a noite. Então, o inóculo foi diluído até a DO₆₀₀ de 0,2 com a adição de SD Glicose -His -Ura e foi incubado até chegar a uma DO₆₀₀ ~1,5. A cultura foi sedimentada centrifugando-se a 1500 xg por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas com água destilada estéril até um volume final de 1ml.

Foram realizados dois cruzamentos por isca: Isca + Controle (EGY 48 transformada com pJG4-5); Isca + Biblioteca.

Foi utilizado 200 μ l da isca do passo acima, para cada cruzamento. Para o cruzamento com a biblioteca de epitélio olfatório, foi utilizado 6×10^7 cfu, e a mesma quantidade da levedura controle.

As duas linhagens foram misturadas e centrifugadas a 1500 xg por 5 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso com 200 μ l de meio YPD. Cada suspensão de 200 μ l foi esgotada em uma placa de meio sólido YPD e incubada por 12-16 horas a 30 °C.

Após a incubação, o tapete de células formado foi raspado com um raspador de células (Corning®) após a adição de 1 ml do meio SD Gal/Raff -His -Trp -Ura. Todo o raspado foi incubado em 100 ml do mesmo meio e as colônias foram induzidas (por galactose) por 6 horas, a 30 °C, sob agitação.

Após a indução, todos os cruzamentos foram centrifugados (em tubos Falcon® 50 ml) a 1500 xg por 5 min. Os precipitados foram lavados com 30 ml de água estéril, e novamente centrifugados. Os precipitados foram então ressuspensos e diluídos até que a suspensão chegasse a DO₆₀₀ de 5, representando 10⁸ células por ml.

Para cada cruzamento, foram feitas diluições seriadas de 300 ul cada uma (de 10⁻¹ a 10⁻⁶). A partir dessas diluições, foram feitas as seguintes placas:

- 100 ul de cada diluição e da suspensão não diluída dos cruzamentos isca + controle e isca + biblioteca em placas Gal/Raff -His -Trp -Ura -Leu;
- 100 ul das diluições 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶ em placas SD Gal/Raff -His -Trp -Ura (+Leu) tanto as leveduras com controle como as com a biblioteca;
- 100 ul por placa do cruzamento isca + biblioteca sem diluir em 20 placas SD Gal/Raff -His -Trp -Ura -Leu.

3.1.3 Potencial de Transativação

O gene LEU2, que possibilita a levedura crescer em um meio sem leucina, está sob a influência do promotor LexA. Este gene está presente no cromossomo da levedura EGY48, e é ativado somente onde existe a presença do domínio de ligação ao DNA LexA e a aproximação de algum domínio ativador. Portanto este gene só deveria ser ativado, e consequentemente permitir o crescimento da levedura em um meio livre de leucina, apenas nas células diplóides onde ocorreu alguma interação da isca com a mensagem (biblioteca) do plasmídeo pJG4-5. O potencial de transativação é a capacidade que as leveduras cruzadas têm de crescerem em meio sem leucina, sem que exista uma interação entre o produto do pGILDA e o produto do pJG4-5.

Para calcular este potencial, o cruzamento isca + controle (levedura EGY48 transformada com o vetor pJG4-5 sem inserto) é utilizado, onde o

número de colônias encontrado na placa SD Gal/Raff -His -Trp -Ura -Leu) é dividido pelo número de colônias encontrado na placa SD Gal/Raff -His -Trp -Ura +Leu. O valor obtido é então multiplicado pelo tamanho da biblioteca para se determinar o número mínimo recomendado de colônias a serem selecionadas para que, dentre estas, uma represente uma interação verdadeira (e não um falso positivo) (AUSUBEL *et. al.*, 1999).

3.1.4 Seleção de Colônias Candidatas

A partir do cálculo do potencial de transativação, foram selecionadas 280 colônias das placas do cruzamento isca + biblioteca. As colônias foram repicadas em duas placas “master plate” SD Gal/Raff -his -trp -ura (+leu), e incubadas a 30 °C por 48 horas. Estas “master plates” serviram como molde para “carimbar” outras quatro placas:

- SD Glicose -His -Trp -Ura -Leu;
- SD Glicose X-Gal -His -Trp -Ura (+Leu);
- SD Gal/Raff -His -Trp -Ura -Leu;
- SD Gal/Raff X-Gal -His -Trp -Ura (+Leu)

Para carimbar, transferindo as colônias da *master plate* para as outras placas, a placa *master* foi pressionada sobre um pedaço de veludo estéril apoiado sobre um disco rígido de mesmo diâmetro que a abertura interna de uma placa de petri. Em seguida as outras placas foram pressionadas uma a uma sobre esse tecido. As placas foram incubadas na estufa a 30 °C, acompanhadas até 96 horas. A seleção de colônias com interações positivas seguiu os seguintes critérios apresentados na Tabela 2.

Placa	Característica
SD Gli -His -Trp -Ura -Leu	Ausência ou pouco crescimento
SD Gli X-Gal -His -Trp -Ura (+Leu)	Coloração branca até 72 horas
SD Gal --His -Trp -Ura -Leu	Crescimento
SD Gal X-Gal -His -Trp -Ura (+Leu)	Coloração azul

TABELA 2: RELAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DAS COLÔNIAS POSITIVAS PARA SELEÇÃO.

FONTE: O autor (2013).

LEGENDA: Estas características ocorrem devido a atuação de dois repórteres. A indução ocorre por galactose, expressando as proteínas de fusão Isca + Lex-A (BD) e Biblioteca + B42 (AD). A aproximação dos domínios BD e AD por interação entre isca + biblioteca, induz a expressão do gene LacZ, provocando a cor azulada em meio enriquecido com X-Gal, e do gene LEU2, permitindo a sobrevivência da colônia em meio sem leucina.

3.2 LISE DE LEVEDURAS E EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

Este método foi utilizado para purificar DNA plasmidial diretamente de culturas líquidas de leveduras. O DNA purificado pode ser aplicado em reações de PCR, eletroporação, digestões enzimáticas entre outros. O método adaptado do manual do usuário da ORIGENE, 2008 deriva do método de lise alcalina (BIMBOIM, 1979), utilizando esferas (*beads*) de vidro lavadas em ácido para romper a parede celular das leveduras, sem a necessidade de utilização de enzimas.

3.2.1 *Beads* de vidro – Lavagem Ácida

Foram utilizados *beads* de vidro de ~2 mm de diâmetro. Seguindo instruções do fabricante (Sigma® 8772), foi utilizado 300 mg de *beads* por lise. A um tubo cônico de 15 ml, foi adicionado HCl 5,8 M em um volume 3x maior que o ocupado pelos *beads* e estes foram incubados por 1 hora. O ácido foi removido e os *beads* foram lavados 10x com água destilada, adicionando-se 3x o volume de *beads* de água, agitando e descartando a água. Após as lavagens, toda a água foi retirada, os *beads* autoclavados por 20 minutos e em seguida secos em estufa de secagem a 65°C durante a noite.

3.2.2. Lise de leveduras

As colônias foram inoculadas em 2 ml de meio SD Glicose –his –ura –trp a 30 °C com agitação por 16-18 horas. As colônias foram sedimentadas por centrifugação a 1500xg por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o

precipitado ressuspenso no volume residual e transferido para um tubo plástico de 1,5 ml. Foram adicionados 200 ul da solução *plasmid rescue* (Triton X-100 2%; SDS 1%; NaCl 0,1 M; Tris pH 8 0,01 M; EDTA 0,001 M). Em seguida foi adicionado 100 ul de fenol tris saturado pH 8,0 e 100 ul de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Foram adicionados então 300 mg dos *beads* lavados em cada lise. Os tubos foram agitados à baixa velocidade por 4 minutos e em seguida centrifugados a 10000 xg por 5 minutos. Em seguida, 200 ul do sobrenadante foram transferidos para outro tubo plástico de 1,5 ml.

3.2.3 Precipitação de DNA Plasmidial

Foram adicionados 20 ul de acetato de sódio 3 M autoclavado, ao tubo de 1,5 ml contendo 200 ul do sobrenadante resultante da lise. O tubo foi vigorosamente agitado e em seguida adicionou-se 400 ul de etanol 95% (Merck®) e novamente agitado. O tubo então foi centrifugado a 10000 xg por 20 minutos a 20 °C. O sobrenadante foi descartado e as paredes do tubo lavadas com etanol 70% (Merck®) gelado. O sobrenadante foi removido e o tubo foi colocado aberto de cabeça para baixo em uma estufa a 37 °C por 15 minutos. A parede do tubo foi lavada e o precipitado ressuspenso com 5 ul de água pura.

3.2.4 PCR do lisado de leveduras

Para a PCR, utilizou-se 0,7 ul do lisado de leveduras para uma reação contendo tampão ótimo para Taq 1x, 1 mM MgCl₂, 2 pM dNTP, 0,4 mM de iniciadores, 0,6U Taq DNA polimerase, obtendo-se um volume final de reação de 25 ul. Os iniciadores utilizados flanqueiam a região de policlonagem do plasmídeo pJG4-5 e permitem a amplificação do inserto. Essa reação foi submetida à um ciclo de 95 °C por dois minutos, 30 ciclos de 95 °C por 40 segundos, 57 °C por 30 segundos e 72 °C por dois minutos e um único e último ciclo de 72 °C por 7 minutos. Ao fim da reação, as amostras foram estocadas a 4 °C.

Iniciadores:

- Iniciador *forward* para o plasmídeo pJG4-5 que anela a 42bp da região de clonagem; Tm: 62°C, CG: 61%, 18mer.

5' CTG AGT GGA GAT GCC TCC 3'

- Iniciador *reverse* para o plasmídeo pJG4-5 que anela a 62bp da região policlonal; Tm: 57°C, CG:53%, 17mer.

5' GCC GAC AAC CTT GAT TG 3'

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo 5 ug/ml.

3.3 SEQUENCIAMENTO A PARTIR DA PCR DO LISADO DE LEVEDURAS

A concentração das amostras resultantes da PCR do lisado de leveduras foram inferidas e utilizadas como *template* para reação de seqüenciamento. Para tanto, foi utilizado 1 ul BigDye, 1,5 ul tampão BD 5x; 5 pmol iniciador; 30 ng de template, q.s.p. 10 ul água ultra-puta estéril.

Tanto o iniciador *forward* como o iniciador *reverse* para pJG4-5 foram utilizados. A reação foi submetida a 95 °C por 3 min, 40 ciclos de 95 °C 15 s, 50 °C 15 s, 60 °C 3 min, sendo finalizada à 4 °C.

Após a reação, as amostras foram precipitadas, adicionando-se 0,1 V (V= volume final da reação de sequenciamento) de acetato de sódio 1,5 M/ EDTA 0,25 M e 3 V de etanol 100% (Merck®), a reação foi então transferida para um tubo de 1,5ml e homogeneizada gentilmente. Os tubos foram mantidos no gelo por 10 minutos e então centrifugados pó 20 minutos a 20.000 xg a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 15 ul de etanol 70 % gelado (Merck®) e novamente centrifugados. O sobrenadante foi descartado e o tubo seco em estufa a 37 °C por uma hora. As reações foram mantidas a -20 °C até serem aplicadas no sequenciador. Dez microlitros de formamida HI DI foram adicionados às amostras logo antes da corrida. Foi utilizado o

seqüenciador Applied Biosystems® ABI 3500 e 3130 e o cromatograma visualizado pelo software BioEdit® v.7.0.9.0.

As análises dos resultados foram feitas a partir de banco de dados do NCBI (Nucleotide Blast e Protein Blast, disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), o alinhamento foi feito por banco de dados do EBI (CLustalW, disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) e a conferência foi realizada com auxílio do ExPasy (Translate Tool, disponível em <http://web.expasy.org/translate/>)

3.4 PREPARO DE BACTÉRIAS *Escherichia coli* DH5 α ELETROCOMPETENTES

A alíquota da bactéria congelada foi recuperada em placa contendo meio LB (10 g/l de triptona; 5 g/l de extrato de levedura; 10 g/l de NaCl) durante 18 h a 37 °C. Uma colônia isolada foi transferida para um pré-inóculo 50 ml de meio LB líquido e a incubação se deu sob agitação de 250 rpm, 16 horas, a 37 °C. Para o inóculo 2 ml do pré-inóculo foram transferidos para 200 ml de LB. Essa solução foi incubada a 250 rpm a 37 °C até que a densidade óptica (DO) de 600 nm atingisse o valor de 0,5 a 0,7.

A partir desse momento, todos os procedimentos foram realizados à 4 °C. A começar por uma incubação de descanso por 20 min no gelo, seguida de uma centrifugação de 20 min a 4000 rpm à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuscitado com água ultra pura estéril gelada no volume de 250 ml. Esse passo foi repetido por três vezes consecutivas.

Após a última centrifugação, o precipitado foi ressuscitado em 50 ml de água ultra pura gelada adicionada de 10% de glicerol estéril, foi incubado por 20 min no gelo e centrifugado por 20 min a 4000 rpm a 4 °C. O novo precipitado foi ressuscitado então em 1 ml de glicerol 10% gelado, separado em alíquotas de 40 μ l e armazenados a - 80 °C até o momento do uso.

3.5 ELETROPORAÇÃO

Linhagens de bactérias *E. coli* DH5 α eletrocompetentes foram utilizadas para replicação em larga escala do plasmídeo já seqüenciado e selecionado como relevante. Para isto, 40 μ l da bactéria foram transformados por eletroporação (Eletroporador modelo Gene Pulser X Cell – BioRad[®]) com 10 ng do plasmídeo, sendo submetido a uma diferença de potencial de 1,40 kV. A recuperação se deu por 1 h em 1 ml de meio LB, no agitador orbital (Certomat BS-1 P. Braun[®]) a 37 °C. Inicialmente, 100 μ l foram esgotados com o auxílio da alça de Drigalsky, então o restante foi transferido para um tubo de 1,5 ml e centrifugado a 3500 rpm por 2 min em uma centrífuga Mini Spin[®] da Eppendorf[®]. O sobrenadante foi descartado; o precipitado foi ressuspendido em aproximadamente 100 μ l de LB e esgotados em outra placa. As placas ficaram por não mais que 16 horas em estufa a 37 °C. Após este período, algumas colônias foram escolhidas para verificação da presença dos insertos.

3.6 PCR DE COLÔNIA

As colônias selecionadas foram repicadas em “master plate” e inoculadas em um tubo plástico para servirem como molde para reação de PCR. Em um volume final de 15 μ l foram adicionados: Tampão *Taq* 1x, dNTP 0,2 mM; MgCl₂ 1,33 mM; 2 pmol de iniciadores para pJG4-5 e 0,3U de *Taq*. DNA polimerase. A reação foi submetida a 95 °C – 10 min; e 35 ciclos de 95 °C – 40 s; 49 °C – 50 s; 72 °C – 1 min e 10 s; finalizando com uma extensão a 72 °C por 7 min. Os produtos obtidos foram então submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo 5 μ g/ml..

