

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Estudo da regulação da expressão do gene da proteína prion celular

Ana Lucia Beirão Cabral

Tese de Doutorado

Orientadora: Dra. Vilma Regina Martins

São Paulo

26/7/2001

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

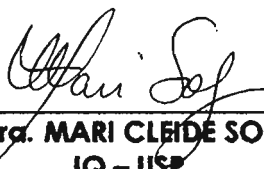
ANA LUCIA BEIRÃO CABRAL

*Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do
grau de Doutor em Ciências - Área: Bioquímica.*

Aprovada por:



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



Profa. Dra. MARI CLEIDE SOGAYAR
IQ - USP



Prof. Dr. ROBERT SCHUMACHER
IQ - USP



Prof. Dr. ROGER CHAMMAS
FM - USP



Profa. Dra. MARILIS DO VALLE MARQUES
ICB - USP

SÃO PAULO
26 DE JULHO 2001.

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

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

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

À amiga Rosi pelos comentários e sugestões.

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

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

À Dona Conceição pela amizade, carinho e pelas conversas.

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

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Índice

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

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

Abreviaturas

ABS- absorbância

AIDS - síndrome da imunodeficiência adquirida

AMPc - adenosina monofosfato cíclica

BSE - "bovine spongiform encephalopathy"

CJD - Creutzfeldt Jakob disease

DEX - Dexametasona

DMEM - "Dulbecco's modified Eagle medium"

DNA - ácido desoxiribonucléico

FFI -- "familial fatal insomnia"

GAPDH - "glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogenase"

GFAP -- "glial fibrillary acidic protein"

GPI - "glycosil phosphatidil inositol"

GR - "glucocorticoid receptor"

GSS - Gerstmann Straussler Scheinker

LN - laminina

NGF - "nerve growth factor"

PCR - "polimerase chain reaction"

PKA - "protein kinase A"

PKC - "protein kinase C"

PMSF - fenilmetilsulfonil fluoreto

PrPc - proteína prion celular

PrPsc - proteína prion infecciosa

RA - "retinoic acid"

RNA - ácido ribonucléico

RNAm - RNA mensageiro

SAF - "scrapie associated fibril"

SDS - dodecil sulfato de sódio

TPA - éster de forbol

TSA - Tricostatina A

TSE- "transmissible spongiform encephalopathy"

xg- aceleração da gravidade

Resumo

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

Summary

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

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

