

**ESTUDO FUNCIONAL DE MUTANTES DA
PROTEÍNA PRION CELULAR ASSOCIADOS
ÀS DOENÇAS POR PRION**

CLEITON FAGUNDES MACHADO

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Doutor
em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Vilma Regina Martins

São Paulo

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Machado, Cleiton Fagundes.

Estudo funcional de mutantes da proteína prion celular associados às doenças de prion / Cleiton Fagundes Machado - São Paulo, 2011.

139p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Vilma Regina Martins

Descritores: 1. PRIONS/patogenicidade. 2. DOENÇAS DE PRÍON 3. LAMININA. 4. MUTAÇÃO 5. POLIMORFISMO GENÉTICO.

*Qualquer tecnologia suficientemente
avançada é indistinguível da magia.*

Arthur C. Clarke

Dedico esse trabalho à minha esposa, Paula, por me lembrar de que o mais importante na vida não é a conquista, mas sim o caminho percorrido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Dra. Vilma Regina Martins, por realmente ensinar-me a fazer pesquisa. Seus conselhos, apoio e principalmente confiança foram essenciais para a conclusão desse trabalho.

Aos amigos e colegas. Vossas presenças me ajudaram muito nessa jornada, tanto aumentando quanto aliviando as dificuldades diárias de uma jornada profissional. De qualquer forma, em sua própria natureza, foram estímulos para a conclusão de uma etapa.

Aos Drs. Flavio Beraldo, Tiago Goss, Marilene Lopes e Dominique Bourgeon que tanto me ajudaram durante o doutorado.

À Dra. Michele Landemberger, uma amiga.

À Dra. Ana Paula Lepique, pelas discussões em torno do meu trabalho e auxílio durante todos esses anos.

A todos os funcionários da pós-graduação pelo carinho e prestatividade.

A todos os funcionários da biblioteca, que sempre me auxiliaram com muito carinho.

Ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer. A convivência já leva ao aprendizado.

À Maria Cristina Costa pela atenção e cuidados prestados durante boa parte do meu projeto.

Aos novos colegas do CIPE, que nos acolheram com tanta cordialidade.

A FAPESP pela bolsa concedida.

Ao *Howard Hughes Medical Institute* pelo suporte financeiro.

Aos meus pais pelo carinho.

Ao meu irmão, Daniel, que sempre me achou capaz.

À Paula L. Cruz, fiel companheira, amiga, minha paixão, minha maior inspiração. Sua importância é indescritível. Muito obrigado por toda a paciência, compreensão e apoio durante essa jornada. Te amo muito.

A Aquele que sempre esteve presente na minha vida.

RESUMO

Machado CF. **Estudo funcional de mutantes da proteína prion celular associados às doenças por prion**. São Paulo; 2011. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

A proteína prion celular, PrP^C, tem sido relacionada a doenças neurodegenerativas que atingem animais e o homem conhecidas como encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs), ou doenças por prions. Cerca de 15% das TSEs são genéticas e classificadas de acordo com a presença de mutações no gene codificador de PrP^C e com o fenótipo da doença. Postula-se que mutações pontuais associadas à doenças genéticas por prions promovam a conversão espontânea de PrP^C à proteína prion *scrapie* (PrP^{Sc}), sua forma infecciosa, por uma diminuição da estabilidade da forma nativa de PrP^C. A patogênese das TSE foi associada por muito tempo à toxicidade de PrP^{Sc} entretanto, dados mais recentes apontam que esta pode relacionar-se também a perda de função de PrP^C. Várias funções têm sido atribuídas a PrP^C, sua associação a diversas moléculas na superfície celular indica que esta participa como organizadora de plataformas dinâmicas para a associação de vários módulos de sinalização. Nosso grupo caracterizou a ligação entre PrP^C e laminina (Ln), proteína de matriz extracelular, e também a STI1, uma co-chaperonina, e que essas associações são responsáveis por desencadear adesão, diferenciação e sobrevivência neuronal bem como formação e consolidação de memória. O presente estudo avalia alterações funcionais nas moléculas de PrP^C com mutações associadas a TSEs. Estas mutações estão localizadas próximas ou nos sítios de interação de PrP^C com Ln (177N, 179I, 182A e 199K) e STI1 (101L, 104L, 116V). A linhagem neural derivada de camundongo *knockout* de PrP^C (CF10) serviu de modelo para a recstituição da expressão de PrP^C tipo-selvagem (CF10 PrP3F4). A re-expressão de PrP^C nas células PrP3F4 resgatou a sinalização celular ao estímulo com STI1, aumentando a atividade de proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA) e *extracellular signal-regulated kinases 1 e 2* (ERK1/2). Os resultados apontaram ainda que a internalização de PrP^C é importante para ativar a via

de ERK1/2 mas não a via de PKA. O tratamento com STI1 promove a ativação das vias de Akt, p70S6K e *eukaryotic initiation factor 4E binding protein* (4E-BP) nas células CF10 PrP^C3F4 em concordância com outros dados do grupo que mostraram que o complexo STI1-PrP^C ativa a síntese de proteínas. Vimos também que as células CF10 são mais sensíveis a tratamentos que causam estresse de retículo endoplasmático, levando a um aumento de fosforilação de *eukaryotic initiation factor 2 alfa* (eIF2 α), quando comparadas à CF10 PrP^C3F4. O peptídeo γ 1 de Ln, domínio da Ln que interage especificamente com PrP^C, promoveu um maior incremento no metabolismo celular nas células CF10 PrP^C3F4 quando comparada com células CF10. Adicionalmente, esse mesmo tratamento restituiu a sinalização por cálcio em células CF10 PrP^C3F4, sendo que essa resposta foi dependente de receptores metabotrópicos de glutamato, assim como observado em neurônios de cultura primária. Este conjunto de dados validou estas linhagens celulares como modelos neuronais de estudo da resposta celular depende de PrP^C. Assim, mutantes de PrP^C foram expressos em células CF10 para avaliação de uma possível perda de função. Nossos resultados mostraram que os mutantes 104L, 177N, 179I, 182A e 199K foram mais resistentes à degradação proteolítica quando comparados a proteína tipo-selvagem. Todos os mutantes estudados nesse projeto (101L, 104L, 116V, 177N, 1179I, 182A e 199K) apresentaram uma menor proliferação celular quando comparados com a célula CF10 PrP^C3F4 e semelhante às células CF10. O peptídeo γ 1 de Ln, que não tem atividade em células CF10, levou a um aumento na concentração de cálcio citoplasmático em todas as células que expressam os mutantes de PrP^C porém com valores significativamente menores que aqueles observados na célula CF10 PrP^C3F4. Interessantemente, a expressão dos mutantes de PrP^C não resgata o fenótipo de neuritogênese mediado pela interação PrP^C- pep. γ 1 de Ln. Estes resultados sugerem que a incapacidade dos mutantes de PrP^C de induzir neuritogênese, que está relacionada à plasticidade neuronal, poderia contribuir na à patogênese das TSEs genéticas.

SUMMARY

Machado CF. **[Functional study of mutant cellular prion protein associated with prion diseases]**. São Paulo; 2011. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

The cellular prion protein, PrP^C has been linked to neurodegenerative diseases that affect animals and humans known as transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) or prion diseases. PrP^C is abundantly expressed in central nervous system and is highly conserved among species. About 15% of TSEs are genetic and classified according to the presence of mutations in PrP^C and the disease phenotype. It is postulated that mutations associated with genetic prion diseases decrease the stability of the PrP^C and facilitate its spontaneous conversion to prion scrapie (PrP^{Sc}), its infectious isoform. The pathogenesis of TSEs has been associated to the toxicity of PrP^{Sc}, however, recent data point that it may be caused by PrP^C loss-of-function. Many functions have been attributed to PrP^C, its association to a large number of molecules at the cell surface indicates its function at the cell surface as a dynamic platform for the assembly of various signaling modules. Our group demonstrated the association between PrP^C and laminina (Ln), a protein of the extracellular matrix and also the engagement of PrP^C and STI1, a secreted co-chaperonine. These complexes trigger neuronal adhesion, differentiation and survival as well as memory formation and consolidation. The present study aims to evaluate the functional alterations associated with PrP^C mutations responsible for genetic TSEs. These mutations are localized next to or within the PrP^C binding sites for laminin (177N, 179I, 182A e 199K) and STI1 (101L, 104L, 116V). A neuronal line derived from mouse knockout of PrP^C (CF10) was used as a model to reconstitute the expression of wild-type PrP^C (CF10 PrP3F4). The PrP^C reconstitution restored the cellular signaling mediated by STI1, increasing the activity of PKA and ERK1/2. The results also indicated that internalization of PrP^C is important to activate ERK1/2 but

not PKA. The treatment with STI1, CF10 PrP3F4 cells also activated AKT, p70S6K and 4E-BP, which is in agreement with our previous data showing that PrP^C-STI1 binding increase protein synthesis. CF10 cells are more sensitive to treatments that cause endoplasmatic reticulum stress and presented an augment in eIF2 α phosphorylation when compared to CF10PrP3F4. Treatment with the Ln γ 1 peptide, the Ln binding site for PrP^C, promoted an increase in cellular metabolism dependent on the expression of PrP^C in CF10 PrP3F4 but not in CF10 cells. Additionally, this treatment restored the calcium signaling in cells CF10 PrP3F4, and this response was dependent on metabotropic glutamate receptors, as observed in neurons in primary culture. These data validated these cell lines as models to study PrP^C-dependent cellular response. Thus, PrP^C mutants were expressed in CF10 to evaluate a possible PrP^C loss-of-function. Our results show that mutants 104L, 177N, 179I, 199K and 182A were more resistant to proteolytic degradation when compared to wild-type protein. In addition, cells expressing mutants studied here showed a lower proliferation when compared with CF10 PrP3F4 cells and similar to that observed for CF10. Treatment with the Ln γ 1 peptide, which was inactive in CF10, increased the cytoplasmatic calcium concentration in cells expressing PrP^C mutants however in significant lower levels than those observed in CF10PrP3F4. Remarkable, the expression of PrP^C mutants did not rescue the neuritogenesis phenotype mediated by the engagement of PrP^C- Ln γ 1 peptide. These results indicate that the loss of neuritogenesis function in these PrP^C mutated proteins may compromise neuronal plasticity and contribute to the pathogenesis of genetic TSEs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema das diferenças entre as estruturas terciárias de PrP ^C e de PrP ^{Sc}	3
Figura 2	Modelos de conversão de PrP ^C a PrP ^{Sc} e agregação.....	4
Figura 3	Estrutura de PrP ^C determinada por ressonância magnética nuclear.....	6
Figura 4	Esquema representativo da molécula de PrP ^C e seus principais domínios de interação a diferentes ligantes.....	15
Figura 5	Modelo esquemático da sinalização celular mediada pela interação de PrP ^C -pep.γ1 de laminina.....	21
Figura 6	Modelo esquemático da sinalização mediada pela interação de PrP ^C -STI1.....	22
Figura 7	Classificação de CJD.....	29
Figura 8	Mecanismos hipotéticos da contaminação por PrP ^{Sc} por ingestão de carne contaminada.....	30
Figura 9	Principais regiões cerebrais afetadas por TSEs.....	32
Figura 10	Mutações humanas em PrP ^C associadas à TSEs.....	33
Figura 11	Esquema representativo da molécula de PrP ^C : destaque para deleções em modelos de camundongos transgênicos com neurodegeneração espontânea.....	37