As colônias que positivas para a reação de PCR acima foram então cultivadas em meio líquido para purificação dos plasmídeos em pequena escala (Miniprep, realizada de acordo com os fabricantes do kit QUIaprep Spin Miniprep Kit - Quiagen[®]).

3.7 TRANSFORMAÇÃO DE LEVEDURAS EGY48 COM LIGANTES JÁ ENCONTRADOS PARA REALIZAÇÃO DE *MATING* CRUZADO [ADAPTADO DE WOODS E GIETZ (2005)]

Várias colônias da levedura EGY48 não transformadas foram inoculadas em um pré-inóculo de 25 ml contendo meio de cultura YPD. Essa cultura foi incubada em um agitador a 30 °C a 240 rpm até atingir uma $DO_{600} \sim 0,8$, então foi transferida para um inóculo de 200ml de YPD e incubadas novamente sob agitação por 3 horas. A cultura foi precipitada a 2500 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente. O meio foi descartado e o precipitado foi lavado e centrifugado em água ultra-pura estéril com o mesmo volume de meio.

O sobrenadante foi removido e o precipitado foi ressuspendido e lavado em 50 ml de acetato de lítio (LiAc) 0,1M juntando-se as suspensões em um só tubo. Após nova centrifugação, também a 2500 rpm durante 5 minutos, o sobrenadante foi removido e o precipitado foi ressuspensão em LiAc 0,1M até um volume final de 1 ml. A 500 ul da suspensão de células foi adicionada a solução TRAF0 (0,75 ul de LiAc 1M; 4 mg de ssDNA; H₂O q.s.p.. 2,5 ml). Cinquenta microlitros dessa mistura foram usados para cada uma das transformações. Para cada transformação, aproximadamente 100 ng de plasmídeo foram adicionados, os tubos foram agitados por 2 minutos e, então, foi acrescentado 100 ul de PEG 3350 50%.

Os tubos foram incubados a 42 °C por 40 min a 200 rpm. Em seguida, as leveduras foram sedimentadas por centrifugação a 2500 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, o precipitado foi ressuspendido em 100 ul de água ultra-pura estéril e plaqueados (sem diluir ou na diluição de 1:100) em meio seletivo SD Glicose –Trp. Após 2-4 dias as colônias forma repicadas em uma *master-plate* e o *mating* cruzado, foi realizado.

3.8 MATING CRUZADO

Os plasmídeos pJG4-5 obtidos após a varredura, contendo os insertos da biblioteca (potenciais ligantes) foram transformados na cepa de levedura EGY 48, através do método de acetato de lítio, como descrito em *Yeast Protocols Handbook* (Clontech - www.clontech.com). Várias colônias obtidas em uma mesma transformação foram pegadas e repassadas para uma placa -Trp (glicose) em linhas paralelas. Assim, cada linha apresentava o pJG4-5 com um inserto diferente da biblioteca. O mesmo procedimento foi feito com a cepa

RFY 206 contendo a isca de PrP^c (em pGilda), além do repórter pSH 18-34 em uma placa -His -Ura (glicose). Após 48 horas de crescimento a 30 °C, cada uma das duas placas foi pressionada sobre um mesmo veludo (próprio para réplicas) de forma que as linhas entre as diferentes placas ficassem perpendiculares entre si. Replicou-se então as leveduras do veludo para uma placa com meio YPD. Após 24 hs a 30 °C, foram feitas réplicas para as seguintes placas:

- glicose –Ura -His -Trp -Leu
- galactose/rafinose –Ura -His -Trp -Leu
- glicose –Ura -His -Trp +X-Gal
- galactose/rafinose –Ura -His -Trp +X-Gal

Após 1-4 dias a 30 °C, o crescimento e o desenvolvimento da cor azul dos diplóides (intersecção entre as linhas de EGY 48 x RFY 206) foram monitorados.

3.9 CONFIRMAÇÃO DAS INTERAÇÕES OBTIDAS

A confirmação dos ligantes foi realizada por ensaios bioquímicos de *pull down*. A técnica de co-imunoprecipitação também foi utilizada na tentativa de confirmar a interação entre as proteínas.

3.9.1 Co-imunoprecipitação

Cérebro, bulbo olfatório ou epitélio olfatório foram removidos após eutanásia de camundongos (esse procedimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da UFPR - certificado nº 623) e lisados em tampão de lise (50 mM tris-HCl pH 7,4; 1% NP-40; 0,2% deoxicolato de sódio) acrescido de inibidores de proteases PMSF e NEM (na concentração final de 1 mM) em banho de gelo. O extrato foi centrifugado a 19000 xg a 4 °C por 30 min.

Os extratos celulares foram clarificados pela incubação prévia com 30 ul de proteína A/G sepharose (GE Bioscience) acrescido de 10 ul de soro normal de camundongo durante 2 horas a 4 °C. Após o clareamento, a suspensão foi centrifugada durante 5 min 19000 xg a 4 °C e metade do sobrenadante obtido foi incubado com 10 ul soro normal de camundongo e a outra metade incubada com 10 ul soro contendo anticorpos anti-PrP^C (produzido no laboratório de Neurobiologia) durante 16 horas a 4 °C.

Após este tempo as soluções foram centrifugadas por 3 minutos a 19000 xg para retirada de qualquer material agregado que pudesse interferir nos resultados e então incubadas por mais duas horas com 30 ul de proteína A/G sepharose para que ocorresse a ligação do imunocomplexo à matriz sólida. As matrizes contendo os imunocomplexos ligados foram lavadas 6 vezes com tampão de lise e o material que permaneceu ligado foi eluído com tampão redutor ou não redutor para SDS-PAGE, fervido a 100 °C durante dez minutos, submetido a SDS-PAGE 10% ou 15% e analisado por *Western blotting*.

Para tanto, as amostras separadas por SDS – PAGE foram eletrotransferidas para membrana de nitrocellulose Hybond-C Extra Amersham Biosciences (GE Healthcare) durante 50 minutos sob voltagem constante de 15 V em sistema “semi-dry”. As membranas foram bloqueadas durante uma hora com TBST (150 mM NaCl; 50 mM de Tris-HCl pH 7,4 e 0,05% de Tween 20) contendo 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé). A membrana foi incubada com o anticorpo primário diluído em tampão de bloqueio, por 16 horas à 4 °C sob agitação. Após a incubação, a membrana foi lavada por três vezes durante cinco minutos com TBST e em seguida, adicionou-se o anticorpo secundário conjugado a HRP (*horseradish peroxidase*) (Sigma-Aldrich). A membrana permaneceu incubando com este anticorpo durante uma hora à temperatura ambiente. Um novo ciclo de lavagem foi realizado. Então, a membrana foi incubada com o substrato adequado para a reação quimioluminescente empregando-se o Kit West Pico (Pierce Co.). Filmes de auto-radiograma Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare) foram expostos à membrana em diversos tempos até a visualização das bandas de interesse.

3.9.2 Pull Down

Cérebro, bulbo olfatório ou epitélio olfatório foram removidos após eutanásia de camundongos (esse procedimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da UFPR- certificado nº 623) e lisados em tampão de lise (50 mM tris-HCl pH 7,4; 1% NP-40; 0,2% deoxicolato de sódio) acrescido de inibidores de proteases PMSF e NEM (na concentração final de 1 mM) em banho de gelo. O extrato foi centrifugado a 19000 xg a 4 °C por 30 min.

Os extratos foram clarificados pela incubação prévia com 30 ul de resina de níquel durante 2 horas a 4 °C. Em paralelo, 30 ul de resina de níquel adicionada de 3 ug de His₆-PrP^c foi incubado por 2 h a 4 °C para que a proteína recombinante pudesse se ligar à resina. Após incubação, a resina foi lavada por três vezes com tampão de lise. À coluna lavada, foi adicionado o extrato clareado e a incubação se deu a 4 °C por 3 h. Após esse período, a coluna foi lavada sete vezes com tampão de lise e uma vez com tampão de lise adicionado de SDS 0,01%. O material que permaneceu ligado foi eluído com tampão redutor ou não redutor para SDS-PAGE, fervido a 100 °C durante dez minutos, submetido a SDS-PAGE 10% ou 15% e analisado por *Western Blot*.

Para tanto, as amostras separadas por SDS – PAGE foram eletrotransferidas para membrana de nitrocellulose Hybond-C Extra Amersham Biosciences (GE Healthcare) durante 50 minutos sob voltagem constante de 15 V em sistema *semi-dry*. As membranas foram bloqueadas durante uma hora com TBST (150 mM NaCl; 50 mM de Tris-HCl pH 7,4 e 0,05% de Tween 20) contendo 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé). A membrana foi incubada com o anticorpo primário diluído em tampão de bloqueio, por 16 horas à 4 °C sob agitação. Após a incubação, a membrana foi lavada por três vezes durante cinco minutos com TBST e em seguida, adicionou-se o anticorpo secundário conjugado a HRP (*horseradish peroxidase*) (Sigma-Aldrich). A membrana permaneceu incubando com este anticorpo durante uma hora à temperatura ambiente. Um novo ciclo de lavagem foi realizado. Então, a membrana foi incubada com o substrato adequado para a reação quimioluminescente empregando-se o Kit West Pico (Pierce Co.). Filmes de auto-radiograma

Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare) foram expostos à membrana em diversos tempos até a visualização das bandas de interesse.

4 RESULTADOS

4.1 RESULTADOS PRÉVIOS

Construção da isca correspondente à PrP^c

Para dar início a busca pelos ligantes utilizando o sistema duplo-híbrido em leveduras, foi construída uma isca contendo a sequência de nucleotídeos correspondente aos resíduos 23-231 de PrP^c em vetor pGilda. Os resultados a seguir foram obtidos pelo então aluno de mestrado, Breno C.B. Beirão.

A partir de um plasmídeo pré-existente (pGFP-PrP^c), foi desenvolvida uma sequência oligonucleotídica iniciadora que flanqueia essa região de PrP^c do GFP-PrP^c. A essa sequência foram adicionadas regiões de restrição (*Eco* RI 3' e *Bam* HI 5') avaliadas e selecionadas com base na sequência de PrP^c após consulta ao programa NEB Cutter e ao sítio de policlonagem do pGilda. Após realização da reação em cadeia da polimerase (PCR), foi feita a digestão nas regiões de restrição do pGilda e de PrP^c utilizando as enzimas *Eco* RI e *Bam* HI. A ligação do inserto correspondente à PrP^c no vetor foi realizada utilizando a enzima ligase. A construção correta foi validada por seqüenciamento e a expressão da isca em leveduras RFY 206 foi confirmada por ensaio de *Western Blot*. Para isso, extratos protéicos de RFY206 transformada com os plasmídeos de interesse foram obtidos e submetidos a um SDS-PAGE 13%. Após a corrida, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e a presença das proteínas de fusão foi detectada com o anticorpo anti-LexA (Invitrogen). Na Figura 1 verifica-se que a isca correspondente a PrP^c foi expressa com sucesso. A banda obtida possui o tamanho esperado de cerca de 45 kDa, correspondente à proteína de fusão LEXA-PrP^c.

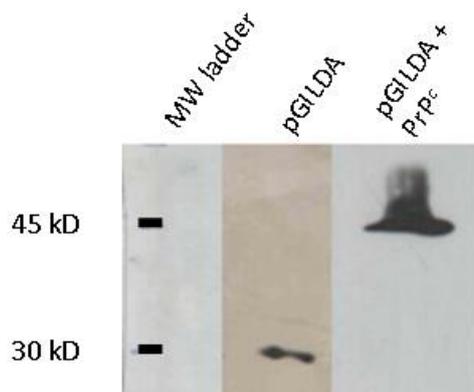


FIGURA 1. TESTE DE EXPRESSÃO DA ISCA CORRESPONDENTE À PrP^c POR *WESTERN BLOTTING*.

FONTE: Breno C. B. Beirão (2010).

NOTA: O anticorpo primário utilizado foi o anti-LexA (1:500) e o anticorpo secundário anti-mouse Ig conjugado a HRP (1:2000).

LEGENDA: Como controle positivo, utilizou-se o extrato de levedura transformada com pGilda sem o inserto, demonstrando a expressão do domínio LexA (~27 kDa). A adição do inserto correspondente a PrP^c resulta na expressão de uma proteína de fusão (LexA-PrP^c) de cerca de 45 kDa, como evidenciado na canaleta pGILDA + PrP^c.

A isca PrP^c também foi testada quanto ao seu potencial de auto-ativação. Esse controle é fundamental, pois, para que uma isca possa ser usada para varrer a biblioteca, ela não pode ser capaz de ativar por si só os genes repórteres. A ativação destes só pode ocorrer se houver interação da isca com uma proteína específica da biblioteca, que estaria por sua vez fundida ao domínio de ativação. Nesse ensaio utilizou-se como controles positivo e negativo os seguintes plasmídeos, respectivamente: pSH17-4, que expressa LexA em fusão com o domínio de ativação do fator de transcrição de levedura Gal4 (portanto, se liga ao DNA e também recruta a RNA polimerase - ativa os genes repórteres) e pRHF1, que expressa a fusão LexA+homeodomínio da proteína bicóide (portanto, só se liga ao DNA-não ativa os genes repórteres).

Assim, a levedura RFY 206, contendo o plasmídeo pSH18-34 (OriGene) que expressa o gene repórter da beta-galactosidase, foi transformada com a isca de interesse (pGilda-PrP^c) e com os plasmídeos controles e plaqueadas em meio seletivo contendo X-Gal. Após 4 dias, a 30° C, a atividade da beta-galactosidase dessas células foi determinada. A Figura 2 mostra que no meio contendo galactose (açúcar que será usado durante a varredura da biblioteca e que induz a expressão das iscas em pGilda), as leveduras que expressavam LexA-PrP^c funcionaram da mesma maneira que o controle negativo

(permaneceram brancas), indicando que essas iscas não ativam o gene da beta-galactosidase.



FIGURA 2. ENSAIO DE AUTO-ATIVACÃO DA ISCA.

FONTE: Breno C.B. Beirão (2010).

NOTA: Colônias crescidas em placas Gal X-Gal.

LEGENDA: pSH17-4: controle positivo. pRHFM1: controle negativo.

Assim, os resultados apresentados até aqui permitiram caracterizar a isca construída como sendo capaz de ser utilizada na varredura da biblioteca de cDNA de epitélio olfatório, como descrito a seguir..