Figura 12	Mapa do vetor pcDNA3+ em que PrP ^C foi clonado.....	42
Figura 13	Sequência do gene <i>Prnp</i> murino.....	45
Figura 14	Cálculo da concentração para cálcio citoplasmático livre.....	53
Figura 15	Caracterização da linhagem CF10.....	61
Figura 16	Perfil de expressão de PrP ^C em CF10 transfectada.....	63
Figura 17	<i>Western blotting</i> para PrP3F4 e N-PrP3F4 em CF10 transfectada.....	63
Figura 18	Atividade de PKA em células CF10, CF10 PrP3F4 e N-PrP3F4 tratadas com ST11.....	65
Figura 19	Atividade de ERK1/2 em células CF10, CF10 PrP3F4 e N-PrP3F4 tratadas com ST11.....	66
Figura 20	Envolvimento de PrP ^C na síntese de proteínas e na proteção contra estresse de retículo.....	68
Figura 21	Análise de resposta metabólica de células CF10 e CF10 PrP3F4 tratadas com o peptídeo γ 1 de Ln.....	70
Figura 22	Aumento da concentração de cálcio citoplasmático pelo tratamento de CF10 expressando PrP ^C tipo-selvagem com o pep. γ 1 de laminina.....	73
Figura 23	Aumento da concentração de cálcio citoplasmático mediado pelo pep. γ 1 de Ln em CF10 expressando PrP ^C mutante incapaz de ser internalizado.....	74

Figura 24	Quantificação dos ensaios de cálcio em CF10 tratadas com peptídeo γ 1 de laminina.....	74
Figura 25	Ensaio de sinalização de cálcio em células CF10 PrP3F4 e CF10 N-PrP3F4 após o tratamento com dois pulsos do peptídeo γ 1 de laminina.....	75
Figura 26	Participação dos receptores mGluR1/5 na transdução de sinal dependente de PrP ^C em CF10.....	78
Figura 27	Eletroferograma do cDNA de PrP ^C tipo-selvagem e mutantes clonados em pcDNA3.....	81
Figura 28	Perfil de expressão das diferentes construções de PrP ^C em células CF10.....	82
Figura 29	Análise da expressão das diferentes construções de PrP ^C em células CF10 por <i>western blotting</i> e imunofluorescência.....	83
Figura 30	Análise de proteólise limitada por proteinase K dos mutantes de PrP ^C	85
Figura 31	Curva de crescimento e tempo de dobramento de células CF10, CF10 PrP3F4 e CF10 expressando mutantes de PrP ^C	86
Figura 32	Avaliação dos níveis basais de cálcio em CF10 expressando os mutantes de PrP ^C	88
Figura 33	A sinalização de cálcio é prejudicada em células expressando mutantes de PrP ^C associados à TSEs.....	90
Figura 34	Número médio de células por campo com ou sem o tratamento com mitomicina C.....	92

Figura 35	Viabilidade das células CF10, CF10 PrP3F4 e CF10 PrP ^C mutantes após tratamento com mitomicina C.....	93
Figura 36	Padronização do ensaio de diferenciação em células CF10 e CF10 PrP3F4.....	95
Figura 37	Mutantes de PrP ^C responsáveis por doenças genéticas por prions são incapazes de induzir neuritogênese mediada pela interação PrP ^C -Ln.....	97
Quadro 1	Proteínas com função <i>prion-like</i> identificadas até o momento.....	8

LISTA DE ABREVIATURAS

Ala	Alanina
AMPc	Adenosina Monofosfato cíclico
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
BSA	Albumina Sérica Bovina
BSE	Encefalopatia Espongiforme Bovina
CJD	Doença de Creutzfeldt-Jakob
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindole
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
eIF	do inglês <i>eukaryotic initiation factor</i> (fator de iniciação eucariótica)
ER	retículo endoplasmático
FFI	Insônia Familiar Fatal
GFP	proteína fluorescente verde (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GPI	Glicosil-Fosfatidil-Inositol
GSS	Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker
Hsp70	Proteína de Choque Térmico de 70kDa
Hsp90	Proteína de Choque Térmico de 90kDa
iCJD	Doença de Creutzfeldt-Jakob Iatrogênica
IDT	Integrated DNA Technologies
IPTG	Isopropil-beta-D-tiogalactopranosida
Kd	Constante de dissociação no equilíbrio
kDa	kiloDalton
LB	Meio Luria-Bertani
Leu	Leucina
Ln	Laminina
MAPK	Proteína Cinase Ativada por Mitógenos
Met	Metionina
MEC	Matriz extracelular
NMR	Ressonância Magnética Nuclear
mTOR	do inglês <i>mammalian target of rapamycin</i>
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>

PBS	do inglês <i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI3K	Fosfatidil-inositol-3 cinase
PKA	Proteína cinase dependente de AMP cíclico
PKC	Proteína cinase dependente de Cálcio
PL	Poli-L-lisina
PLC	Fosfolipase C
<i>Prnp</i>	Gene que codifica para a proteína prion celular murino
<i>PRNP</i>	Gene que codifica para a proteína prion celular humana
Pro	Prolina
PrP^C	Proteína prion celular
PrP^{res}	Proteína prion resistente à proteólise limitada
PrP^{Sc}	Proteína prion <i>scrapie</i>
RNA	Ácido ribonucléico
sCJD	Doença de Creutzfeldt-Jakob Esporádica
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SFB	Soro Fetal Bovino
SOD	Superóxido dismutase
STI1	do inglês <i>Stress inducible protein 1</i>
TBS/TBST	do inglês <i>Tris Buffered Saline/ Tris Buffered Saline-Tween</i>
TE	Tampão Tris-EDTA
TSEs	Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis
THG	Tapsigargina
UV	Ultravioleta
Val	Valina
vCJD	Nova variante da doença de Creutzfeldt-Jakob
Vn	Vitronectina
WB	do inglês <i>Western-Blotting</i>
Xgal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosida

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Prion <i>scrapie</i> e a proteína prion celular	1
1.2	Funções biológicas de PrP ^C	6
1.3	Envolvimento de PrP ^C nos mecanismos de sinalização celular	16
1.3.1	PrP ^C e Proteína Quinase Dependente de Adenosina Monofosfato cíclica (cAMP/PKA)	16
1.3.2	PrP ^C e as Proteínas Quinases Ativada por Mitógenos (MAPKs).....	17
1.3.3	PrP ^C e Cálcio.....	18
1.3.4	PrP ^C e PI3K–Akt–mTOR	22
1.3.5	PrP ^C e eIF.....	24
1.4	Doenças humanas por prions.....	26
1.5	Mutações em PrP ^C	32
2	OBJETIVO	39
2.1	Objetivo geral	39
2.2	Objetivos específicos.....	39
3	MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1	Cutura celular	41
3.2	Cosntrução dos vetores de expressão eucariótica dos mutantes de PrP ^C murino.....	42
3.3	Sequenciamento.....	45
3.4	Transfecção dos plasmídeos em linhagem celular CF10	46
3.5	Seleção de células CF10 transfectadas pelo método de esferas magnéticas	47
3.6	Citometria de fluxo.....	48
3.7	Imunofluorescência	48
3.8	Citossensor.....	49
3.9	<i>Western blotting</i>	50

3.10	Ensaio de resistência a proteinase K	51
3.11	Ensaio de MTT	51
3.12	Medidas de cálcio intra-citoplasmático livre por fluorimetria.....	52
3.13	Fosforilação de ERK1/2.....	53
3.14	Atividade de PKA.....	54
3.15	Ativação da via de mTOR.....	55
3.16	Ativação de eIF.....	55
3.17	Marcação de células CF10 com indicador fluorescente de Ca ²⁺ Fluo-3 AM por microscopia confocal.....	56
3.18	Ensaio de neuritogênese.....	57
3.19	Análise estatística.....	58
4	RESULTADOS.....	59
4.1	Caracterização da linhagem CF10	59
4.2	Expressão de PrP ^C em CF10	62
4.3	Papel do tráfego celular na sinalização mediada pela interação PrP ^C - STI1.....	64
4.4	A interação PrP ^C -STI1 ativa a via de PI3K/Akt/mTOR em células CF10 PrP3F4	67
4.5	Associação de PrP ^C -pep. γ 1 de Ln aumenta o metabolismo celular em células CF10 PrP3F4	69
4.6	A interação PrP ^C -pep. γ 1 de Ln promove sinalização por cálcio mediada por receptores metabotrópicos de glutamato.....	71
4.7	Geração de linhagens de células CF10 expressando mutantes de PrP ^C relacionados a doenças genéticas por prions.....	79
4.8	Caracterização da resistência à proteinase K de mutantes de PrP ^C expresso em células CF10	84
4.9	Análise da proliferação das células CF10 expressando PrP ^C tipo- selvagem e mutantes de PrP ^C	86
4.10	Avaliação da sinalização por cálcio em células CF10 expressando mutantes de PrP ^C em resposta ao tratamento com pep. γ 1 de Ln	87

4.11	Diferenciação mediada pelo pep. γ 1 de Ln em células CF10, CF10 PrP3F4 e CF10 expressando mutantes de PrP ^C	91
5	DISCUSSÃO	98
6	CONCLUSÕES	112
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113

ANEXOS

Anexo 1 Artigo publicado na J Neurosci 2008; 28:6691-702.

Anexo 2 Artigo publicado na FASEB J 2011; 25:265-279.

1 INTRODUÇÃO

1.1 PRION SCRAPIE E A PROTEÍNA PRION CELULAR

Talvez o exemplo mais extensivamente debatido sobre alteração de conformação de proteína seja o de prion (*proteinaceous infectious particles*). Elas estão associadas a alterações do metabolismo celular, amiloidoses em leveduras e fungos e desordens neurodegenerativas fatais em mamíferos, conhecidas por encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs). O *scrapie* em ovelhas e a encefalopatia espongiforme bovina (BSE) em gado são as doenças por prions mais conhecidas em animais. No homem essas doenças agrupam o Kuru, a doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), doença de Gerstmann-Straüssler-Sheinker (GSS) e a Insônia Familiar Fatal (FFI) (PRUSINER 1998; AGUZZI e POLYMENIDOU 2004).

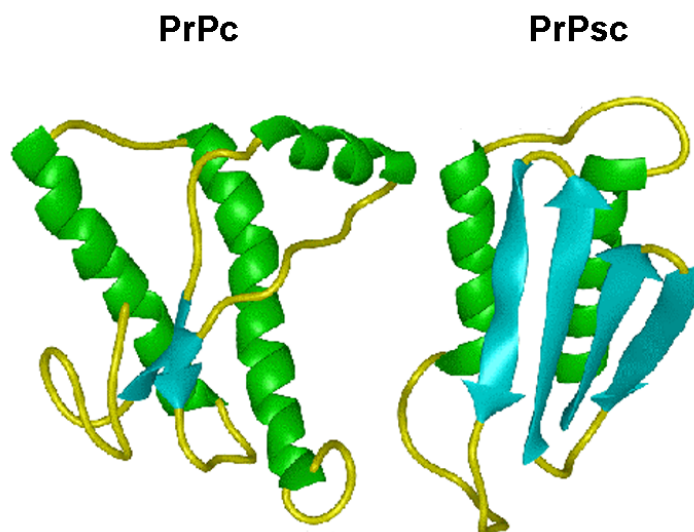
A natureza físico-química do agente causador das TSEs foi intensamente estudada. Este apresenta uma resistência incomum a agentes desnaturantes de ácidos nucleicos como formaldeído, radiações de UV e raios X, ao passo que é parcialmente sensível a agentes modificadores de proteína como proteinase K, uréia, fenol e SDS. Estas observações conduziram à hipótese de que o agente poderia ser constituído unicamente de proteína, desprovido de ácidos nucleicos.

A purificação da partícula infecciosa permitiu a produção de anticorpos que foram capazes de reconhecer uma proteína de 27-30

kiloDaltons (kDa) em extrato de cérebro de animais doentes submetidos ao tratamento com proteinase K. Curiosamente, nos extratos protéicos não submetidos à proteólise, os anticorpos reconheciam uma banda com cerca de 30-35kDa, tanto de animais infectados quanto de animais não infectados. Isto indicava que em animais sadios havia uma proteína homóloga ao agente infeccioso (OESCH et al. 1985). O sequenciamento dos aminoácidos da molécula reconhecida por este anticorpo tornou possível a síntese de oligonucleotídeos degenerados e a clonagem de um gene que codificava para este homólogo do agente infeccioso. Assim, a proteína infecciosa foi denominada proteína prion *scrapie*, ou PrP^{Sc}, e sua isoforma celular proteína prion celular ou PrP^C (BASLER et al. 1986; PRUSINER 1991).

Embora tenham a mesma sequência de aminoácidos, as proteínas PrP^C e PrP^{Sc} diferem na estrutura secundária (Figura 1), onde a isoforma normal apresenta predominantemente domínios em α -hélice e a infecciosa em folhas β -pregueadas (BASLER et al. 1986; HUANG et al. 1994).

Enquanto a proteína normal é solúvel e susceptível a digestão por proteases, a forma infecciosa é insolúvel e resistente à proteólise limitada (MEYER et al. 1986).



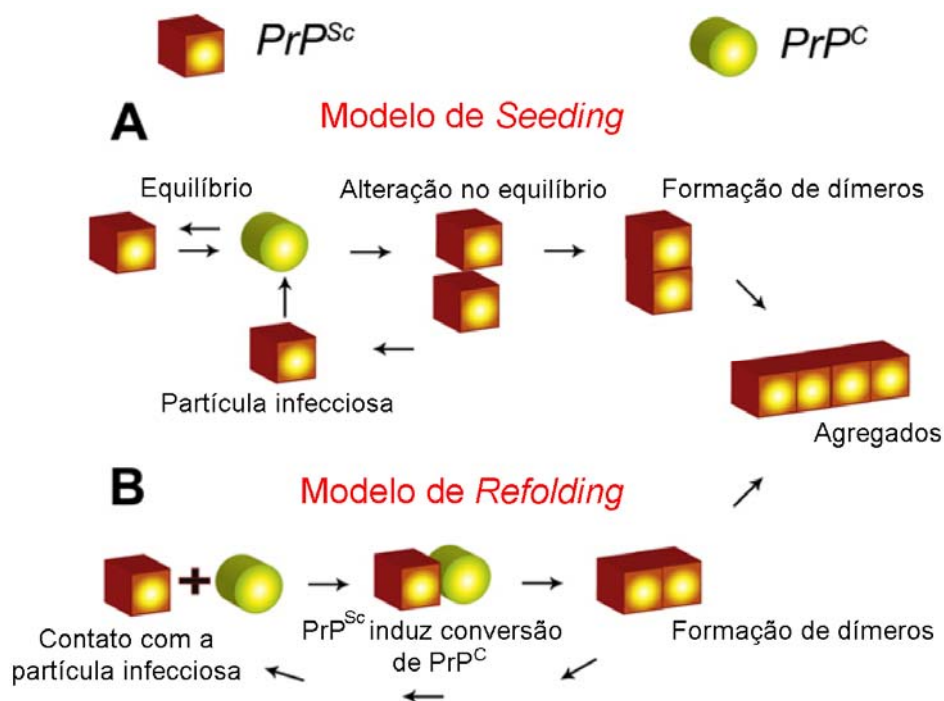
Legenda: PrP^C possui em sua estrutura três regiões em α -hélices (verde) e duas regiões em folhas β -pregueadas (azul). PrP^{Sc} apresenta uma maior quantidade de folhas β -pregueadas (azul) quando comparada a PrP^C.

Fonte: RSC Advancing the Chemical Sciences

Figura 1 - Esquema das diferenças entre as estruturas terciárias de PrP^C e de PrP^{Sc}.

Acredita-se que PrP^{Sc} se propague pela ligação a PrP^C e conversão do último em uma nova molécula de PrP^{Sc} por um processo que não está completamente compreendido (PRUSINER 1998; VENNETI 2010). Dois modelos são propostos para esse processo. No primeiro, uma alteração no equilíbrio que favorece a estrutura de PrP^C em regiões ricas em α -hélices promove a conversão de alguns domínios da molécula que adquirem estruturas β -pregueadas, característica de PrP^{Sc}. Esta última estrutura é altamente amiloidogênica e pode servir de semente para a agregação de novas moléculas. Um segundo modelo propõe que a partícula infecciosa, em contato com PrP^C, impõe uma mudança conformacional na última, que

passa por sua vez a modificar novas moléculas de PrP^C. A insolubilidade destas moléculas leva a sua agregação (Figura 2).



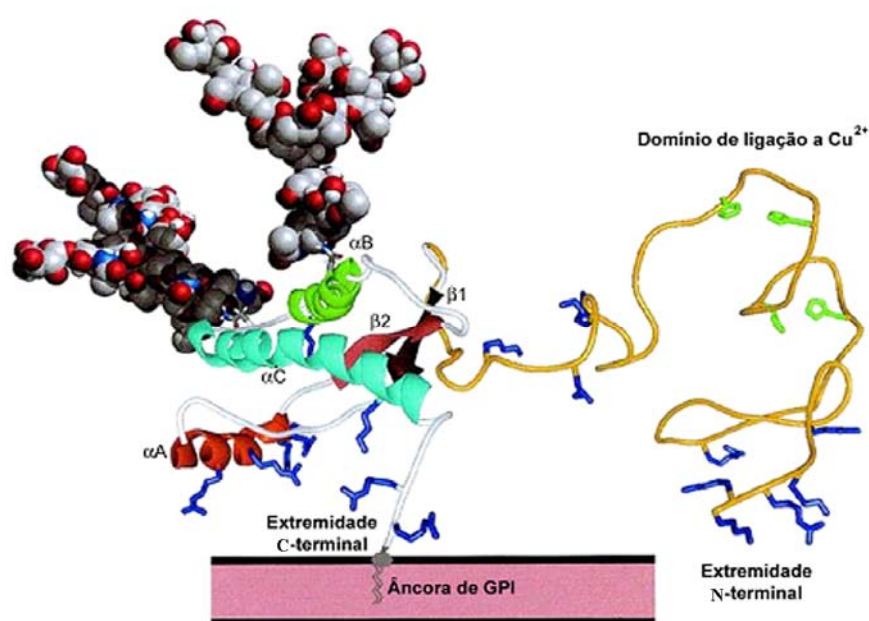
Legenda: A conversão de PrP^C (esfera) a PrP^{Sc} (cubos) é um fenômeno complexo que ainda não está totalmente esclarecido. Duas principais teorias são propostas para explicar tal fenômeno: A) a teoria do modelo de *seeding*, propondo que a conversão é um processo reversível com um equilíbrio favorecendo PrP^C em circunstâncias normais; e B) a teoria do modelo de *refolding*, propondo que, em contato com a partícula infecciosa exógena, PrP^C seria convertido a PrP^{Sc}. Assim, o PrP^{Sc} seria um molde para conversão de PrP^C endógeno para formação de agregados.