4.2 VIABILIDADE DA BIBLIOTECA PARA *MATING*

A biblioteca de cDNA de epitélio olfatório produzida pela Prof^a Dr^a. Adriana Mercadante possui abrangência de 10^6 mensagens de cDNA. Durante a produção desta biblioteca, foram selecionadas mensagens possuindo um tamanho maior de 300 bp. Esta biblioteca foi construída no vetor pJG4-5 (Origen) e transformada em leveduras da linhagem EGY48. Para atestar se a alíquota congelada ainda mantinha a viabilidade necessária, foi preciso calcular sua atual representatividade. Após plaqueamento em várias diluições no meio adequado, foi possível determinar que esta biblioteca apresentava $3,3 \times 10^6$ unidades formadoras de colônias (cfu) por microlitro. Utiliza-se para a varredura através do *mating*, uma quantidade de leveduras (em cfu) dez vezes maior que o tamanho da biblioteca, devido à capacidade limitada de haver cruzamentos entre as leveduras (só 10% das leveduras fazem o cruzamento) (AUSUBEL *et al.*, 1999). Foi utilizado 20 ul da biblioteca totalizando $6,6 \times 10^7$ mensagens.

O mesmo cálculo foi feito para as leveduras controles (EGY48 transformada com pJG4-5 vazio) e chegou-se ao resultado de $\sim 1,6 \times 10^6$ cfu/ul.

Para poder calcular a transativação (ver a seguir), a isca foi cruzada com a mesma quantidade dos dois tipos de leveduras (controle e biblioteca) utilizando 40 ul do controle para o cruzamento.

Em resumo, para o *mating* controle, foi utilizado 4×10^6 cfu de RFY206 + pGilda com inserto de PrP^c (200 ul de isca) e $6,6 \times 10^7$ cfu de EGY48 + pJG4-5 (40 ul de controle) para cruzamento controle. Para o *mating* relevante, foi utilizado também 4×10^6 cfu de RFY206 + pGilda com inserto de PrP^c (200 ul de isca) e $6,6 \times 10^7$ cfu de EGY48 + pJG4-5 transformado com cDNA de epitélio olfatório (biblioteca). Todo o procedimento foi realizado de acordo com (AUSUBEL *et al.*, 1999).

4.3 POTENCIAL DE TRANSATIVAÇÃO

Espera-se que o gene repórter seja ativado somente quando ocorrer a interação entre isca e presa, portanto, apenas quando na expressão de proteínas que interagem entre si, a colônia de leveduras é capaz de crescer em meio de cultura sem leucina. Entretanto, pode também ocorrer expressão do gene repórter, sem que ocorra interação da isca com algum ligante por causa do potencial de transativação da própria isca, o qual é ditado pela razão de colônias que cresceram no meio sem leucina, pelo número de colônias encontradas no cruzamento da linhagem isca com a linhagem controle, que crescem no meio com leucina (células viáveis) (GOLEMIS *et al.*, 2008).

Este cálculo do potencial de transativação é importante para se estabelecer o número de colônias (isca+biblioteca) necessárias para garantir que todos da biblioteca pré-transformada tenham sido incluídos na varredura realizada nas placas mestres. Desta forma, é possível estimar quantos resultados positivos da varredura são falsos, ou seja, gerados pela transativação da própria isca.

O cálculo do potencial de transativação da isca de PrP^c utilizada na varredura deste trabalho foi 2×10^{-6} .

Uma vez reconhecido o potencial de transativação, foi possível estabelecer quantas colônias deveriam ser coletadas para investigações posteriores. Das ~ 10.000 colônias positivas para o repórter LEU 2 que

criaram após o cruzamento da isca com a biblioteca, 280 foram selecionadas ao acaso e repicadas em 14 *master plates* para análises posteriores.

4.4 SELEÇÃO DE COLÔNIAS

As *master plates* de SD Glicose -Ura,-His,-Trp foram incubadas durante dois dias. Após crescimento, as colônias foram testadas em diferentes meios para checar a ativação do genes repórteres (Lac-Z e Leu2) e a dependência da interação por galactose (indução da isca e da presa).A Figura 3 mostra esse ensaio para algumas colônias. A colônia assinalada em vermelho é um exemplo de clone que deve ser melhor analisado, pois pode conter um candidato de verdadeiro ligante da isca em questão. Como indicado na figura 1, esse tipo de colônia cresce em meio indutor (com galactose) sem leucina; não cresce nesse mesmo meio com glicose; ela só fica azul quando o meio contendo X-Gal contém também galactose e não glicose. As colônias que atenderam aos critérios dos testes da Tabela 3 foram selecionadas a exemplo da colônia destacada na Figura 3.

A intensidade da cor azul observada na placa SD Gal/Raf (X-Gal) –Ura, -His, -Trp variou muito nas diferentes colônias, bem como ao longo dos dias (dado não mostrado), indicando assim que provavelmente haviam diferentes intensidades de interação.

Das 280 colônias testadas, apenas 77 colônias atenderam a todos os requisitos destes testes (como demonstrado na Tabela 3) e prosseguiram nas análises mais detalhadas.

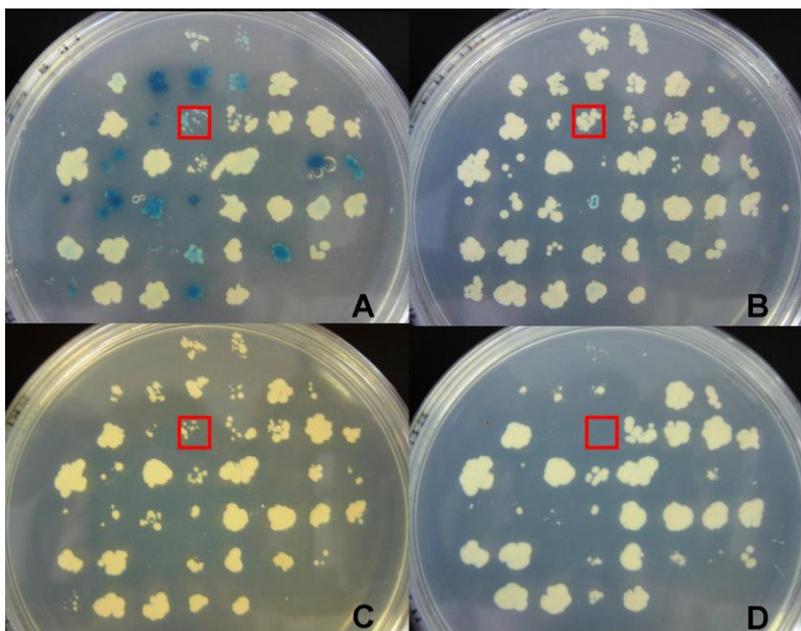


FIGURA 3. TESTE PARA SELEÇÃO DE COLÔNIAS.

FONTE: O autor (2013).

NOTA: Colônias testadas no *mating* após 48 horas de cultivo à 30 °C. Placas: A: SD Gal X-Gal; B: SD Gli X-Gal; C: SD Gal -Leu; D: SD Gli -Leu.

LEGENDA: O quadrado vermelho indica a colônia G12 que atendeu aos requisitos para a escolha: apresentar coloração azulada na placa **A**; não desenvolver coloração na placa **B**; crescer na placa **C**; e não crescer na placa **D**. Outras colônias com o mesmo padrão também foram escolhidas.

Clones varridos	6×10^7
Clones Leu+	10^4
Clones testados para os dois repórteres	280
Clones positivos para os dois repórteres	77
Clones sequenciados	53
Clones com inserto em fase com Lex A	18

TABELA 3. RESUMO DA VARREDURA POR DUPLO-HÍBRIDO COM A ISCA CORRESPONDENTE À PrPC.

FONTE: O autor (2013).

4.5 PCR DE LEVEDURAS

A PCR do lisado de leveduras teve por objetivo a amplificação dos insertos contidos nos plasmídeos pGJ4-5, correspondentes às mensagens da biblioteca de cDNA do epitélio olfatório. Na Figura 4 está demonstrado um gel

representativo com diferentes amostras resultante da PCR do lisado de leveduras. Na coluna 7, como pode-se observar, há duas bandas de tamanhos diferentes, o que pode ocorrer uma vez que no processo de transformação das leveduras é possível que entre mais de uma cópia do plasmídeo pJG4-5, sendo então amplificado dois insertos durante o processo. As colônias que apresentaram esse perfil não foram sequenciadas. Já na coluna 12, nenhuma banda aparece no gel, o que demonstra uma possível falha no processo de amplificação do inserto. Quando apresentado o perfil como o das outras colunas, com uma banda única, o sequenciamento e posterior análise foram realizados.

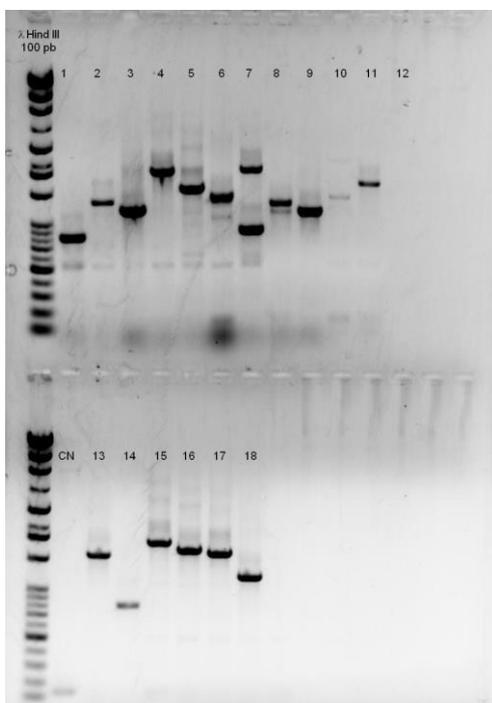


FIGURA 4. PCR DO LISADO DE LEVEDURAS.

FONTE: O autor (2013).

NOTA: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etideo (5 ug/ml), representativo com diferentes amostras resultantes da PCR do lisado de leveduras (amostras 1-18).

LEGENDA: CN controle negativo utilizado pJG4-5 sem adição do inserto.

Após essa análise, os plasmídeos pJG4-5 que apresentaram inserto foram isolados, amplificados em bactéria e sequenciados. Como já mencionado em Material e Métodos, o sequenciamento foi realizado diretamente do produto de PCR de lisado de leveduras.

4.6 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS

Para a identificação dos ligantes obtidos, as sequências foram analisadas através dos programas Blast (NCBI), ClustalW (EBI) e Translate Tool (ExPasy). Além disso, verificou-se também se a fase aberta de leitura do inserto estava mantida. Dos 53 clones sequenciados, apenas 18 encontravam-se em fase com o domínio Lex A. As identidades destes ligantes estão descritas na Tabela 4 com o nome completo da proteína encontrada, sua sigla, “gene ID” e funções básicas descritas.

Proteína	Sigla	“Gene ID”	Função
Cadeia leve da dineína tipo 1 (<i>Dynein light chain Tctex type 1 D</i>)	Dyn1t1b	42476289	Condução do movimento anterógrado/retrógrado de vesículas sobre microtubulos
Proteína 1 ligante de NEDD4 (<i>NEDD4 binding protein 1</i>)	N4bp1	242117940	Inibição de E3 ligase; pode ser uma proteína supressora de tumor
Beta catenina associada à caderina 1 (<i>Catenin (cadherien associated protein) beta 1</i>)	Ctnnb1	260166641	Liga-se caderinas e ajuda a ligar as suas caudas citoplasmáticas à actina no citoesqueleto via alpha-catenina
Colágeno tipo 3 alfa 1 (<i>Collagen type 3 alpha 1</i>)	Col3a1;	226423932	Principais constituintes da pele, tecido conjuntivo e substância orgânica de ossos e dentes
Colágeno tipo 1 alfa 2 (<i>Collagen type 1 alpha 2</i>)	Col1a2	111120328	Principais constituintes da pele, tecido conjuntivo e substância

			orgânica de ossos e dentes
Proteína ribossomal AS (<i>Ribosomal protein AS</i>)	Rpsa	224994259	Constuinte de ribossomo
Proteína multivesicular carregada 2A (<i>Charged multivesicular body protein 2A</i>)	Chmp2a	254826731	Interage com e regula a função de AAA-ATPase
Vimentina (<i>Vimentin</i>)	Vim	227430362	Função estrutural de citoplasma
Ribonucleoproteína nuclear heterogênea K (<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K</i>)	Hnrnpk	142350515	Fator de transcrição da ribonucleoproteína K
Proteína quinase rica em serina/arginina 2 (<i>Serine/Arginine - rich protein specific kinase 2</i>)	Srpk2	47059479	Fosforilação de proteínas nucleares que contêm o domínio serina / arginina (SR) e medeiam o <i>splicing</i> de pré-mRNA
<i>DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3 x-linked *</i>	Ddx3x	164607180	Constituinte de RNA helicases
Proteína convertase subtilisina/quexina 5 (<i>Proprotein convertase subtilisin/kexin type 5</i>)	Pcsk5	253314508	Pró-proteína envolvida no processamento de proteínas secretórias
Fator transformador de crescimento beta 1 (<i>Transforming growth factor beta regulated gene 1</i>)	Tgfb1	224967131	Modulação da proliferação e diferenciação celular, formação da matriz extracelular e participação na reação

			imune
Glutathiona S transferase	Gstm1	239937552	Envolvida no metabolismo da carcinogênese e fator de risco de tumores
Piruvato quinase (<i>Pyruvate kinase</i>)	Pkm2	359807366	Uma fosfotransferase que catalisa reversivelmente a fosforilação do piruvato em fosfoenolpiruvato na presença de ATP
Fator básico de transcrição 3 (<i>Basic transcription factor 3</i>)	Btf3	281485610	Forma complexos estáveis com a RNA polimerase II
Proteína ligante de cálcio S100 A5 (<i>S100 calcium binding protein A5</i>)	S100a5	113930759	Proteína de origem glial; encontrada em grande concentração no cérebro
<i>STIP1 homology and U-Box containing protein 1*</i>	Stub1	118130581	Manutenção da sobrevivência neuronal

TABELA 4. PROTEÍNAS EM FASE COM O PLASMÍDEO.

FONTE: O autor (2013).

NOTA: Optou-se por não traduzir para o português o nome das proteínas marcadas com *.

4.7 CONFIRMAÇÃO DAS INTERAÇÕES ATRAVÉS DE ENSAIO DE *MATING* CRUZADO (*CROSS-MATING ASSAY*)

Para confirmar as interações obtidas, utilizou-se o método de *mating* cruzado, como descrito por Kolonin e colaboradores (2000). Para esse ensaio, os plasmídeos pJG4-5 contendo os insertos dos ligantes putativos (Tabela 4), foram purificados e transformados em leveduras EGY48. Estas transformantes foram então cruzadas com leveduras RFY206, transformadas com a isca

(pGilda-PrP^c) e também com o repórter pSH18-34. Como controle positivo, foi utilizado pBait com pTarget. pTarget foi cruzado também com pGilda vazio e com pGilda contendo o inserto de PrP^c, como controles negativos, demonstrado na Figura 5. Como pode ser visto, as interações entre os ligantes selecionados e PrP^c foram confirmadas (diplóides azuis) e os ligantes sozinhos não foram capazes de auto-ativar o gene repórter, já que as leveduras obtidas nos cruzamentos com pGilda vazio não adquiriram a coloração azul.