Fonte: Adaptado de VENNETI (2010).

Figura 2 - Modelos de conversão de PrP^C a PrP^{Sc} e agregação.

A principal evidência da participação de PrP^C no processo infeccioso surgiu com a construção de um camundongo transgênico, o qual teve o gene de PrP^C (*Prnp*) removido (BUELER et al. 1993). Esse animal mostrou-se completamente resistente à infecção por prions, o que pôde ser revertido quando o gene foi reintroduzido.

PrP^C é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso, encaminhada para o Golgi e transportada até a superfície celular (HARRIS 1999). No retículo endoplasmático rugoso o peptídeo sinal N-terminal (resíduos 1-22) e o segmento hidrofóbico C-terminal (resíduos 231-253) são clivados, seguindo-se a adição da âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (STAHL et al. 1987). Além disso, duas cadeias de oligossacarídeos são adicionadas nos resíduos Asn 181 e Asn 197 e uma ponte de dissulfeto é formada entre os resíduos Cys 179 e Cys 214 (CAUGHEY et al. 1989; RUDD et al. 2002). A molécula de PrP^C madura contém 207 resíduos, pode apresentar-se mono, di ou não glicosilada e ligada à face externa da membrana plasmática por uma âncora de GPI (CAUGHEY et al. 1989). A região amino-terminal da molécula não apresenta estrutura definida (*random coil*) e pode associar quatro átomos de cobre (figura 3). Durante a biosíntese e reciclagem, moléculas de PrP^C que não estão na superfície celular concentram-se no Complexo de Golgi e em endossomos de reciclagem (LEE et al. 2001; MAGALHAES et al. 2002).



Legenda: A porção N-terminal (resíduos 23-124) aparece como *random coil* (em amarelo) e a âncora de GPI em cinza. Estrutura secundária: hélice A (αA ; resíduos 144-156; vermelho), hélice B (αB ; resíduos 177-193; verde), hélice C (αC ; resíduos 200-223; azul claro), folhas- β $\beta 1$ (resíduos 128-131; vermelho) e $\beta 2$ (resíduos 160-164; vermelho escuro). Cadeias laterais de histidina envolvidas com a ligação de cobre são mostradas em verde, na região *random coil*. Resíduos de lisina e arginina representados em azul.

Fonte: Adaptado de BENNION e DAGGETT (2002).

Figura 3 - Estrutura de PrP^C determinada por ressonância magnética nuclear.

1.2 FUNÇÕES BIOLÓGICAS DE PrP^C

O fenótipo celular final é a consequência da complexa interação de fatores genéticos e ambientais que irão definir o proteoma e, assim, especificar a identidade celular. Mais do que isso, a modulação do proteoma está emergindo como um conceito-chave das características fenotípicas.

Muitos trabalhos nas duas últimas décadas destacam que modificações pós-traducionais de proteínas pode alterar sua localização

subcelular e função, conduzindo a uma regulação na sinalização celular com grande impacto na resposta final dessa via (TUIITE e SERIO 2010).

Atualmente, é sabido que proteínas utilizam mecanismos baseados em alteração conformacional para executar suas funções biológicas. Desta forma, funções distintas de uma proteína poderiam estar relacionadas a um estado de dobramento alternativo e, portanto, sem a necessidade de alterações genéticas (HALFMANN e LINDQUIST 2010; HALFMANN et al. 2010).

Até então, a transmissão de informação por propagação de proteínas mal dobradas era de domínio exclusivo da proteína prion. Isso mudou drasticamente em 1994, quando um artigo de Reed Wickner propôs que as proteínas de levedura Ure2 e Sup35 se comportam como prion (WICKNER 1994), isso é, podem assumir uma conformação alternativa e influenciar moléculas semelhantes a adotar esta conformação. Este estudo foi seguido por vários outros que identificaram várias proteínas com as mesmas características em leveduras e fungos (HALFMANN e LINDQUIST 2010, HALFMANN et al. 2010). Em levedura, prions não matam as células que os expressam mas, geralmente, produzem novos fenótipos metabólicos, por regular transcrição gênica (WICKNER et al. 2004; WICKNER et al. 2007; TUIITE e SERIO 2010). A descoberta de prions de levedura foi importante não somente para ampliar o conceito de prion para outras proteínas além de PrP^C, mas também mostrou que a atividade *prion-like* pode ser usada para processos biológicos normais (Quadro 1).

Proteína	Prion	Organismo	Função	Consequências
PrP ^C	PrP ^{Sc}	Mamíferos	Crescimento e manutenção neuronal etc.	Neurodegeneração e morte.
Ure2	[Ure3]	<i>S. cerevisiae</i> ^{*1}	Diminuição da transcrição de genes relacionados com catabolismo de nitrogênio.	Excessiva utilização de fontes de nitrogênio.
Sup35	[PSI ⁺]	<i>S. cerevisiae</i>	Tradução proteica.	Alterações nos processos de tradução proteica, mudanças na estabilidade do mRNA.
Rnq1	[PIN ⁺]	<i>S. cerevisiae</i>	Desconhecida.	Facilita o aparecimento de outros prions.
HET-s	[HET-s]	<i>P. anserina</i> ^{*2}	Regulação de incompatibilidade de heterocário.	Inibi fusão de hifas.
Swi1	[SWI ⁺]	<i>S. cerevisiae</i>	Transcrição gênica.	Modificação da utilização de fontes de carbono.
Mca1	[MCA]	<i>S. cerevisiae</i>	Regulação da apoptose e ciclo celular.	Desconhecida.
Cyc8	[OCT ⁺]	<i>S. cerevisiae</i>	Repressão da transcrição.	Floculação e modificação da utilização de fontes de carbono.
Mot3	[MOT3 ⁺]	<i>S. cerevisiae</i>	Transcrição gênica.	Alteração da composição da parede celular.
Pma1/Std1	[GAR ⁺]	<i>S. cerevisiae</i>	Bomba de prótons da membrana plasmática (Pma1) e sinalização de glicose (Std1).	Modificação da utilização de fontes de carbono.
CPEB (Candidato)	—	<i>Aplysia californica</i>	Regulação de transcrição de mRNAs específicos de sinapses.	Manutenção de memória de longo-prazo.
19 outras proteínas	—	<i>S. cerevisiae</i>	Diversas.	Indeterminada.

Legenda: Proteínas identificadas com características *prion-like*, isso é, podem assumir uma conformação alternativa e influenciar moléculas semelhantes a adotar esta conformação. A maior parte delas está associada a regulação do metabolismo de leveduras e fungos.

*1 *Saccharomyces cerevisiae* *2 *Podospora anserina*

Fonte: Adaptado de HALFMANN et al. (2010).

Quadro 1 - Proteínas com função *prion-like* identificadas até o momento.

Assim, após décadas acreditando que o ganho de atividade neurotóxica de PrP^{Sc} seria o único aspecto a contribuir para a neurodegeneração nas TSEs, muitos grupos de pesquisa passaram a buscar uma função biológica de PrP^C, admitindo a possibilidade de que as doenças por prion poderiam estar também relacionadas a sua perda de função (MARTINS et al. 2002; HETZ et al. 2003).

PrP^C é abundantemente expressa no sistema nervoso central (SNC), mas também está presente em muitos outros tecidos não neurais, incluindo linfócitos sanguíneos, células gastroepiteliais, coração, rim e músculo e é extremamente conservada entre as espécies (PRUSINER 1991; GABRIEL et al. 1992; HORIUCHI et al. 1995; FOURNIER et al. 1998; SALES et al. 2002). No tecido nervoso, mostra-se enriquecida principalmente no domínio pré-sináptico, sugerindo envolvimento na transmissão sináptica e excitabilidade neuronal (VASSALLO e HERMS 2003).

No começo da década de 1990, algumas construções de animais *knockouts* para PrP^C foram feitas na tentativa de elucidar a função dessa proteína. Alterações foram descritas em certos processos biológicos, tais como em neurotransmissão e plasticidade sináptica (COLLINGE et al. 1994; MAGLIO et al. 2004; PRESTORI et al. 2008), memória espacial (CRIADO et al. 2005), ritmo circadiano (TOBLER et al. 1996; TOBLER et al. 1997) e respostas imune (BAINBRIDGE e WALKER 2005; DE ALMEIDA et al. 2005). Além disso, esses animais depletados de PrP^C também mostraram outras alterações como alta sensibilidade a diversas condições de estresse que causam morte neuronal (WALZ et al. 1999; MCLENNAN et al. 2004; WEISE et al. 2004; SHYU et al. 2005; WEISE et al. 2006; RANGEL et al. 2007), a radicais livres (BROWN et al. 1997; BROWN et al. 1999; BROWN 2001), diminuição de Cu/Zn SOD (Cobre-Zinco Superóxido Dismutase) e catalase nas estruturas cerebrais límbicas e cortical (KLAMT et al. 2001). Foi descrito, ainda, que estes animais apresentavam maior susceptibilidade a ácido caínico e outros agentes convulsivantes (WALZ et al. 1999), bloqueio na

inibição rápida do receptor GABA (ácido γ -aminobutírico tipo A) e a diminuição na potenciação de longo prazo (LTP) no hipocampo (COLLINGE et al. 1994). Estes dados apontam para uma maior excitabilidade neuronal presente em animais deficientes para PrP^C, sugerindo o papel desta proteína no controle da atividade neuronal.

Linhagens celulares derivadas de camundongos deficientes para PrP^C parecem ser mais sensíveis a apoptose quando privadas de soro (KUWAHARA et al. 1999). Por outro lado, através da técnica de microinjeção de cDNA, a expressão aumentada de PrP^C protege as células contra a apoptose induzida por altas concentrações da proteína pró-apoptótica Bax (BOUNHAR et al. 2001).

Estudos têm demonstrado que PrP^C liga-se a íons cobre (BROWN et al. 1997; STOCKEL et al. 1998). O domínio mais importante para esta ligação foi identificado como a região N-terminal (entre os resíduos 60-91), sendo denominada de região de *octarepeat* (BROWN et al. 1997), que consiste em 5 repetições da seqüências PHGGGWGQ (HORNSHAW et al. 1995).

Algumas dezenas de proteínas têm sido descritas interagindo com PrP^C em diferentes compartimentos celulares, como *synaptic vesicle release regulator* (Sinapsina Ib), *postsynaptic density scaffolding protein* (PSD-95), proteína anti-apoptótica Bcl-2, fator de transcrição *nuclear factor E2-related factor-2* (Nrf2), chaperonina Hsp60, receptor de membrana plasmática *low-density lipoprotein receptor-related protein* (LRP1), *laminin receptor precursor protein* (LPR), *casein kinase 2* (CK2), *growth factor receptor-*

bound protein (Gbr) *amyloid precursor-like protein 1* (APLP1) dentre outras, mas, na maioria dos casos, ainda não se sabe qual a função biológica dessas interações (revisado por LINDEN et al. 2008).

PrP^C está normalmente localizado na superfície celular e trafega ao longo de vias endocíticas (PRADO et al. 2004), onde interações intracelulares podem também ser relevantes para atividade celular.

A interação de PrP^C com glicosaminoglicanas, particularmente com heparan sulfato, tem sido observada (PRIOLA e CAUGHEY 1994). Adicionalmente, estudos de ligação *in vitro* demonstraram que PrP^C interage diretamente com heparan sulfato através dos domínios 23 a 52, 53 a 93 e 110 a 128 (WARNER et al. 2002). Essa ligação parece influenciar a acumulação de PrP^{Sc} em modelos celulares e *in vitro* (CAUGHEY e RAYMOND 1993; SUPATTAPONE et al. 1999; SHAKED et al. 2001; WONG et al. 2001).

Nosso grupo caracterizou a interação PrP^C e laminina (Ln). As Lns compreendem uma família de macromoléculas multifuncionais compostas por três cadeias polipeptídicas: cadeia α (400KDa), cadeia β (200KDa) e cadeia γ (200KDa). Possui múltiplos domínios e são os principais componentes não colagênico de membranas basais. Elas regulam uma variedade de fenômenos biológicos incluindo adesão, crescimento, morfologia e migração celular (OLIVEIRA et al. 2002). Também estão envolvidas em processos relacionados ao sistema nervoso, como o crescimento de neuritos, o direcionamento do cone de crescimento e a formação de sinapses (LUCKENBILL-EDDS 1997; VENSTROM e REICHARDT 1993; LUCKENBILL-EDDS 1997).

A ligação entre PrP^C e Ln é de alta afinidade (Kd 2×10^{-8} M) e especificidade, e se dá entre um decapeptídeo da região carboxi-terminal da cadeia $\gamma 1$ de Ln (*RNIAEIIKDI*) (GRANER et al. 2000) e o domínio entre os aminoácidos 173 ao 182 de PrP^C murino (COITINHO et al. 2006). A cadeia $\gamma 1$ é a mais conservada em todos os tipos de Lns (LUCKENBILL-EDDS 1997) sugerindo que a interação PrP^C-Ln possa ser importante numa variedade de tecidos onde ambas são expressas.

Nosso grupo demonstrou que a interação PrP^C-Ln induz neuritogênese em culturas primárias de neurônios hipocâmpais (GRANER et al. 2000). Na presença da Ln, neurônios de animais onde o gene codificador de PrP^C foi removido apresentavam uma neuritogênese diminuída em relação aos animais tipo-selvagem. Além disso, quando neurônios eram plaqueados sobre o peptídeo $\gamma 1$ de Ln, apenas aqueles provenientes de animais tipo-selvagem apresentavam neuritogênese. Isto indica que este domínio da laminina é o ligante de PrP^C responsável por desencadear a neuritogênese (GRANER et al. 2000).

Dados do nosso grupo mostram que o bloqueio da interação PrP^C-Ln com anticorpos específicos prejudica a consolidação da memória de longa duração (COITINHO et al. 2006) que é um processo cognitivo altamente dependente de plasticidade neuronal (SHORS 2004).

Nosso grupo mostrou ainda a interação entre PrP^C e vitronectina (Vn). Vn é uma glicoproteína expressa em diversos tecidos e está envolvida em vários processos biológicos, tais como desenvolvimento, adesão e invasão celulares e mecanismos de defesa humoral (PREISSNER 1991). A ligação

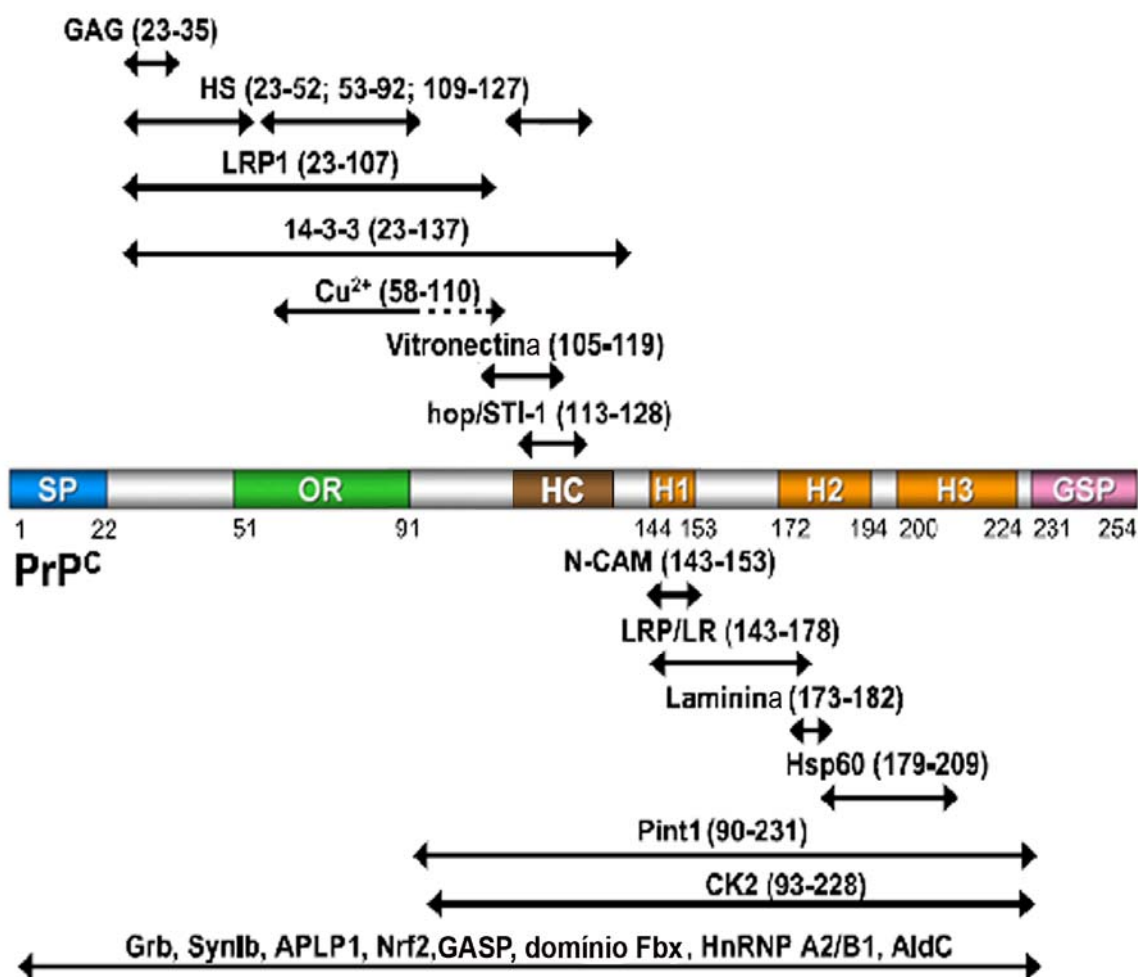
PrP^C e Vn é específica e de alta afinidade e está mapeada entre os resíduos 105 a 119 da molécula de PrP^C e nos resíduos 309-322 na molécula de Vn. Esta interação promove crescimento axonal de gânglios da raiz dorsal e diferenciação de neurônios hipocâmpais (HAJJ et al. 2007; Santos et al. em preparação).

Outra proteína ligante de PrP^C, também caracterizada pelo nosso grupo, é a proteína STI1 (*Stress Inducible protein 1*) (ZANATA et al. 2002). STI1, a proteína de camundongo, ou Hop (*Hsp70/Hsp90 Organizing Protein*) seu homólogo humano, são co-chaperoninas capazes de se associar diretamente com proteínas de choque térmico de 70 e 90 kDa (SMITH et al. 1993; SCHUMACHER et al. 1994; CHANG et al. 1997; BREDEMEYER et al. 2006). Apesar de sua alta expressão no citoplasma, a proteína STI1 é secretada por astrócitos em microvesículas, por um mecanismo ainda pouco estabelecido (LIMA et al. 2007). A ligação entre PrP^C e STI1 é altamente específica e se dá entre os aminoácidos 113 a 128 de PrP^C e entre os aminoácidos 230 a 245 de STI1 (ZANATA et al. 2002). O complexo PrP^C/STI1 induz sinais neuroprotetores inibindo morte celular programada e diferenciação neuronal (CHIARINI et al. 2002; ZANATA et al. 2002; LOPES et al. 2005).

Uma vez que muitos ligantes foram atribuídos a PrP^C, uma questão fundamental é como o sinal é transduzido através da membrana. PrP^C é uma proteína GPI ancorada que está preferencialmente localizada em domínios de membrana ricos em colesterol e esfingolipídios (*lipid rafts*) (FIVAZ et al. 2002). Esses domínios de membrana contêm moléculas que

recrutam proteínas especializadas em transdução de sinal (GORODINSKY e HARRIS 1995) e é possível que PrP^C possa modular a atividade dessas proteínas tanto por interação direta como indireta.