Deve-se ressaltar que a purificação e/ou a transformação de alguns ligantes (sequências correspondentes às proteínas Col3a1, Col1a2, Rpsa, Hnrnpk, Ddx3x, Pkm2, Btf3) não foram bem sucedidas e, portanto, estes não foram considerados nas análises seguintes.

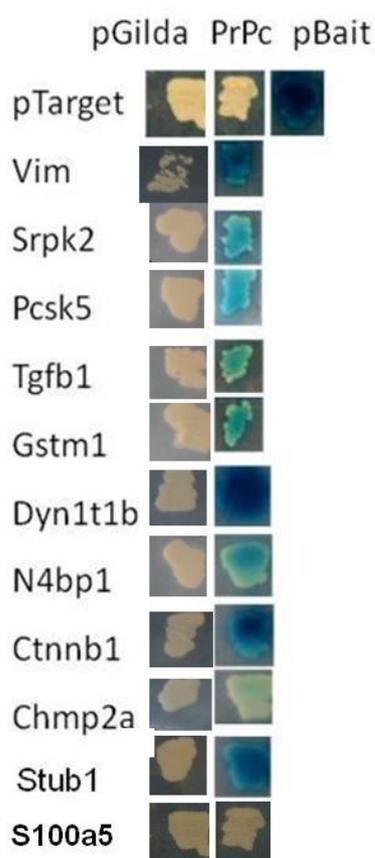


FIGURA 5. *MATING* CRUZADO.

FONTE: O autor (2013).

LEGENDA: Características fenotípicas das colônias dos ligantes encontrados que encontravam-se em fase com o plasmídeo pJG4-5 plaqueadas em meio SD-Gal enriquecido com X-Gal.

Alguns ligantes foram encontrados mais de uma vez. Dyn1t1b foi encontrada em quatro clones diferentes, Pcsk5, Srpk2 e Stub1 foram

encontradas, cada uma, em dois clones distintos. Como o tamanho dos insertos pode variar, e também a região da proteína clonada no vetor, foi analisado separadamente cada região encontrada para os ligantes obtidos mais de uma vez. Todos eles estavam contidos em um inserto maior, correspondendo assim sempre à mesma região da proteína codificada encontrada como parceiro molecular de PrP^c. Para se ter uma idéia melhor dos domínios dessas proteínas, foi montada uma figura (Figura 6) que esquematiza qual porção da proteína, em aminoácidos, foi identificada no seqüenciamento. No caso de proteínas encontradas mais de uma vez, está esquematizado o maior inserto seqüenciado. A proteína S100a5 não está contida na figura porque não foi validada no *mating* cruzado (ver Figura 5).

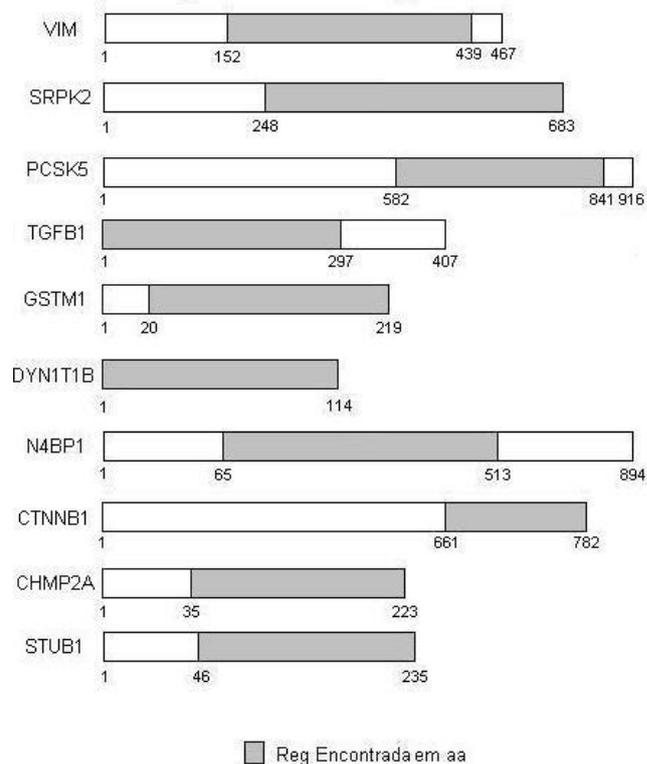


FIGURA 6. DOMÍNIOS ENCONTRADOS DAS PROTEÍNAS LIGANTES DE PRP^c.

FONTES: O autor (2013).

LEGENDA: Tamanho das proteínas (em quantidade de aminoácidos) em fase com o plasmídeo pJG4-5 encontradas na varredura da biblioteca de cDNA usando PrP^c como isca. Em cinza, os domínios específicos encontrados e seqüenciados (insertos).

4.8 CONFIRMAÇÃO DAS INTERAÇÕES POR OUTROS MÉTODOS

Após a identificação de ligantes pelo sistema de duplo-híbrido, é recomendado que as interações obtidas sejam confirmadas por outros métodos (revisado por BRÜCKNER *et al*, 2009). Dessa forma, optou-se por fazer essa verificação através dos ensaios de co-imunoprecipitação e *pull-down* e, para tanto, foram escolhidos três dos ligantes encontrados. Essa escolha foi definida com base na verba de financiamento do projeto, nos anticorpos validados disponíveis e na possível relação existente entre as funções dos ligantes com as funções conhecidas de PrP^c. Assim, foram adquiridos os seguintes anticorpos comerciais: anti-Ctnnb1, anti-N4bp1 e anti-Chmp2A (todos da empresa ABCAM).

4.9 IDENTIFICAÇÃO DOS LIGANTES EM EXTRATOS PROTÉICOS

Primeiramente, os anticorpos anti-Ctnnb1, anti-N4bp1 e anti-Chmp2A foram testados por ensaios de *Western Blot* em extratos protéicos murinos de cérebro, bulbo olfatório (OB) e epitélio olfatório (OE). Como pode ser visto na Figura 7, os três ligantes investigados encontram-se presentes no cérebro. Ctnnb1 está presente também em extratos de OB e OE. As proteínas N4bp1 e Chmp2A foram detectadas no OE e no OB, respectivamente.

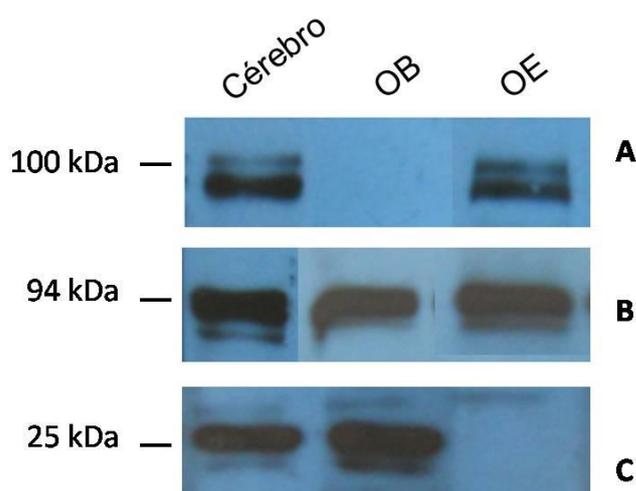


FIGURA 7: IDENTIFICAÇÃO DOS LIGANTES EM EXTRATOS PROTÉICOS.

FONTE: O autor (2013).

NOTA: *Western blot* de amostras de extrato protéico de cérebro, bulbo olfatório (OB) e epitélio olfatório (OE) na concentração de 80 ug. Amostras resultantes de SDS-PAGE 12% transferidas para membrana de nitrocellulose. O duble correspondente à revelação com anti-N4bp1 procede com informações do fabricante.

LEGENDA: **A:** Anti-N4bp1; **B:** Anti-Ctnnb1; **C:** Anti-Chmp2a. Todos na diluição de 1:2000 em TBST leite 5%.

4.8.1 Imunoprecipitação (IP)

Os ensaios de imunoprecipitação se deram pela imobilização de anti-PrP^c à coluna de proteína A/G seguida pela eluição de extrato protéico de cérebro. Em experimento piloto, foi demonstrado que a imunoprecipitação de PrP^c endógeno, de extrato protéico de cérebro, pelo anti-PrP^c, ocorre de forma bastante satisfatória como mostrado na Figura 8. Aparecem três bandas bem distintas porque PrP^c endógeno pode estar não glicosilado, na altura de 27 kDa, monoglicosilado, na altura de 30 kDa ou diglicosilado, na altura de 34 kDa. Uma vez que PrP^c diglicosilado é a forma mais abundante da proteína no sistema nervoso, era esperada uma banda mais forte na altura de 34 kDa.

Quando essa membrana foi reagida com os anticorpos específicos para os ligantes putativos, nenhuma banda pode ser observada na canaleta correspondente a IP com anti-PrP^c, apesar das bandas específicas serem detectadas no “input” (dados não mostrados). Várias tentativas foram realizadas, com diferentes adaptações de protocolo e em nenhuma delas conseguiu-se verificar a co-IP dos ligantes testados com PrP^c. Assim, decidiu-se realizar o ensaio de *pull-down* para confirmar as interações.

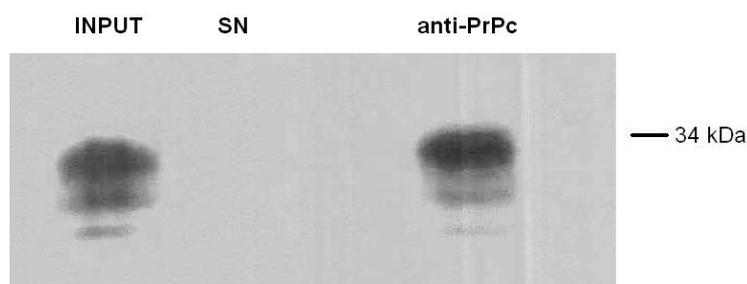


FIGURA 8. WESTERN BLOT DA IMUNOPRECIPITAÇÃO.

FONTE: O autor (2013).

NOTA: *Western blot* resultando do ensaio piloto de imunoprecipitação. Amostras resultantes de SDS-PAGE 12%, transferido à membrana de nitrocellulose revelado com soro contendo anti-PrP^c na diluição de 1:1000 em TBST leite 5%.

LEGENDA: Input: extrato bruto clareado; SN: controle negativo da reação com a adição de soro normal à reação; anti-PrP^c: imunoprecipitação de PrP^c pela adição de soro hiperimune contendo anti-PrP^c à reação.

4.8.2 Pull Down

Os ensaios de *pull down* se deram pela imobilização de His₆-PrP^c recombinante em coluna de níquel. Posteriormente, essa resina foi incubada com extrato proteico de cérebro de camundongo. Como pode ser visto na Figura 9, uma banda correspondente a Ctnnb1 foi reconhecida pelo seu anticorpo específico apenas na canaleta referente à resina contendo His₆-PrP^c, indicando uma interação específica entre essas duas proteínas.

Essa metodologia também foi utilizada para detectar os demais ligantes (N4bp1 e Chmp2a), mas sem sucesso. Várias tentativas foram realizadas, porém a revelação com os anticorpos específicos não evidenciou nenhuma banda, nem mesmo no *input*.



FIGURA 9. WESTERN BLOT REFERENTE AO PULL DOWN.

FONTE: O autor (2013).

NOTA: Amostras resultantes de SDS-PAGE 12%, transferido à membrana de nitrocellulose. Extrato cérebro: 100 ug de proteínas do lisado de cérebro de camundongo; Input: extrato bruto clareado; Resina: controle negativo da reação sem a adição de His₆-PrP^c; His₆-PrP^c: proteína recombinante ligada à coluna de níquel.

LEGENDA: Revelação com anti-Ctnnb1 na diluição de 1:2000 (parte superior) e com anti-his-tag na diluição de 1:1000 (parte inferior), ambos em TBST leite 5%.

5 DISCUSSÃO

5.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS DAS INTERAÇÕES OBTIDAS

A técnica de duplo-híbrido utilizada nesse trabalho mostrou-se eficaz ao identificar potenciais ligantes para PrP^c. Por se tratar de uma varredura é esperado que se partindo de um número grande de colônias candidatas a parceiros moleculares de PrP^c, esse número fosse diminuído após as etapas. Dos 10 ligantes obtidos e confirmados pela técnica de duplo-híbrido, apenas a Ctnnb1 teve sua interação com PrP^c verificada por outro ensaio (*pull down*). Os demais ligantes ainda serão investigados quanto à sua real capacidade de ligação ao PrP^c.

Dos ligantes encontrados e confirmados pelo *mating* cruzado, oito deles são ligantes novos, ainda não citados na literatura como parceiros moleculares de PrP^c. São eles: Dyn1t1b, N4bp1, Ctnnb1, Chmp2a, Srpk2, Pcsk5, Gstm1, e Stub1.

Como visto, os ligantes escolhidos como promissores (fig. Mating) à interação biológica real estão, na sua maioria, envolvidos nos processos de transporte de vesículas, com proteínas do citoesqueleto ou tem algum envolvimento na apoptose. Como se sabe, PrP^c é predominantemente uma proteína extracelular ancorada à membrana celular. Assim, como esta proteína poderia entrar em contato com os ligantes intracelulares identificados? De fato, a técnica do duplo-híbrido em leveduras pode artificialmente induzir essas interações, já que estas ocorrem obrigatoriamente no citossol e/ou no núcleo da levedura. Entretanto, várias evidências na literatura indicam que PrP^c pode exibir diferentes topologias de membrana. A maioria das moléculas são GPI-ancorada. Existem também duas formas de PrP^c transmembrana, uma com a região C-terminal extracelular e outra com esta mesma região intracelular (HEGDE *et al.* 1999). Há também indícios da existência de acúmulos de PrP^c no citossol, o qual pode ser decorrente de estresse de retículo endoplasmático e inibição proteossomal. Ainda não está claro se PrP^c citossólico exerce algum papel fisiológico (revisado por LINDEN *et al.* 2008). Assim, as interações identificadas neste trabalho podem ser reais.

A maioria dos ligantes encontrados são proteínas intracelulares. Isso pode ser devido ao fato de que, na levedura, a isca correspondente PrP^c é expressa e recebe um sinal de endereçamento ao núcleo celular, onde ocorrem as interações, que tem características peculiares diferentes daquelas encontradas no ambiente extracelular, como por exemplo o pH mais ácido. Essas condições devem favorecer as interações de PrP^c com proteínas citoplasmáticas relacionadas ao processamento do príon após sua endocitose ou durante seu processamento e endereçamento à membrana celular, e não as interação com outras proteínas também de membrana celular.

Dito isso, pode-se discutir melhor sobre os processos intracelulares nos quais PrP está envolvido, seja enquanto proteína celular ou enquanto na sua transformação em proteína scrapie, dando origem a forma esporádica das doenças priônicas.

A maneira pela qual se desenvolvem as doenças priônicas esporádicas ainda não está clara. Após o processamento e glicosilação, PrP^c se localiza principalmente nos domínios ricos de colesterol e esfingolípídios na camada externa da membrana plasmática (BORCHELT *et. al.*, 1990). O contato direto das duas isoformas é um pré-requisito para a mudança conformacional de PrP^c em PrP^{Sc} (HORIUCHI *et. al.*, 1999). Supõem-se que a localização de PrP^c na membrana plasmática seja obrigatória para a sua conversão em PrP^{Sc} (CAUGHEY *et. al.*, 1991; GILCH *et. al.*, 2001), mas muito pouco se conhece sobre esta conversão no que diz respeito aos eventos que ocorrem no retículo endoplasmático (ER). Evidências sugerem que os eventos que ocorrem no ER desempenham um papel na modulação de patogênese de vários distúrbios neurodegenerativos (LINDHOLM *et. al.*, 2006; LEHMAN, 2009). Além de processamento, dobra e modificação pós-traducional de proteínas nascentes, o ER exerce um controle de qualidade rigoroso que garante que apenas as moléculas que sofrem a correta maturação sejam capazes de atingir seu alvo. Proteínas incorretamente montadas são normalmente retidas no ER e submetidas à via de degradação associada ao ER (ERAD). Isto inclui a translocação retrógrada através da membrana do ER para o citosol, deglicosilação, e ligação covalente à ubiquitina pelos seus resíduos de lisina. As proteínas que recebem a marcação de ubiquitina são encaminhadas para degradação pelo proteassoma 26S (ELLGAARD *et. al.*, 1999).

O acúmulo de proteínas deformadas e a alteração da homeostase do ER leva ao estresse e perturbação das funções do ER, gerando um desequilíbrio entre a demanda celular da função do ER e a capacidade do ER de lidar com uma carga excessiva de proteínas. Para reduzir este fardo excessivo, as células acionam um tipo de resposta específico que sinaliza a atenuação de tradução de proteínas, a regulação positiva de chaperonas moleculares e enzimas dobráveis, e degradação de proteínas mal formadas por ERAD (SCHRDER & KAUFMAN, 2005). Portanto, o estresse do ER e o ERAD estão intimamente relacionados. O comprometimento do sistema proteossomal via ubiquitina (UPS) pode contribuir para o estresse do ER, enquanto que o UPS em si tem demonstrado ser comprometida durante o estresse agudo do ER (MENÉNDEZ *et. al.*, 2005). Um ponto importante a se estudar, então, para a elucidação da patogênese priônica e para uma eficaz estratégia terapêutica pode ser o início do processamento de PrP^c. O UPS parece dispor de agregados de PrP deformadas que ocorrem naturalmente e de alguns mutantes de PrP associados à formas hereditárias de TSEs (CAMPANA *et. al.*, 2006). A perturbação da homeostase do ER e a inibição da via UPS resulta no aumento do acúmulo de PrP^{Sc} em células infectadas com príon (NUNZIANTE *et. al.*, 2011) Disfunção proteossômica em células que superexpressam PrP^c leva ao acúmulo de espécies PrP citosólicas com propriedades bioquímicas aberrante e à neurotoxicidade *in vivo*. Em células infectadas por príon, há o comprometimento proteossômico que leva a formação de agregados de PrP^{Sc} citosólicas desencadeando assim a apoptose (DRON *et.al.*, 2009).

Nesse aspecto, Kristiansen e colaboradores apresentaram uma forte evidência de que agregados solúveis da proteína em beta folha pregueada podem causar doença priônica por inibir especificamente a função proteolítica das subunidade betas do proteassoma 26S. Eles mostraram que os neurônios infectados com príons têm sua atividade proteassomal reduzida quando comparados contra o controle, fazendo com que haja um acúmulo de agregados de proteínas ubiquitinadas. Isso pode acontecer em decorrência do estresse do retículo endoplasmático, que levaria a uma má formação proteica (KRISTIANSEN *et.al.*, 2007)

Dessa forma, as interações encontradas no presente trabalho podem apresentar algum papel fisiológico no citosol ou ainda podem participar da indução de PrP^{sc} e serem alvos potenciais para o tratamento das TSEs.

5.2 DISCUSSÃO DOS LIGANTES ENCONTRADOS

Apesar do foco do trabalho ser a identificação de ligantes de PrP^c no epitélio olfatório, ainda serão necessários outros estudos para se determinar se as interações são exclusivas desse tecido ou se também ocorrem em outros locais. A seguir, cada um dos ligantes será discutido separadamente, sempre tentando relacionar a participação das interações com PrP^c no olfato ou no sistema nervoso central.

5.2.1 Vimentina (Vim)

A vimentina, uma proteína de filamento intermediário, é encontrada nos mais diferentes tipos celulares. Sua insolubilidade sugere uma função estrutural celular.

As células gliais, assim como células de Schwann, estão presentes no sistema nervoso central, principalmente no bulbo olfatório, hipotálamo e hipófise, podendo ser o ambiente mimetizado para que sua proliferação ocorra em cultura celular (GUDIÑO-CABRERA & NIETO-SAMPEDRO, 2000). A marcação indicadora de lesão e inflamação dessas células pode ser feita pela vimentina, receptor de p75 NGF, e um tipo de receptor de estrógeno, mostrando uma mistura de propriedades características de células de Schwann e astrócitos (DONCEL-PEREZ *et. al.*, 2009).

Os axônios dos NOS partem do epitélio olfatório e coalescem para formar o nervo olfatório (ON) antes de se projetarem para o bulbo olfatório (OB), o primeiro local de processamento olfativo. Ao alcançar o OB, os axônios dos NOS formam um plexo, a camada de nervo olfativo (ONL). Dentro do ONL, os axônios se reorganizam extensivamente antes de alcançarem o glomérulo alvo (AU *et. al.*, 2002), uma região que serve como unidade de processamento

básico olfatório. Cada glomérulo recebe a entrada a partir de NOS que expressam o mesmo receptor olfatório (OR) (TREOLAR *et. al.*, 2002).

A extensão axonal e sua segmentação nos NOS ocorrem dentro da ONL do bulbo olfatório. Durante o desenvolvimento perinatal, a caderina-2 e o seu parceiro de ligação, a gama-catenina, são preferencialmente expressas por axônios do NOS. Dada a expressão destas moléculas associadas ao citoesqueleto, Akins & Greer (2006b) testaram a hipótese de que os elementos do citoesqueleto de axônios dos NOS poderiam ser diferencialmente expressas em todo o ONL. Eles estudaram a organização do citoesqueleto de axônios dos NOS no ONL, concentrando-se no dia de nascimento. O grupo concluiu que a expressão de microtúbulos e filamentos intermediários de vimentina, periferina e internexina são estabelecidas em axônios de NOS de forma organizada. Demonstraram também a localização diferencial dos elementos do citoesqueleto nesses axônios no dia do nascimento, e que essas diferenças diminuiriam quando o sistema olfatório alcançava a fase madura, o que sugere que a expressão de proteínas relacionadas ao citoesqueleto pode ser especialmente importante durante a formação glomerular, mas não tão importante no sistema maduro.

Com base nesses dados, fica claro o papel da vimentina na organização do citoesqueleto celular de neurônios olfatórios sensoriais, e assim, se sua ligação com PrP^c for confirmada, é possível sugerir que esta interação contribua para as dinâmicas do citoesqueleto dos neurônios sensoriais olfatórios.

5.2.2 Proteína quinase rica em serina/arginina 2 (Srpk5)

Srpk, uma família de quinases do ciclo celular de proteínas reguladas, fosforilam proteínas nucleares que contêm o domínio serina / arginina (Sr) e medeiam o *splicing* de pré-mRNA. Srpk1 é predominantemente expressa no pâncreas, enquanto que Srpk2 é altamente expressa no cérebro, embora ambas sejam co-expressas em outros tecidos humanos e em muitas linhagens de cultura celular (WANG *et al.*, 1998).

Srpk1 e -2 apresentam 92% de identidade. Srpk2 se distingue de Srpk1 na porção média da proteína, que tem uma inserção de domínio ácido. Tanto Srpk1 quanto Srpk2 são primariamente localizadas no citoplasma, apesar de haver sinais de localização nuclear (KUROYANAGI *et. al.*, 1998). Estudos recentes mostram que Srpk2 liga e fosforila uma proteína essencial para o splicing de RNA via Sr, e o redistribui do núcleo para o nucleoplasma, resultando em ciclina A1. Quando Srpk2 é fosforilada, ocorre uma estimulação da sua atividade resultando em apoptose nos neurônios (JANG *et. al.*, 2008).

Já se sabe que neurônios terminalmente diferenciados são incapazes de reentrar no ciclo celular, mas algumas evidências têm demonstrado a regulação positiva do ciclo celular em neurônios em degeneração na doença de Alzheimer (HUSSEMAN *et. al.*, 2000). A ativação do ciclo celular aberrante provoca a morte celular neuronal, enquanto que a inibição do ciclo celular eleva a sobrevivência neuronal. Contudo, o mecanismo molecular que regula o ciclo celular e morte celular de neurônios maduros permanece não muito bem compreendido.

Jang *et al.* (2009) mostram que Srpk2 desencadeia progressão do ciclo celular em neurônios e induz a apoptose através da regulação da ciclina D1 nuclear. Srpk2 é fosforilada promovendo a translocação nuclear da ciclina D1, fazendo assim com que ocorra a reentrada no ciclo celular e apoptose neuronal. Além disso, Srpk2 quando fosforilada, inativa p53. Eles mostraram que a fosforilação de Srpk2 acontece na isquemia cerebral, correlacionando esse fato com o aumento observado dos níveis de ciclina D1.

No entanto, o processo pelo qual Srpk2 é regulada durante a apoptose ainda não é claro. Hong e colaboradores (2011) mostraram que Srpk2 é clivada por caspases nos resíduos Asp-139 e -403. O N-terminal do produto clivado transloca para o núcleo, e promove a apoptose. A fosforilação da SRPK2 impede a sua clivagem por caspases apoptóticas. Os resultados obtidos por eles sugerem que o domínio N-terminal de Srpk2 clivada por caspases transloca para o núcleo, onde promove a condensação da cromatina e a morte celular apoptótica.

Também não há informações na literatura que demonstrem a relação entre Srpk2 e PrP^c. Uma possível relação entre essas proteínas pode estar

relacionada ao complexo processo de apoptose. De fato, dados da literatura indicam que PrP^c possui um papel anti-apoptótico (LINDEN *et al.*, 2008)

5.2.3 Proproteína convertase subtilisina/quexina 5 (Pcsk5)

Pcsk5 convertase é uma pró-proteína envolvida no processamento de proteínas secretórias (LISSITZKY *et al.*, 2000). Tem sido demonstrada a expressão de Pcsk5 no cérebro de roedores, onde se especula estar envolvida no processamento dos neuropeptídios (CAIN *et al.*, 2003). Pcsk5 é também essencial para o desenvolvimento, e a deleção da sua subunidade catalítica é letal no estágio de implantação embrionária (ESSALMANI *et al.*, 2008).

Além disso, essa proteína tem sido associada a níveis de colesterol HDL em humanos (IATAN *et al.*, 2009), embora este efeito seja provavelmente devido à atividade da lipase endotelial e não uma função central de Pcsk5.

Essa proteína encontra-se amplamente distribuída no núcleo dorsomedial do hipotálamo (DMH) (LEE *et al.*, 2012), que está implicado em uma ampla variedade de processos fisiológicos, que vão desde a reprodução, a termogênese, resposta ao estresse, a atividade do nervo pancreático e níveis de glicose no plasma (ZHANG *et al.*, 2011). Nos últimos anos, tem havido grande interesse na demonstração do potencial do DMH na regulação do consumo de alimentos e do ritmo circadiano (GOOLEY *et al.*, 2006). O DMH fica posicionado entre os principais centros circadianos e metabólicos, sendo assim situado no local ideal para realizar a integração dos sinais a partir destes dois sistemas. O DMH expressa também um alto número de neuropeptídios conhecidos pela sua importância na homeostase da energia (BELLINGER & BERNARDIS, 2002)

O papel do DMH no ritmo circadiano, no entanto, ainda não é claro. Experiências de ablação no DMH têm produzido efeitos variáveis sobre o consumo alimentar (BELLINGER & BERNARDIS, 2002), sobre o comportamento alimentar antecipatório e outros ritmos circadianos (GOOLEY *et al.*, 2006; MORIYA *et al.*, 2009).

Sabe-se que PrP^c também pode estar envolvido na resposta ao stress e no controle do ritmo circadiano (LINDEN *et al.*, 2008) , e talvez seja no acontecimento desses processos que PrP^c encontre Pcsk5.

5.2.4 Fator transformador de crescimento beta 1 (Tgfb1)

Os fatores transformadores de crescimento (Tgf's) possuem diferentes papéis em diferentes células e tecidos. Eles modulam a proliferação e diferenciação celular, a formação da matriz extracelular e participam da reação imune (DENNLER, 2002). Uma vez liberados a partir do complexo latente, os Tgf's geram uma unidade de 25 kDa bioativo e produzem respostas celulares através da ligação à seus receptores I e II (TRI e TRII) (MASSAGUÉ, 2000). Estudos *in vitro* têm mostrado que os Tgf's têm um potencial de regular a expressão de si mesmos e seus receptores, o que pode ser necessário para que suas funções biológicas sejam exercidas de maneira adequada (GEBKEN, 1999).

Durante o desenvolvimento, as três isoformas do Tgf (1, 2 e 3) são expressas no sistema nervoso de mamíferos. No entanto, no cérebro adulto, Tgf2 e Tgf3 estão amplamente distribuídos enquanto Tgf1 é restrita às meninges (FLANDERS *et al.*, 1991). Mesmo assim, Tgf1 pode ser fortemente regulado em resposta a ferimentos. Além disso, Tgf1 apresenta um potencial benéfico na proteção à lesão neuronal e promoção de neurogênese (ZHU *et al.*, 2002).

Tgf beta também já foi descrito participando da plasticidade neural adulta (AGETA *et al.*, 2010; SUN *et al.*, 2007). No entanto, o mecanismo pelo qual esse processo ocorre ainda não está claro. Zhang e colaboradores (2012) mostraram que DBL-1, uma proteína homóloga à Tgfb1 de *Caenorhabditis elegans* conhecida por controlar a morfologia do corpo e a imunidade, é essencial para aprendizagem do olfato aversivo à alimentos potencialmente prejudiciais.

Ainda não há nenhuma demonstração real da interação de Tgfb1 com PrP^c. Sabe-se até então que PrP^c tem uma participação essencial no

desenvolvimento do olfato (LE PICHON *et al.*, 2009), e nesse processo é possível que, *in vivo*, PrP^c encontre Tgfb1.

5.2.5 Glutathione S transferase M1 (Gstm1)

GSTM1 é membro da família mu de glutathionas transferases citosolicas. Ela está envolvida no metabolismo da carcinogênese e tem-se apresentado como fator de risco no desenvolvimento de tumores sólidos em mamíferos adultos.