Algumas proteínas transmembranas com atividades neurotróficas mostraram-se moduladas por PrP^C, levando a ativação ou inibição de vias de sinalização intracelulares. Dentre elas, *neural cell adhesion molecule* (NCAM) (SANTUCCIONE et al. 2005), integrinas (HAJJ et al. 2007), receptores acoplados a proteína G (KRISTENSSON et al. 1993; WONG et al. 1996; MOUILLET-RICHARD et al. 2000; BRINI et al. 2005) e canais iônicos (WHATLEY et al. 1995; COLLING et al. 1996; AZZALIN et al. 2006; HERMS et al. 2001; KHOSRAVANI et al. 2008) (Figura 4).



Legenda: Desenho esquemático de PrP^C mostrando o peptídeo sinal N-terminal (SP) o peptídeo sinal para GPI (GPS), a porção flexível N-terminal com a sequência de *octapeptídeo* (OR) e o domínio hidrofóbico (HC). Os retângulos cor de laranja (H1, H2 and H3) representam regiões de estrutura α -hélice. A figura destaca os domínios de interação de PrP^C a diferentes ligantes.

Fonte: Adaptado de LINDEN et al. (2008).

Figura 4 - Esquema representativo da molécula de PrP^C e seus principais domínios de interação a diferentes ligantes.

1.3 ENVOLVIMENTO DE PrP^C EM VIAS DISTINTAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR

1.3.1 PrP^C e Proteína Quinase Dependente de Adenosina Monofosfato cíclica (cAMP/PKA)

A interação entre PrP^C e STI1 ativa cAMP/PKA induzindo neuroproteção em células de retina (CHIARINI et al. 2002; ZANATA et al. 2002). O uso de inibidores específicos confirmou o efeito neuroprotetor induzido pela interação de PrP^C à STI1 ou ao peptídeo STI1₂₃₀₋₂₄₅, o qual representa o domínio de interação de STI1 a PrP^C, também em neurônios hipocampais (LOPES et al. 2005).

A adenosina Monofosfato cíclica (cAMP) atua como uma molécula sinalizadora em todas as células procarióticas e eucarióticas estudadas. O aumento intracelular deste segundo mensageiro pode induzir ou inibir a proliferação em diversos tipos celulares como fibroblastos, células do músculo liso e adipócitos (VOSSLER et al. 1997). Além disso, o cAMP está envolvido em diversos processos biológicos desde a resistência bacteriana, percepção de odor, aprendizado, contração e relaxamento do músculo cardíaco e liberação de certos hormônios (ZACCOLO e POZZAN 2003). A formação desse segundo mensageiro ocorre através da ativação de um receptor acoplado a uma proteína G (estimulatória) que ativa a adenil ciclase e esta enzima converte Adenosina Trifosfato (ATP) em cAMP. Uma vez aumentado no citossol o cAMP ativa uma cascata de reações que resulta no

aumento da atividade de enzimas como a PKA o que, em última instância, pode levar a ativação de fatores de regulação gênica.

1.3.2 PrP^C e as Proteínas Quinases Ativada por Mitógenos (MAPKs)

Como demonstrado para a via de cAMP/PKA, o tratamento de retinas com peptídeos miméticos de STI1 e ligantes de PrP^C leva a ativação de MAPK (ERK 1/2) (CHIARINI et al. 2002) sendo que o mesmo fenômeno ocorre em neurônios hipocampais. Nestes, o complexo PrP^C/STI1 induz diferenciação neuronal que é bloqueada por inibidor de MAPK (ERK1/2) (LOPES et al. 2005).

Demostramos também que a ligação de PrP^C à peptídeo γ 1 de Ln fosforila ERK1/2 promovendo a neuritogênese, que também pode ser bloqueada por inibidor de MAPK (ERK1/2) (BERALDO et al. 2011).

As MAPKs são uma família de serina-treonina quinases que medeiam sinalizações intracelulares associadas com uma grande variedade de atividades celulares como proliferação, diferenciação, sobrevivência e morte celular (MCCUBREY et al. 2006; LIU et al. 2007). Dentre as enzimas que compõem essa família temos as *extracellular signal-regulated kinases* (ERKs), que incluem várias isoformas que são conhecidas como ERK1 a ERK8 (SCHAEFFER e WEBER 1999; LIU et al. 2007).

As ERKs são encontradas no citoplasma, como consequência de suas interações com vários tipos de âncoras citoplasmáticas. Uma vez fosforilada, ERKs perdem sua afinidade com esses parceiros e podem sofrer uma rápida translocação nuclear, onde acabam fosforilando múltiplas

proteínas nucleares. No núcleo, ERKs desempenham uma função essencial na regulação transcricional, replicação de DNA, remodelagem da cromatina etc (ROBINSON e COBB 1997; PAROO et al. 2009).

1.3.3 PrP^C e Cálcio

Todas as células animais (BERRIDGE 2005), células vegetais (MUNNIK et al. 1998), fungos (CALVERT e SANDERS 1995) e protozoários (PASSOS e GARCIA 1998) apresentam mecanismos de sinalização que, através de estímulos podem promover a liberação de cálcio (Ca^{2+}) de estoques intracelulares. A liberação de Ca^{2+} desses estoques aumenta sua concentração citossólica ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ci}}$), que pode regular diversos processos celulares, desde a fertilização até a morte.

A sinalização celular por Ca^{2+} é um evento importante nos processos neuronais, tais como síntese e liberação de neurotransmissores, regulação de receptores e canais iônicos, modelagem do citoesqueleto, expressão gênica e plasticidade sináptica (YAMAUCHI 2005).

As células de animais *knockout* para o gene de PrP^C (*Prnp*^{0/0}) apresentam redução do influxo de Ca^{2+} via canais voltagem dependentes em células granulares do cerebelo e neurônios hipocámpais (HERMS et al. 2000; FUHRMANN et al. 2006). Além disso, a infecção por prions, tanto de células de neuroblastoma murino como em cérebro de *hamsters*, reduz o aumento de Ca^{2+} citoplasmático que é mobilizado tanto de estoques intracelulares como pelo influxo do meio extracelular em resposta à bradicinina (KRISTENSSON et al. 1993). Em células da microglia, um

peptídeo sintético contendo os resíduos de aminoácidos 106 a 126 de PrP^C humana induz um aumento da concentração de Ca²⁺ intracelular (HERMS et al. 1997). Algumas espécies reativas de oxigênio (ROS) como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), são capazes de induzir um aumento de Ca²⁺ intracelular e este aumento é dependente da expressão de PrP^C em neurônios hipocâmpais e células granulares do cerebelo (KREBS et al. 2007).

Interessantemente, a infecção por prions modifica as respostas celulares de Ca²⁺ através da alteração da composição da membrana lipídica das células infectadas e da diminuição da formação de inositol 3-fosfato (InsP₃) com concomitante diminuição da mobilização de Ca²⁺ de estoques intracelulares (KRISTENSSON et al. 1993).

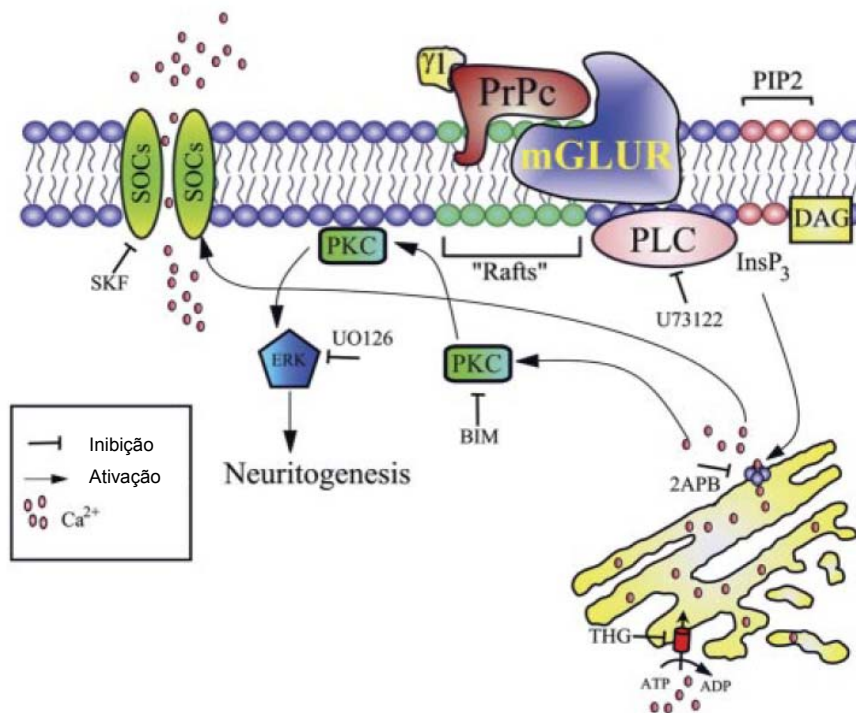
Além disso, Brini e colaboradores demonstraram a possível influência de PrP^C na homeostase de Ca²⁺ através da construção de quimeras de aequorinas direcionadas para diferentes organelas celulares. Eles observaram que em células estimuladas com ATP a presença de PrP^C aumentava a concentração de Ca²⁺ intracelular e limitava a liberação de Ca²⁺ do retículo endoplasmático e a captação do íon pela mitocôndria (BRINI et al. 2005).

Nosso grupo demonstrou que a interação de PrP^C com o peptídeo da cadeia γ 1 de laminina, que representa seu sítio específico de interação à laminina, promove um aumento na atividade da fosfolipase C, liberação de InsP₃ que se liga a receptores específicos no retículo endoplasmático promovendo mobilização de estoques intracelulares de Ca²⁺. O aumento

intracelular de Ca^{2+} pode ainda promover a entrada de Ca^{2+} extracelular através da ativação de canais na membrana do tipo SOCs – (*Store Operated Calcium Channels*) (BERALDO et al. 2011). Este aumento intracelular de Ca^{2+} é capaz de induzir a ativação de PKC e fosforilação de ERK1/2 promovendo neuritogênese. Esses dados, e o fato de PrP^C ser uma proteína GPI ancorada, indicam a possível participação de receptores acoplados à proteína G nos processos de transdução de sinal a partir da interação PrP^C/γ1. Ensaio de *Phage Display*, coimunoprecipitação e colocalização mostraram que receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR1 e mGluR5) se associam a PrP^C. A expressão destes receptores em células HEK 293 reconstituiu a sinalização mediada por PrP^C/γ1. Além disso, o uso de antagonistas desses dois receptores em culturas primárias de neurônios hipocâmpais foi capaz de bloquear o aumento de cálcio mediado pela interação PrP^C-peptídeo γ1 de laminina (BERALDO et al. 2011). Portanto, mGluR1 e mGluR5 estão envolvidos na transdução de sinais disparados pela interação PrP^C/Ln (Figura 5).

Cabe destacar que nosso grupo demonstrou recentemente que, *upstream* a ativação de PKA e ERK1/2 já identificada há alguns anos (LOPES et al. 2005), a interação de PrP^C/STI1 induz um aumento intracelular de Ca^{2+} através de ativação de canais na membrana plasmática. Estes canais foram identificados como os receptores nicotínicos de acetilcolina do tipo α7 (α7 nAChR) (BERALDO et al. 2010). Portanto, a interação de PrP^C/STI1/receptor nicotínico promoveria um aumento

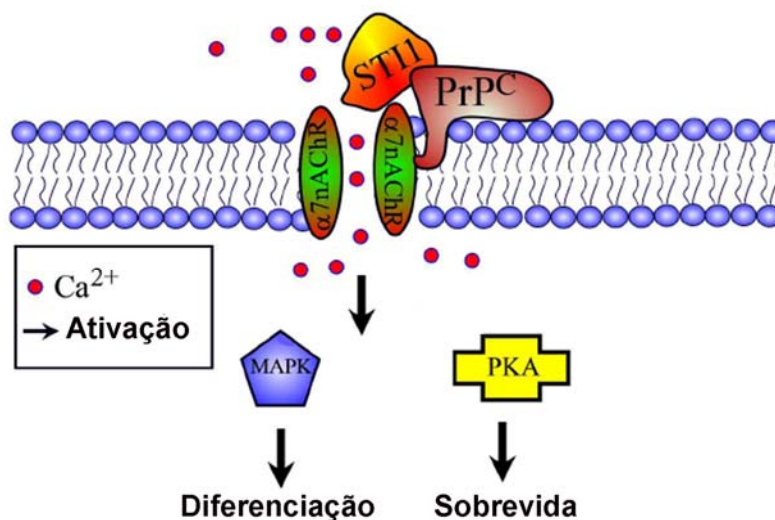
intracelular de Ca^{2+} ativando ERK e PKA induzindo neuritogênese e neuroproteção (Figura 6) (BERALDO et al. 2010).



Legenda: A interação entre PrP^C e o pep. $\gamma 1$ de laminina ativa os receptores mGluR1/5, promovendo a ativação de PLC, com geração de InsP₃ que se liga ao receptor de InsP₃ do ER. A ativação do receptor de InsP₃ resulta na liberação de cálcio do ER e promove a ativação de PKC e sua translocação da membrana, seguido pela ativação de ERK1/2, que medeia a neuritogênese. A mobilização de cálcio do ER também ativa o influxo de cálcio extracelular por SOCs.

Fonte: Adaptado de BERALDO et al. (2011).

Figura 5 - Modelo esquemático da sinalização celular mediada pela interação de PrP^C-pep.γ1 de laminina.



Legenda: A interação de PrP^C-STI1 modula α7 nAChR, conduzindo ao influxo de cálcio extracelular e ativação de PKA e ERK1/2. A ativação de PKA e ERK1/2 promovem neuroproteção e neuritogênese, respectivamente.

Fonte: Adaptado de BERALDO et al. (2010).

Figura 6 - Modelo esquemático da sinalização mediada pela interação de PrP^C-STI1.

1.3.4 PrP^C e PI3K–Akt–mTOR

A fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) e as serina/treonina quinases da família Akt estão relacionadas a diversas vias de sinalização intracelulares envolvidas no desenvolvimento, proliferação, sobrevivência e diferenciação celular (KOYASU 2003).

Alguns trabalhos demonstraram a maior ativação da via PI3K/Akt em células oriundas de animais tipo-selvagem quando comparados com aquelas oriundas de animais *knockout* para o gene de PrP^C ou em células com superexpressão de PrP^C em comparação com as células parentais (VASSALLO et al. 2005; WEISE et al. 2006). Além disso, a superexpressão de PrP^C promove proliferação através da ativação da via de PI3K/Akt e

subsequente ativação transcricional de Ciclina D1, que estaria envolvida em uma transição G1/S mais rápida em linhagens celulares oriundas de tumor gástrico (LIANG et al. 2007).

Nosso grupo mostrou recentemente que a ligação de PrP^C/STI1 aumenta a síntese de proteínas em neurônios através da ativação de PI3K/Akt/mTORC1, sendo que os fenótipos de diferenciação e proteção neuronal mediado por essa interação dependem do aumento nas taxas de tradução (ROFFE et al. 2010).

Um dos principais alvos da via PI3K/Akt é a proteína *mammalian target of rapamycin* (mTOR). mTOR é uma proteína quinase altamente conservada que compõe ao menos dois complexos multi-proteicos - mTORC1 e mTORC2. mTORC1 é um complexo de proteína quinase sensível a rapamicina, composto por mTOR e proteínas acessórias, entre elas raptor e mLST8. Em resposta a fatores de crescimento e nutrientes, mTORC1 regula o crescimento celular, controlando a síntese protéica, biogênese de ribossomos e autofagia. mTORC2 é um complexo de proteína quinase insensível a rapamicina, definido pela interação com a proteína acessória rictor (SABATINI 2006).

Entre os principais alvos de mTORC1, estão as proteínas p70S6K e eIF4E binding protein (4E-BP). A proteína 4E-BP sequestra o fator de início de tradução eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E), diminuindo a tradução dependente do cap de 7-metilguanossina (m7G-cap) presente na região 5' não traduzida (5'-UTR) dos mRNAs. Quando hiperfosforilado por mTORC1, 4E-BP libera o fator eIF4E, aumentando as taxas de tradução (RICHTER e

SONENBERG 2005). Interessantemente, muitas proteínas de controle do ciclo celular como ciclina D1 (ROSENWALD et al. 1993) e c-Myc (ZIMMER et al. 2000), além de fatores de crescimento como *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (KEVIL et al. 1996), possuem a tradução do RNA mensageiro regulada pela abundância de eIF4E. Já a quinase p70S6K fosforila a proteína S6, um importante componente da subunidade ribossomal 40S (HAY e SONENBERG 2004). Assim, o complexo mTORC1 regula de muitas maneiras o início da tradução protéica e conseqüentemente a proliferação e diferenciação celulares.

1.3.5 PrP^C e eIF

O processo de síntese proteica é um importante alvo de regulação da expressão gênica em eucariotos. O mais importante ponto de regulação desse processo é o início da tradução, envolvendo a ligação da partícula ribossomal 40S, carregando o metionil-tRNA iniciador, ao RNA mensageiro. Desta fase participam dezenas de proteínas, muitas fazendo parte de complexos multiproteicos, denominados fatores eucarióticos de início de tradução (eIF). Dentre estes, o fator eIF2 tem papel fundamental, sendo responsável pela ligação do metionil-tRNA iniciador, de forma GTP-dependente à subunidade 40S. eIF2 é alvo central de regulação de tradução global nas células eucarióticas. A fosforilação da subunidade alfa de eIF2 (eIF2 α) leva ao bloqueio da tradução. Quatro diferentes quinases têm sido relacionadas com a fosforilação de eIF2, incluindo a *general control non-derepressible-2* (GCN2), que é ativada durante a deficiência de aminoácidos,

as *double stranded RNA (dsRNA)-dependent protein kinase* (PKRs), que têm uma papel importante principalmente na resposta celular anti-viral, mas que podem também ser ativados por falta de nutrientes e outras condições de estresse celular, as *PKR-like ER (endoplasmic reticulum) kinase* (PERKs), que são ativadas por resposta a acúmulo de proteínas mal dobradas no retículo endoplasmático e as *heme-regulated inhibitor* (HRI), que limitam a síntese de proteínas em eritrócitos em condições de hemo-deficiência (HARDING et al. 2000; DEVER 2002; RON 2002; BENNETT et al. 2006; CHEN 2007; WEK e CAVENER 2007).

Interessantemente, foi observado que em células infectadas por prion, o acúmulo de PrP^C indevidamente dobrado no retículo endoplasmático gera estresse de retículo (MA e LINDQUIST 2002; KANG et al. 2006; ORSI et al. 2006), sugerindo que uma fosforilação de eIF2 possa estar ocorrendo nesta situação, o que diminuiria as taxas de síntese proteica contribuindo para os processos neurodegenerativos.

De fato, células N2a expressando uma forma truncada de PrP^C, apresentam uma resposta de estresse celular mediada por eIF2 α (GOGGIN et al. 2008). Adicionalmente, alta ativação de PKRs foi observada em pacientes com CJD (PAQUET et al. 2009), sugerindo a participação de eIF2 na neurodegeneração provocada por TSEs. Além disso, nosso grupo mostrou que tanto linhagens celulares infectadas com PrP^{Sc} ou neurônios primários expostos a extratos de cérebro infectados com prions, apresentam uma maior ativação de eIF2 α e que essas mesmas células não respondem a estímulos que aumentam a síntese de proteína, como STI1 ou insulina.

Esses dados sugerem que o prion é capaz de alterar a sinalização mediada pela ligação PrP^C-ST11 (ROFFE et al. 2010), contribuindo para os mecanismos de degeneração neuronal.