O estresse oxidativo desempenha papel fundamental na patogênese da doença de Alzheimer. Genes que codificam para a atividade metabólica das enzimas metabolizadoras de xenobióticos podem agir como genes candidatos para a demência. A glutathione S-transferase (GST) pode ser exercer um fator de risco para a doença de Alzheimer porque GSTs são parte de uma família de enzimas (enzimas de fase II) que catalisam a conjugação de uma variedade de substratos eletrofílicos, como os xenobióticos (fármacos, produtos químicos, substâncias cancerígenas e pesticidas), com a glutathione (STRANGE *et al.*, 2001)

A atividade da GST reduzida tem sido descrita em várias regiões do cérebro e no ventrículo cerebroespinal em curto intervalo de tempo no *postmortem* de pacientes com Alzheimer (LOVELL *et al.*, 1999). Também já foi demonstrado que, em alguns casos, polimorfismos nos genes de GST podem resultar na codificação de enzimas com atividade catalítica alterada. Estudos prévios de variantes alélicas de GST identificaram dois grandes polimorfismos em Glutathione S transferases da família Mu (GSTM1) e na família Teta (GSTT1) causados pela deleção de genes, o que tem graves consequências fenotípicas. A inatividade enzimática de GSTM1 e GSTT1 está relacionada com maior estresse oxidativo (STRANGE *et al.*, 2001).

Alguns trabalhos indicam que PrP^c também participe de mecanismos resistentes ao estresse oxidativo (LINDEN *et al.*, 2008). Assim, é possível que a interação encontrada entre GSTM1 e PrP^c esteja envolvida na regulação de espécies oxidativas na célula.

5.2.6 Cadeia leve da dineína (Dyn1t1b)

A viabilidade e a função dos neurônios dependem diretamente da ativação do transporte axonal de diversas moléculas contidas em vesículas (GOLDSTEIN *et. al.*, 2009; VERHEY & HAMMOND, 2009). A dineína uma das principais proteínas responsáveis, juntamente com a kinesina, pela direção dos movimentos das vesículas sobre os microtúbulos (MT). Ela utiliza a energia gerada pela hidrólise do ATP para fazer a translocação no movimento anterógrado e retrógrado dos microtúbulos. A dineína citoplasmática é formada por cadeias leve e pesada. A cadeia pesada (DHC) é um motor que interage com um conjunto de unidades acessórias e também com a dinactina (outra proteína motora que funciona como co-fator da dineína), conduzindo assim o transporte sobre o MT (KARDON & VALE, 2009). As dineína e kinesina são motores unidirecionais opostos que atuam juntas (HACHIYA *et. al.*, 2004). A coordenação do movimento pode ocorrer pela associação alternada/dissociação dessas proteínas, sugerindo que a modulação da atividade de ambos os motores acontece pela geração de forças opostas, podendo também sofrer influência do número de motores associados à carga, como num cabo de guerra (GROSS, 2004; WELTE, 2004). Como já foi dito, a porção da dineína responsável por esse movimento sobre os MT é a DHC, sendo a cadeia leve então a porção proteica que se liga à vesícula. Encalada e colaboradores (2011) demonstraram em modelo experimental de transporte de vesículas contendo PrP^c que dineína e kinesina atuam juntas nesse transporte. Eles demonstram que a subunidade kinesina-1C da kinesina e DHC formam o principal motor retrógrado e anterógrado necessário para o transporte de vesículas de PrP^c em axônios de mamíferos, e que a regulação da atividade motora exercida sobre vesículas de PrP^c determina a direção do movimento. Os resultados sugerem que a combinação das interações motoras e regulações coordenadas podem atuar *in vivo* como motores de polaridades opostas influenciando na motilidade, e que kinesina e DHC dependem de interação física pra exercerem suas funções no transporte. Assim, relacionando com os nossos resultados, é possível que a interação encontrada na varredura, entre a cadeia leve da dineína e o PrP^c esteja envolvida no transporte de vesículas contendo PrP^c e que realmente tenha um significado biológico.

Entretanto, mais estudos serão necessários para mostrar se essa ligação ocorre *in vivo*, pois durante o transporte de vesículas, PrP^c fica voltado para o interior da vesícula, não tendo acesso à cadeia da dineína.

Carson e colaboradores (2005) demonstraram que a caspase 8 pode atuar como uma iniciadora da apoptose de neurônios olfatórios sensoriais (NOS) do epitélio olfatório após bulbectomia e também depois da indução de instabilidade sináptica. As caspases 8 e 3 são sequencialmente ativadas dentro do NOS terminal pré-sináptico. Um complexo formado por caspase 8 com dinactina é transportado retrogradamente, precedendo a ativação axonal da caspase 3 e a subsequente apoptose do NOS. Uma vez que a caspase-8 é maximamente ativada no terminal pré-sináptico, ela é transportada retrogradamente pelo motor formado pelo complexo dinactina/dineína, um processo que pode ser inibido focalmente para inibir a apoptose do NOS após lesão axonal aguda. Estes dados revelam um novo mecanismo de apoptose impulsionado por movimento retrógrado, em que a caspase-8 interage diretamente com o complexo motor em que a dineína está envolvida.

No entanto, não existe nenhuma informação na literatura que mostre ou sugira uma interação direta entre PrP^c e cadeia leve de dineína, como encontrado nos nossos experimentos.

5.2.7 Proteína 1 ligante de NEDD4 (N4bp1)

Muitas proteínas podem ser conjugadas com ubiquitina e com um pequeno modificador relacionado à ubiquitina (SUMO), sendo que a interferência destas duas modificações pós-traducionais servem para regular a função da proteína e sua estabilidade. N4BP1 é uma proteína nucleolar que sofre esses dois tipos de marcação, sendo ela poliubiquitilada por SUMO-regulação (SHARMA *et. al.*, 2010).

O proteassoma de ubiquitina desempenha um papel fundamental em diversos processos nucleares, incluindo a manutenção da estrutura da cromatina e reparo do DNA, controle da proliferação celular e da morte celular programada (HERSHKO & CIECHANOVER, 1998).

Murillas (2002), na investigação de alvos proteicos que sofrem degradação mediada por marcação com ubiquitina, encontraram, via duplo híbrido em leveduras, N4BP1 interagindo com alguns domínios específicos (WW e HECT) da ubiquitina ligase E3 Nedd4. Essa marcação desempenha um papel-chave no dobramento normal das proteínas (MURILLAS *et al.*, 2002). Sharma e colaboradores. (2010) mostraram que N4BP1 transfectadas transitoriamente ficam localizadas em discretos domínios subnucleares e funciona como substrato para a monoubiquitilação mediada por NEDD4. Um trabalho também recente demonstrou que N4BP1 interage com o domínio ITCH da ligase E3, mas não é um substrato para a ubiquitilação mediada por este domínio (OBERST *et al.*, 2007)

Se essa é a função primária do N4BP1 não se sabe, mas o trabalho de Anantharaman & Aravind (2006) previu que N4BP1 poderia ter também uma atividade de ribonuclease além de participar da ubiquitilação.

Sharma (2010) em seu trabalho localizou N4BP1 endógena no nucléolo de células de cultura primária, sugerindo um papel no processamento do RNA nucleolar. Mostraram também que N4BP1 sofre poliubiquitilação e degradação proteossoma dependente.

A interação de PrP^c com esse ligante reforça a ideia de que PrP^c possivelmente seja reciclado intracelularmente via ubiquitilação (BARBIERI *et al.*, 2011), e a interação encontrada neste projeto sugere que esse processo seja mediado pela ubiquitina ligase E3 NEDD4 dependente da ligação com N4BP1.

5.2.8 Beta catenina associada à caderina 1 (Ctnnb1)

A via periférica olfativa é uma parte única do sistema nervoso. Neurônios olfatórios sensoriais (NOS) são aqueles neurônios situados em um epitélio de superfície, o epitélio olfatório (OE), e, assim, têm de criar uma barreira epitelial. Eles estão diretamente expostos a agentes tóxicos ou infecciosos do ar, o que pode causar degeneração desses neurônios. A perda de reconhecimento de odor é prevenida pela geração contínua de NOS a partir da divisão de células progenitoras neuronais do epitélio basal. Recém-gerados, os NOS imaturos

movem-se apicalmente no epitélio, estendendo seus dendritos para o epitélio de superfície e seus axônios para o bulbo olfatório (OB), onde atingem os glomérulos e formam sinapses (SCHWOB, 2002).

A projeção dos axônios dos NOS para o OB é um processo complexo, mas bem regulado. Embora se saiba que as proteínas receptoras de odor e outras moléculas estejam implicadas neste processo, como isso acontece ainda não está muito bem esclarecido. Akins e Greer (2006) demonstraram que os axônios permanecem restritos à camada exterior do nervo olfatório e que as interações celulares são mediadas, em parte, por moléculas de adesão celular. As caderinas são uma grande família de moléculas de adesão cuja função depende de seus parceiros ligantes intracelulares, as cateninas, que por sua vez fazem a ligação com o citoesqueleto. Alfa e beta-cateninas são encontradas em todo o OB e são expressas uniformemente em todos os NOS. Essas proteínas são expressas predominantemente durante o desenvolvimento perinatal, embora também sejam expressas uniformemente na idade adulta (AKINS e GREER (2006)).

Junções oclusivas e de adesão entre os neurônios, células epiteliais e gliais fornecem uma barreira e conferem propriedades de adesão no OE. Essas junções também auxiliam na compartimentalização e crescimento axonal dos NOS (BOOKER-DWYER *et. al.*, 2007). Steinke & Detlev (2008) demonstraram que caderinas e alfa e beta-cateninas estão co-localizadas nas junções oclusivas de OE. Além disso, eles mostraram que entre neurônios imaturos e maduros existem numerosos focos de contato. Junções de adesão foram documentadas entre células do epitélio olfatório (OECs), entre OECs e axônios, e entre axônios. A presença e composição molecular de junções de adesão são consistentes com um papel de proteínas em processos neuroplásticos na via periférica olfativa.

Nesse contexto, pode-se sugerir que, sendo a beta-catenina um ligante de PrP^c, a interação destas proteínas pode estar envolvida nos processos de adesão celular.

Vários sistemas de neurotransmissão são danificados em TSEs, particularmente o sistema serotoninérgico (LEDOUX, 2004). Um distúrbio no metabolismo serotoninérgico em um caso da doença de Creutzfeldt-Jakob foi descrita pela primeira vez em 1971 por Brun e colaboradores (1971). Em 2000,

alguns autores sugeriram uma função da transdução de PrP^c nos neurônios serotoninérgicos e noradrenérgicos (MOUILLET-RICHARD *et. al.*, 2000). O peptídeo priônico (proveniente de PrP^{Sc}) 106-126 induz a apoptose neuronal por ativação da glicogênio sintetase quinase 3 (Gsk-3) através, principalmente, da sinalização celular induzida pela beta catenina expressa na membrana como receptor/ sinalizador celular (PÉREZ *et. al.*, 2003). Neste cenário, pode-se inferir um papel relevante da proteína príon nos processos sinápticos e de indução de morte neuronal, uma vez que a via de sinalização beta-catenina tem um papel central no controle da proliferação e da morte celular (MOUILLET-RICHARD *et. al.*, 2000).

5.2.9 Proteína multivesicular carregada 2A (Chmp2a)

O direcionamento de proteínas transmembrana ubiquitiniladas dentro dos corpos multivesiculares endossomais (MVBs- do inglês “multivesicular bodies”) dependem do seu reconhecimento pelos complexos de endereçamento endossomal necessário para o transporte (ESCRTs), que também são necessários para a formação de MVB. O modelo originalmente proposto para o funcionamento dos ESCRTs simplifica a coordenação de reconhecimento da vesícula mas não pode explicar porque ESCRTs são necessários para o surgimento de vesículas MVB (NICKERSON *et. al.*, 2007).

ESCRT-III é necessário para a formação e rompimento de vesículas endossomais intraluminais, o que dá origem a corpos multivesiculares e citocinese. O ESCRT-III é composto de 11 membros em humanos, que, com exceção de um membro, correspondem às seis proteínas ESCRT-III-*like* em leveduras. CHMP2A (homóloga à proteína VPS2 de leveduras) e CHMP3 se unem em estruturas tubulares helicoidais que fornecem uma plataforma para a interação da membrana e VPS (proteína de triagem vacuolar) 4, catalisando efeitos que levam a desmontagem dos polímeros ESCRT-III-CHMP2A CHMP3 *in vitro* (LATA *et. al.*, 2009). Ainda segundo Lata, a função de CHMP2A no complexo é fazer a constrição/fissão da membrana com CHMP3.

Uma relação possível entre o complexo ESCRT e PrP^c pode estar relacionado ao processo de endereçamento e posterior degradação de PrP^c

após sofrer endocitose, uma vez que já foi visto que PrP^c recebe a marcação de ubiquitina para processamento (BARBIERI *et al.*, 2011).

5.2.10 STIP1 homology and U-Box containing protein 1 (Stub1)

STUB1 ou CHIP é uma ubiquitina ligase / cochaperona que participa no controle de qualidade de proteínas, visando uma ampla gama de substratos de proteínas chaperonas para degradação.

Receptores Toll-like (TLRs) desempenham papéis importantes tanto na imunidade inata quanto na adaptativa (KAWAI & AKIRA, 2010). O processo de ubiquitilação de proteínas, o qual é mediado por enzimas conhecidas como E1, E2 e E3, e o processo de deubiquitilação, que é mediado por enzimas deubiquitiladoras (Dubs), desempenham um papel importante na modulação das respostas imunes (LIU *et al.*, 2005). Foi relatado que efeitos e mecanismos de ligases E3 são essenciais para a sinalização por TLR. Portanto, a maneira de ubiquitilação pela E3 e o contato de substratos ubiquitilados com Dubs pode decidir a intensidade da sinalização por TLR e o destino dos seus componentes (LIU *et al.*, 2005)

Yang e colaboradores (2011) descobriram que o *knockdown* de uma das E3, (STUB1), inibiu significativamente a sinalização frente ao estímulo por LPS (sinal gerado via TLR4). Trabalhos anteriores sugerem que STUB1 contém um anel de U-box e atua como E3 em combinação com chaperonas como Hsp70 e Hsp90 (*heat shock protein*) para mediar a ubiquitilação de chaperonas ligadas a substratos (DICKKEY *et al.*, 2006). Tem sido demonstrado o envolvimento de STUB1 como mediador da ubiquitilação de diversas proteínas, incluindo receptores de membrana, fatores de transcrição, quinases e várias proteínas patológicas (DICKKEY *et al.*, 2006). Camundongos *knockout* de STUB1 apresentam atrofia e apoptose sensível à temperatura em diversos órgãos, deficiência nas respostas ao estresse de calor e no dobramento de proteínas, longevidade diminuída e aceleração do envelhecimento (MARUYAMA *et al.*, 2010; NAITO *et al.*, 2010).

Jang e colaboradores (2011) mostraram que a superexpressão de STUB1 inibe significativamente a invasão de células de câncer de mama. Além disso,

mostraram que STUB1 inibe fortemente a localização nuclear e a atividade transcricional de NF- κ B. Isso foi comprovado pelo aumento significativo da capacidade de invasão celular apresentada quando na supressão da expressão de STUB1 por RNA de interferência.

Assim, como já mencionado para outros ligantes, pode-se relacionar a interação encontrada entre PrP^c e STUB1 com o mecanismo de ubiquitinação. STUB1, como o próprio nome indica, é uma proteína homóloga à STIP1 (*Stress-Inducible- Phosphoprotein 1*). Ambas proteínas possuem domínios repetidos de tetratricopeptídeos (domínios TRPs). Várias proteínas que apresentam domínios TRPs participam de interações com proteínas de “heat shock”, como Hsp70, Hsp90 e Hsc70, sendo importantes para o correto dobramento de proteínas recém-sintetizadas. Essa função foi demonstrada tanto para STUB1 (BALLINGER *et al.* 1999), quanto para STI1 (SMITH *et al.*, 1993). O mais interessante é que STI1 é um ligante já bem conhecido de PrP^c e essa interação está envolvida em processos de neuritogênese, neuroproteção entre outros (LINDEN *et al.* 2008). Ainda precisa-se investigar melhor se a interação encontrada entre STUB1 e PrP^c é devida a homologia da primeira com STI1 ou se essa interação participa de outros processos, sobretudo no sistema olfatório.

6. CONCLUSÕES

A varredura da biblioteca de cDNA de epitélio olfatório de camundongo com a isca de PrP^c foi realizada, obtendo-se como resultado 10 possíveis ligantes de PrP^c. O ligante Ctnnb1 foi o único que, por enquanto, foi confirmado por outra técnica (*pull down*).

O presente trabalho identificou ligantes inéditos de PrP^c, o que pode contribuir para a elucidação da seu papel fisiológico, bem como para determinação de alvos terapêuticos para as doenças relacionadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGETA, H.; IKEGAMI, S.; MIURA, M. et al. Activin plays a key role in the maintenance of long-term memory and late-LTP. **Learning and memory**, v. 23, n. 4, p. 176–85, 2010.

AKINS, M. R.; GREER, C. A. Axon Behavior in the Olfactory Nerve Reflects the Involvement of Catenin – Cadherin Mediated Adhesion. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 499, n. April, p. 979–989, 2006a.

AKINS, M. R.; GREER, C. A. Cytoskeletal Organization of the. **The journal of comparative neurology**, v. 494, p. 358–367, 2006b.

ALPEROVITCH, A.; ZERR, I.; POCCHIARI, M; et al. Codon 129 prion protein genotype and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease Low 1-year prevalence of atopic eczema in very low birth weight Alcohol injection: a new method of treating placental chorioangiomas. **Research letters**, v. 353, p. 1998–1999, 1999.

ANANTHARAMAN, V.; ARAVIND, L. Novel Predicted RNAses with a PIN Domain-Like Fold. **RNA Biology**, v. 3, p. 18–27, 2006.

AU, W. W.; TRELOAR, H. B.; GREER, C. A. Sublaminar Organization of the Mouse Olfactory Bulb Nerve Layer. **The Journal of comparative neurology**, v. 446, n. October 2001, p. 68–80, 2002.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology** (John Wiley & Sons, Inc.), v.3, u. 20.1, 1999.

BARBIERI, G.; PALUMBO, S.; GABRUSIEWICZ, K. *et al.* Silencing of cellular prion protein (PrPC) expression by DNA-antisense oligonucleotides induces autophagy-dependent cell death in glioma cells. **Autophagy**, v. 7, n. 8, p. 840–853, 2011.

BALLINGER, L. L.; BERNARDIS, L. L. The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: Lessons learned from lesioning studies. **Physiological Behavior**, v. 76, p. 431–442, 2002.

BENDHEIM, P.E.; BROWN, H.R.; RUDELLI, R.D.; SCALA, L.J.; GOLLER, N.L.; WEN, G.Y.; KASCSAK, R.J.; CASHMAN, N.R.; BOLTON, D.C. Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. **Neurology** v. 42 p. 149-156, 1992.

BESSEN RA, SHEARIN H, MARTINKA S, BOHARSKI R, LOWE D, WILHAM JM, CAUGHEY B, WILEY JA. Prion shedding from olfactory neurons into nasal secretions. **PLoS Pathog.** 6: e1000837, 2010.

BIMBOIM, H.C.; DOLY, J. A Rapid Alkaline Extraction Procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucl. Acids Res.** v. 7 n. 6 p. 1513-1523, 1979.

BOLTON, D. C.; MCKINLEY, M. P.; S.B., P. specific relation between this protein and the infectious particle.'For this reason,. **Science Mag**, v. 218, n. December, p. 1309–1311, 1982.

BOOKER-DWYER, T.; HIRSH, S.; ZHAO, H. A Unique Cell Population in the Mouse Olfactory Bulb Displays Nuclear β -Catenin Signaling During

Development and Olfactory Sensory Neuron Regeneration. **Developmental neurobiology**, v. 68, n. 7, p. 859–869, 2007.

BORCHELT, D. R., SCOTT, M., TARABOULOS, A., STAHL, N., AND PRUSINER, S. B. Sphingolipid depletion increases formation of the scrapie prion protein in neuroblastoma cells infected with prions. **J. Cell Biol.** 110, 743–752, 1990.

BRENT, R.; PTASHNE, M. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. **Cell**, v. 43, n. 3 Pt 2, p. 729–36, 1985.

BRÜCKNER, A., POLGE, C., LENTZE, N., AUERBACH, D., SCHLATTNER, U. Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology, **Int. J. Mol. Sci.** 10: 2763-2788, 2009.

BRUN, A., GOTTFRIES C.G., ROOS, B.E. Studies of the monoamine metabolism in the central nervous system in Jakob– Creutzfeldt disease. **Acta Neurol Scandinav** v. 47 p. 642–5; 1971.

BÜELER, H.; FISCHER, M.; LANG, Y.; BLUETHMANN, H., LIPP, H.-P.; DEARMOND, S.J.; PRUSINER, S.B.; AGUET, M.; WEISSMANN, C. Normal development and behavior of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. **Nature**, v. 356 p. 577-582, 1992.

BÜELER, H.; AGUZZI, A; SAILER, A; et al. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. **Cell**, v. 73, n. 7, p. 1339–47, 1993.

CAIN, B. M.; CONNOLLY, K.; BLUM, A.; VISHNUVARDHAM, D.; MARCHAND, J. E. Distribution and Colocalization of Cholecystokinin with the Prohormone and PC5 in Rat Brain. **The Journal of comparative neurology**, v. 467, p. 307–325, 2003.

CAMPANA, V., SARNATARO, D., FASANO, C., CASANOVA, P., PALADINO, S., AND ZURZOLO, C. Detergent-resistant membrane domains but not the proteasome are involved in the misfolding of a PrP mutant retained in the endoplasmic reticulum **J. Cell Sci.** 119, 433–442, 2006.

CARSON, C.; SALEH, M.; FUNG, F. W.; NICHOLSON, D. W.; ROSKAMS, A. J. Axonal Dynactin p150 Glued Transports Caspase-8 to Drive Retrograde Olfactory Receptor Neuron Apoptosis. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 26, p. 6092–6104, 2005.

CAUGHEY, B., AND RAYMOND, G. J. The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. **J. Biol. Chem.** v. 266, p.18217–18223, 1991.

CHIESA, R.; HARRIS, D. A. Fishing for prion protein function. **PLoS biology**, v. 7, n. 3, p. e75, 2009.

CLONTECH. **Yeast Protocols Handbook**. Clontech Laboratories, Inc., 2000.

DENNLER, S. Transforming growth factor beta signal transduction. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 71, p. 731–740, 2002.

DIBATTISTA M, MASSIMINO ML, MAURYA DK, MENINI A, BERTOLI A, SORGATO MC. The cellular prion protein is expressed in olfactory sensory

neurons of adult mice but does not affect the early events of the olfactory transduction pathway. **Chem Senses.**, 2011.

DICKEY, C. A.; PATTERSON, C.; DICKSON, D.; PETRUCCELLI, L. Brain Chip: removing the culprits in neurodegenerative disease. **Trends in molecular medicine**, v. 13, n. 1, p. 32–38, 2006.

DONCEL-PEREZ, E.; NIETO-SAMPEDRO, M.; CABALLERO-CHACON, S. Neurosphere Cell Differentiation to Aldynoglia Promoted by Olfactory Ensheathing Cell Conditioned Medium. **Glia**, v. 57, n. January, p. 1393–1409, 2009.

DRON, M., DANDOY-DRON, F., FAROOQ SALAMAT, M. K., AND LAUDE, H. Proteasome inhibitors promote the sequestration of PrPSc into aggresomes within the cytosol of prion-infected CAD neuronal cells. **J. Gen. Virol.** 90, 2050–2060 (32, 33); 2009.

EDENHOFER, F, RIEGER, R, FAMULOK, M, WENDLER, W, WEISS, S, WINNACKER, EL. Prion protein PrPc interacts with molecular chaperones of the Hsp60 family. **J Virol.** v. 70 n. 7 p. 4724-8, 1996.

ENCALADA, S. E.; SZPANKOWSKI, L.; XIA, C.; GOLDSTEIN, L. S. B. Stable kinesin and dynein assemblies drive the axonal transport of mammalian prion protein vesicles. **Cell**, v. 144, n. 4, p. 551–65, 2011.

ELLGAARD, L., MOLINARI, M., AND HELENIUS, A. Setting the standards: quality control in the secretory pathway. **Science**, v. 286 p. 1882–1888, 1999.

ESSALMANI, R.; ZAID, A.; MARCINKIEWICZ, J. et al. In vivo functions of the proprotein convertase PC5 / 6 during mouse development: Gdf11 is a likely substrate. **PNAS**, v. 105, p. 5750–5755, 2008.

FIORITI, L.; DOSSENA, S.; STEWART, L. R. et al. Cytosolic prion protein (PrP) is not toxic in N2a cells and primary neurons expressing pathogenic PrP mutations. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 12, p. 11320–8, 2005.

FIRESTEIN, S. How the olfactory system makes sense of scents. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 211–8, 2001.

FLANDERS, K. C.; LUDECKE, G.; ENGELS, S. et al. Localization and actions of transforming growth factor beta' s in the embryonic nervous system. **Development**, v. 113, p. 183–191, 1991.

GEBKEN, J.; FEYDT, A.; BRINCKMANN, J.; NOTBOHM, H.; MU, P. K. Ligand-induced downregulation of receptors for TGF- in human osteoblast-like cells from adult donors. **J Endocrinol.**, v. 161, p. 503–510, 1999.

GILCH, S., WINKLHOFER, K. F., GROSCHUP, M. H., NUNZIANTE, M., LUCASSEN, R., SPIELHAUPTER, C., MURANYI, W., RIESNER, D., TATZELT, J., AND SCHA'TZL, H. M. Intracellular re-routing of prion protein prevents propagation of PrP(Sc) and delays onset of prion disease. **Embo J.** 20, 3957–3966, 2001.

GOLDSTEIN, A. Y. N.; WANG, X.; SCHWARZ, T. L. Axonal Transport and the Delivery of Presynaptic Components. **Curr Opin Neurobiol.**, v. 18, n. 5, p. 495–503, 2009.

GOLEMIS, E. A.; SEREBRIISKII, I.; FINLEY, R. L.; KOLONIN M. G.; GYURIS, J.; BRENT R.; Interaction Trap/ Two-Hybrid System to Identify Interacting Proteins. **Current Protocols in Molecular Biology**. 20.1: 20.1.1-20.1.40, 2008.

GOOLEY, J. J.; SCHOMER, A.; SAPER, C. B. The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. **Nature neuroscience**, v. 9, p. 398–407, 2006.

GROSS, S. P. Hither and yon: a review of bi-directional microtubule-based transport. **Phys. Biol.**, v. 1, p. R1–R11, 2004.

GUDIÑO-CABRERA, G.; NIETO-SAMPEDRO, M. Schwann-Like Macrogliia in Adult. **Glia**, v. 30, p. 49–63, 2000.

GUO, M.; HUANG, T.; CUI, Y. et al. PrPC interacts with tetraspanin-7 through bovine PrP154-182 containing alpha-helix 1. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 365, n. 1, p. 154–7, 2008.

HACHIYA, N. S.; WATANABE, K.; YAMADA, M.; SAKASEGAWA, Y.; KANEKO, K. Anterograde and retrograde intracellular trafficking of fluorescent cellular prion protein. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 315, p. 802–807, 2004.

HEAD, M. W.; RITCHIE, D.; SMITH, N. et al. Peripheral Tissue Involvement in Sporadic , Iatrogenic , and Variant Creutzfeldt-Jakob Disease. **Immunohistochemical**, v. 164, n. 1, p. 143–153, 2004.

HEGDE, R.S., TREMBLAY, P., GROTH, D., DEARMOND, S.J., PRUSINER, S.B., LINGAPPA, V.R. Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration. **Nature** v.402 n.6763 p.822-6, 1999.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin system. **Annual Rev Biochem.**, v. 67, p. 425–79, 1998.

HONG, Y.; JANG, S.; YE, K. The N-terminal Fragment from Caspase-cleaved Translocates into the Nucleus and Promotes Apoptosis *. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 1, p. 777–786, 2011.

HORIUCHI, M. & CAUGHEY, B. 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, 3193–3203, 1999.

HUANG, T.; XU, J.; XIANG, J. et al. PrPC interacts with potassium channel tetramerization domain containing 1 (KCTD1) protein through the PrP (51-136) region containing octapeptide repeats. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 417, n. 1, p. 182–6, 2012.

HUSSEMAN, J. W.; NOCHLIN, D.; VINCENT, I. Mitotic activation : a convergent mechanism for a cohort of neurodegenerative diseases. **Neurobiology of Aging**, v. 21, p. 815–828, 2000.

IATAN, I.; DASTANI, Z.; DO, R. et al. Genetic Variation at the Proprotein Convertase Subtilisin / Kexin Type 5 Gene Modulates High-Density. **Circ Cardiovasc Genet.**, v. 2, p. 467–475, 2009.

JANG, K. W.; LEE, K. H.; KIM, S. H. et al. Ubiquitin Ligase CHIP Induces TRAF2 Proteasomal Degradation and NF-κB Inactivation to Regulate Breast

- Cancer Cell Invasion. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, p. 3612–3620, 2011.
- JANG, S.; LIU, X.; FU, H. et al. Interaction of Akt-phosphorylated SRPK2 with 14-3-3 Mediates Cell Cycle and Cell Death in Neurons. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 36, p. 24512–24525, 2009.
- JANG, S.; YANG, S.; EHLÉN, Å. et al. Serine / Arginine Protein – Specific Kinase 2 Promotes Leukemia Cell Proliferation by Phosphorylating Acinus and Regulating Cyclin A1. **Cancer Res**, v. 68, p. 4559–4570, 2008.
- KARDON, J. R.; VALE, R. D. Regulators of the cytoplasmic dynein motor. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 10, n. 12, p. 854–865, 2009.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature immunology**, v. 11, n. 5, p. 373–384, 2010.
- KERR, D. S.; VON DANNECKER, L. E. C.; DAVALOS, M.; MICHALOSKI, J. S.; MALNIC, BETTINA. Ric-8B interacts with G alpha olf and G gamma 13 and co-localizes with G alpha olf, G beta 1 and G gamma 13 in the cilia of olfactory sensory neurons. **Molecular and cellular neurosciences**, v. 38, n. 3, p. 341–8, 2008.
- KINCAID, A. E.; BARTZ, J. C. The nasal cavity is a route for prion infection in hamsters. **Journal of virology**, v. 81, n. 9, p. 4482–91, 2007.
- KOLONIN, MG, ZHONG, J, FINLEY JR, RL. Interaction mating methods in two-hybrid systems, **Methods in Enzymology** v. 328 p. 26-46, 2000.
- KOVÁCS, G. G.; TRABATTONI, G.; HAINFELLNER, J. A; et al. Mutations of the prion protein gene phenotypic spectrum. **Journal of neurology**, v. 249, n. 11, p. 1567–82, 2002.
- KOVÁCS, T.; BECK, J. A; PAPP, M. I. et al. Familial prion disease in a Hungarian family with a novel 144-base pair insertion in the prion protein gene. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 78, n. 3, p. 321–3, 2007.
- KRISTIANSEN, M.; DERIZIOTIS, P.; DIMCHEFF, D.E Disease-associated prion protein oligomers inhibit the 26S proteasome. **Mol Cell**, v. 26, p. 175–188, 2007.
- KUROYANAGI, N.; ONOGI, H.; WAKABAYASHI, T.; HAGIWARA, M. Novel SR-Protein-Specific Kinase , SRPK2 , Disassembles Nuclear Speckles. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 364, n. 242, p. 357–364, 1998.
- KURSCHNER, C; MORGAN, JI. The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. **Brain Res Mol Brain Res**.v.30 n. 1 p. 165-8, 1995.
- LATA, S.; SOLOMONS, J.; PIRES, R.; WEISSENHORN, W. Structure and function of ESCRT-III. **Biochemical Society Transactions**, v. 37, p. 156–160, 2009.

LEDOUX, J-M Effects on the serotonergic system in sub-acute transmissible spongiform encephalopathies: current data, hypotheses, suggestions for experimentation **Medical Hypotheses** v. 64, p, 910–918, 2005.

LEE, S.; BOOKOUT, A. L.; LEE, C. E. et al. Laser-Capture Microdissection and Transcriptional Profiling of the Dorsomedial Nucleus of the Hypothalamus. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 3632, p. 3617–3632, 2012.

LEHMAN, N. L. The ubiquitin proteasome system in neuropathology **Acta Neuropathol.** 118, 329–347, 2009.

LE PICHON, C. E.; FIRESTEIN, STUART. Expression and localization of the prion protein PrP(C) in the olfactory system of the mouse. **The Journal of comparative neurology**, v. 508, n. 3, p. 487–99, 2008.

LE PICHON, C. E.; VALLEY, M. T.; POLYMENIDOU, M. *et al.* Olfactory behavior and physiology are disrupted in prion protein knockout mice. **Nature neuroscience**, v. 12, n. 1, p. 60–9, 2009.

LINDEN, R.; CAMMAROTA, N.; MARTINS, V. R.; PRADO, M. A. M.; BIOFI, I. D. Physiology of the Prion Protein. **Physiol Rev**, p. 673–728, 2008.

LINDHOLM, D., WOOTZ, H., AND KORHONEN, L. ER stress and neurodegenerative diseases **Cell Death. Differ.** v. 13 n. 16 p. 385–392, 2006.

LISSITZKY, J.; LUIS, J.; MUNZER, J. S. et al. Endoproteolytic processing of integrin pro- α subunits involves the redundant function of furin and proprotein convertase (PC) 5A, but not paired basic amino acid converting enzyme (PACE) 4, PC5B or PC7. **Biochem. J.**, v. 346, p. 133–138, 2000.

LIU, Y.; PENNINGER, J.; KARIN, M. Immunity by ubiquitylation: a reversible process of modification. **Nature reviews Immunology**, v. 5, p. 941–952, 2005.

LOVELL, M. A.; GABBITA, S. P.; MARKESBERY, W. R. Increased DNA Oxidation and Decreased Levels of Repair Products in Alzheimer ' s Disease Ventricular CSF. **Journal of Neurochemistry**, v. 72, n. 2, p. 771–776, 1999.

MALNIC, B; HIRONO, J.; SATO, T.; BUCK, L. B. Combinatorial receptor codes for odors. **Cell**, v. 96, n. 5, p. 713–23, 1999.

MARTINS VR, BERALDO FH, HAJJ GN, LOPES MH, LEE KS, PRADO MM, LINDEN R. Prion protein: orchestrating neurotrophic activities. **Curr Issues Mol Biol.** 12: 63-86, 2010.

MARUYAMA, T.; KADOWAKI, H.; OKAMOTO, N. et al. CHIP-dependent termination of MEKK2 regulates temporal ERK activation required for proper hyperosmotic response. **Embo J.**, v. 29, n. 15, p. 2501–2514, 2010.

MASSAGUÉ, J. How cells read TGF-beta signals. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 1, p. 169–178, 2000.

MENÉNDEZ-BENITO, V., VERHOEF, L. G., MASUCCI, M. G., AND DANTUMA, N. P. Endoplasmic reticulum stress compromises the ubiquitin-proteasome system. **Hum. Mol. Genet.** 14, 2787–2799, 2005.

MEYER, R. K.; MCKINLEY, M. P.; BOWMAN, K. A. et al. scrapie prion proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, n. April, p. 2310–2314, 1986.

MOLERES, F. J.; VELAYOS, J. L. Expression of PrP(C) in the rat brain and characterization of a subset of cortical neurons. **Brain research**, v. 1056, n. 1, p. 10–21, 2005.

MOMBAERTS, P. Axonal wiring in the mouse olfactory system. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 22, p. 713–37, 2006.

MORIYA, T.; AIDA, R.; KUDO, T. et al. The dorsomedial hypothalamic nucleus is not necessary for food-anticipatory circadian rhythms of behavior, temperature or clock gene expression in mice. **European Journal of Neuroscience**, v. 29, p. 1447–1460, 2009.

MOUILLET-RICHARD S, ERMONVAL M, CHEBASSIER C. Signal transduction through prion protein. **Science** 289:1925–8; 2000.

MURILLAS, R.; SIMMS, K. S.; HATAKEYAMA, S.; WEISSMAN, A. M.; KUEHN, M. R. Identification of Developmentally Expressed Proteins That Functionally Interact with Nedd4 Ubiquitin Ligase. **JBC Papers in Press**, v. 277, n. 4, p. 2897–2907, 2002.

NAITO, A. T.; OKADA, S.; MINAMINO, T. Promotion of CHIP-mediated p53 degradation protects the heart from ischemic injury. **Circulations Research**, v. 106, n. 11, p. 1692–1702, 2010.

NICKERSON, D. P.; RUSSELL, M. R. G.; ODORIZZI, G. A concentric circle model of multivesicular body cargo sorting. **Embo Reports**, v. 8, n. 7, 2007.

NUNZIANTE, M., ACKERMANN, K., DIETRICH, K., WOLF, H., GADTKE, L., GILCH, S., VORBERG, I., GROSCHUP, M., SCHATZ, H. M. Proteasomal Dysfunction and Endoplasmic Reticulum Stress Enhance Trafficking of Prion Protein Aggregates through the Secretory Pathway and Increase Accumulation of Pathologic Prion Protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 39, p. 33942–53, 2011.

OBERST, A.; MALATESTA, M.; AQEILAN, R. I. et al. The Nedd4-binding partner 1 (N4BP1) protein is an inhibitor of the E3 ligase Itch. **PNAS**, v. 104, p. 11280–11285, 2007.

ORIGENE. **DupLEX-A Yeast Two-Hybrid System**. OriGene Technologies, Inc., v. 2,7, 2008

PÉREZ M, ROJO AI, WANDOSELL F, DÍAZ-NIDO J, AVILA J. Prion peptide induces neuronal cell death through a pathway involving glycogen synthetase kinase 3. **Biochem J** 372:129–36; 2003.

RIEGER, R, EDENHOFER, F, LASMÉZAS, CI, WEISS, S. The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. **Nat Med**. v. 3 n. 12 p 1383–8, 1997.

SBRICCOLI, M.; CARDONE, F.; VALANZANO, A.; LU, M.; GRAZIANO, S.; DE PASCALIS, A.; INGROSSO, L.; ZANUSSO, G.; MONACO, S.; BENTIVOGLIO, M.; POCCHIARI, M. Neuroinvasion of the 263K scrapie strain after intranasal administration occurs through olfactory-unrelated pathways. **Acta Neuropathol**. 117: 175–184, 2009.

SCHRDER, M., AND KAUFMAN, R. J. The mammalian unfolded protein response **Annu. Rev. Biochem**. 74, 739–789, 2005.

- SCHWOB, J. E. Neural Regeneration and the Peripheral Olfactory System THE PERIPHERAL OLFACTORY. **The Anatomical Record**, v. 269, p. 33–49, 2002.
- SHARMA, P.; MURILLAS, R.; ZHANG, H.; KUEHN, M. R. N4BP1 is a newly identified nucleolar protein that undergoes SUMO-regulated polyubiquitylation and proteasomal turnover at promyelocytic leukemia nuclear bodies. **Journal of Cell Science**, v. 123, p. 1227–1234, 2010.
- SMITH, DF., SULLIVAN, WP., MARION, DF., ZAITSU, K., MADDEN, B., MCCORMICK, DJ., TOFT, DO. Identification of a 60-kilodalton stress-relates protein, p60, witch interacts with hsp90 and hsp70. **Mol. Cell. Biol.** v. 13 p 869-876, 1993.
- SPIELHAUPTER, C, SCHÄTZL, HM. PrPC directly interacts with proteins involved in signaling pathways. **J Biol Chem** v.276 n. 48 p. 44604-12, 2001.
- STEELE, A. D.; LINDQUIST, S.; AGUZZI, A. A Phenotype Under Challenge ND ES SC RIB. **Prion**, n. June, p. 83–93, 2007.
- STEINKE, A.; DETLEV, S. M. Molecular composition of tight and adherens junctions in the rat olfactory epithelium and Wla. **Histochem Cell Biol**, v. 130, p. 339–361, 2008.
- STRANGE, R. C.; SPITERI, M. A.; RAMACHANDRAN, S.; FRYER, A. A. Glutathione-S-transferase family of enzymes. **Mutation Research**, v. 482, p. 21–26, 2001.
- SUN, M.; THOMAS, M. J.; HERDER, R. *et al.* Presynaptic contributions of chordin to hippocampal plasticity and spatial learning. **The Journal of neuroscience** v. 27, n. 29, p. 7740–50, 2007.
- TRELOAR, H. B.; FEINSTEIN, P.; MOMBAERTS, P.; GREER, C. A. Specificity of Glomerular Targeting by Olfactory Sensory Axons. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 2469–2477, 2002.
- VASSAR, R.; CHAO, S. K.; SITCHERAN, R. *et al.* Topographic O rganization of Sensory Projection to the O lfactory Bulb. **Cell**, v. 79, 1994.
- VERHEY, K. J.; HAMMOND, J. W. Traffic control: regulation of kinesin motors. **Nature Reviews | Molecular cell Biology**, v. 10, p. 765 – 777, 2009.
- VON DANNECKER, L. E. C.; MERCADANTE, A. F.; MALNIC, BETTINA. Ric-8B, an olfactory putative GTP exchange factor, amplifies signal transduction through the olfactory-specific G-protein Galphaolf. **The Journal of neuroscience**, v. 25, n. 15, p. 3793–800, 2005.
- WANG, H.; LIN, W.; DYCK, J. A. *et al.* SRPK2: A Differentially Expressed SR Protein-specific Kinase Involved in Mediating the Interaction and Localization of Pre-mRNA Splicing Factors in Mammalian Cells. **J Cell Biol.**, v. 140, p. 737–750, 1998.
- WELTE, M. A. Microtubules Active transport by microtubule motors has a plethora. **Curr. Biol.**, v. 14, p. 525–537, 2004.
- WILSON, D. A.; NIXON, R. A. Sniffing out a function for prion proteins Hyperactive interneurons impair learning in a neurofibromatosis model. **Nature Neuroscience**, v. 12, n. 1, p. 7–9, 2009.

- WILSON, R. I.; MAINEN, Z. F. Early events in olfactory processing. **Annual review of neuroscience**, v. 29, p. 163–201, 2006.
- WOODS, R. A., GIETZ, R. D. Yeast Transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG Method. In: Wai Xiao. **Methods in Molecular Biology – Yeast protocol**. v. 313. Springer Protocols, 2005.
- XU, F.; KARNAUKHOVA, E.; VOSTAL, J. G. Human cellular prion protein interacts directly with clusterin protein. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1782, n. 11, p. 615–20, 2008.
- YANG, M.; WANG, C.; ZHU, X. *et al.* E3 ubiquitin ligase CHIP facilitates Toll-like receptor signaling by recruiting and polyubiquitinating Src and atypical PKC. **J. Exp. Med.**, v. 208, n. 10, p. 2099–2112, 2011.
- ZANUSSO, G.; FERRARI, S.; CARDONE, F. *et al.* Detection of pathologic prion protein in the olfactory epithelium in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. **The New England journal of medicine**, v. 348, n. 8, p. 711–9, 2003.
- ZHANG, XIAODONG; ZHANG, YUN. DBL-1, a TGF- β , is essential for *Caenorhabditis elegans* aversive olfactory learning. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, n. 14, p. 1–6, 2012.
- ZHANG, XINMIN; FIRESTEIN, STUART. The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. **Nature neuroscience**, v. 5, n. 2, p. 124–33, 2002.
- ZHANG, XINMIN; RODRIGUEZ, I.; MOMBAERTS, P.; FIRESTEIN, STUART. Odorant and vomeronasal receptor genes in two mouse genome assemblies. **Genomics**, v. 83, n. 5, p. 802–11, 2004.
- ZHANG, YAN; KERMAN, I. A.; LAQUE, A. *et al.* Leptin Receptor Expressing Neurons in the Dorsomedial Hypothalamus and Median Preoptic Area Regulate Sympathetic Brown Adipose Tissue Circuits. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 5, p. 1873–1884, 2011.
- ZHU, Y.; YANG, G.; AHLEMEYER, B. *et al.* Transforming Growth Factor-1 Increases Bad Phosphorylation and Protects Neurons Against Damage. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 3898–3909, 2002.