1.4 DOENÇAS HUMANAS POR PRIONS

As doenças neurodegenerativas são uma das mais devastadoras moléstias humanas, afetando os movimentos, a cognição e a memória. Esse grupo de doenças inclui a doença de Alzheimer, Parkinson (sendo as mais comuns) e outras como Huntington, ataxia espinocerebelar, esclorose amiotrófica lateral e doenças por prion.

Apesar das diferenças importantes no quadro clínico de cada uma dessas doenças, elas apresentam como características em comum o aparecimento de sintomas em idade mais avançada, grande perda neuronal, anormalidades sinápticas e a presença de depósitos de agregados proteicos. Esses depósitos são uma assinatura dessas doenças, e embora cada uma delas tenha um componente proteico diferente, os agregados têm as mesmas características morfológicas, estruturais e de marcação histológica.

Apesar de todas essas semelhanças as doenças por prion ou TSEs são únicas, se destacando das demais por serem infecciosas.

Aproximadamente 15% das doenças priônicas são hereditárias e são classificadas de acordo com a presença de mutações no gene *PRNP*,

codificador de PrP^C em humanos, e com o fenótipo da doença (KOVACS et al. 2002).

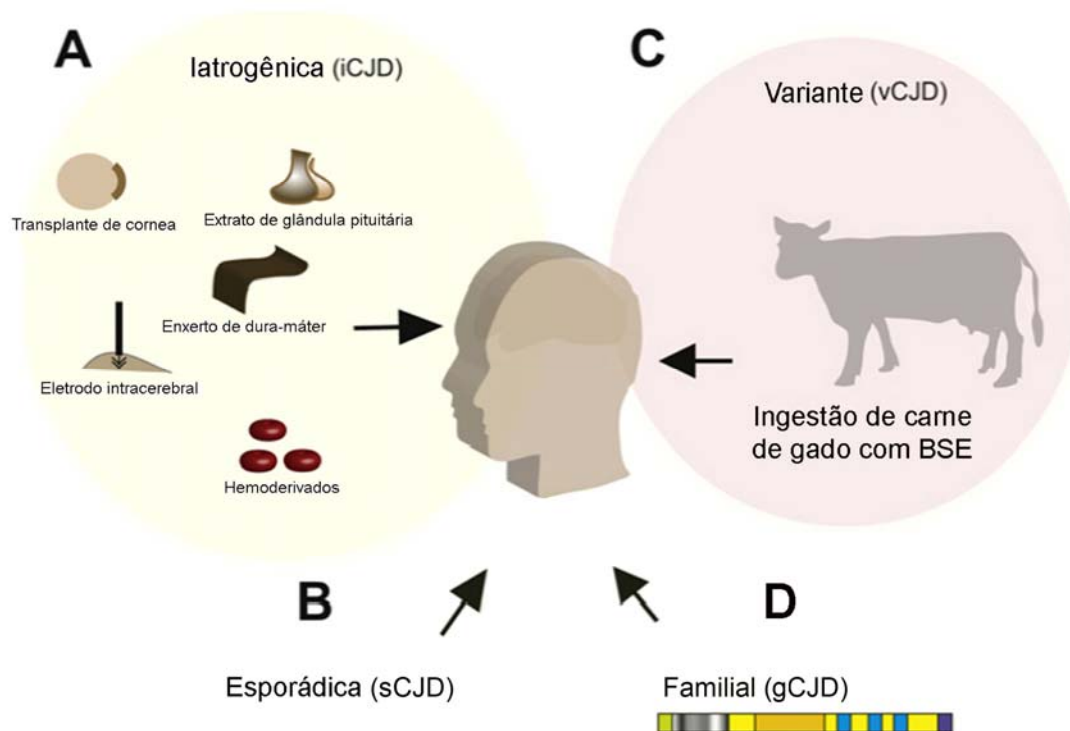
A TSE mais comum em humanos é a doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), que atinge cerca de 1 em 1,5 milhões de pessoas ao ano (LADOGANA et al. 2005).

Classicamente a CJD tem sido classificada como genética (gCJD), iatrogênica (iCJD), variante (vCJD) e esporádica (sCJD) (GLATZEL et al. 2003). A forma familiar da doença é caracterizada por hereditariedade e segregação de mutações no gene *PRNP* e com o fenótipo da doença. Os casos iatrogênicos são atribuídos a intervenções neurocirúrgicas, transplante de tecidos ou administração de hormônio de crescimento contaminado com prion (BROWN et al. 2000).

Sabe-se que a infecção após a inoculação de prions oriundos da mesma espécie que o PrP^C do animal receptor (mesma sequência de aminoácidos) é muito eficiente (CARLSON et al. 1989). Quando é baixa a similaridade entre o PrP^C do organismo receptor e a do prion do doador a eficiência de transmissão é menor, o que indica que a diferença de susceptibilidade entre espécies pode ser atribuída por fatores espécie-específicos (CARLSON et al. 1989; TELLING et al. 1994; TELLING et al. 1995; BERINGUE et al. 2008). Esse fenômeno ficou conhecido como “barreira entre espécies” (PATTISON 1965). Em 1996, uma nova forma de TSE humana emergiu no Reino Unido e foi assim chamada de nova variante (vCJD). Evidências bioquímicas e histopatológicas sugeriram que a vCJD representa a transmissão da encefalopatia espongiforme bovina (BSE) para

humanos (AGUZZI e WEISSMANN 1996; HILL et al. 1997). Até agora, foi demonstrado que essa é a única encefalopatia espongiforme animal (não primata) capaz de converter PrP^C humano na forma infecciosa. Isso parece ser devido a presença de polimorfismos apresentados pelo PrP^C de gado que acabam desenvolvendo “cepas” de prion ligeiramente distintas, das quais uma é capaz de transmitir a doença para o homem (BERINGUE et al. 2008).

Já a forma esporádica de CJD é assim denominada pois, apesar da detecção da partícula infecciosa no cérebro de humanos afetados, não é possível relacionar o desenvolvimento da doença com nenhuma das causas acima descritas (Figura 7).

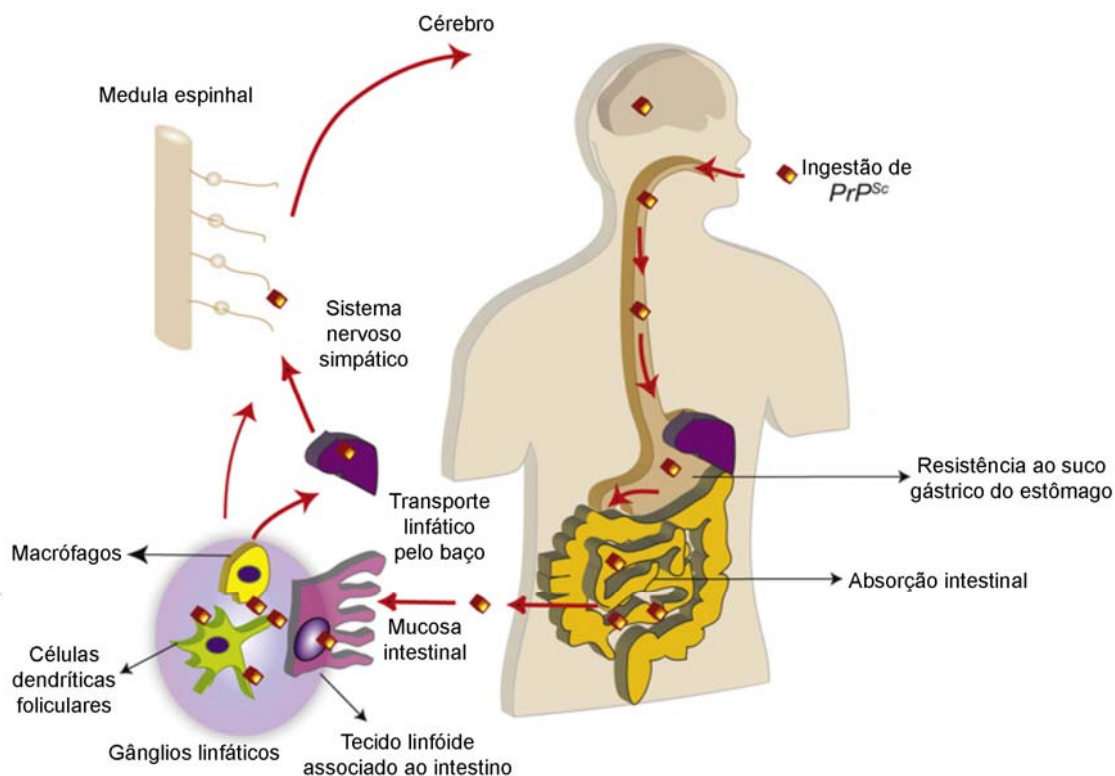


Legenda: Baseado em sua etiologia, CJD pode ser classificada dentro de quatro diferentes grupos. A forma adquirida (iCJD, 7A) e a forma variante (vCJD, 7C) são causadas por contaminação com PrP^{Sc} exógeno. O esporádico (sCJD) é definido pela exclusão das formas familiar ou adquirida (7B). A genética (gCJD) é causada por mutações herdadas no gene da proteína prion (7D).

Fonte: Adaptado de VENNETI (2010).

Figura 7 - Classificação de CJD.

Os sintomas mais comuns em CJD são desordens visuais, perda de memória e movimentos mioclônicos, sendo que nos casos de vCJD 80% dos pacientes morrem cerca de 12 meses após o aparecimento dos primeiros sintomas (RICHARDSON, Jr. e MASTERS 1995).



Legenda: O processo exato da contaminação por ingestão de PrP^{Sc} ainda é desconhecido. Estudos recentes têm sugerido que o sistema imune tem um importante papel nesse mecanismo. Depois de absorvido pelo intestino, PrP^{Sc} pode ser captado por tecido linfóide, células dendríticas e macrófagos e sistema nervoso periférico, tendo assim acesso ao sistema nervoso central.

Fonte: Adaptado de VENNETI (2010).

Figura 8 - Mecanismos hipotéticos da contaminação por PrP^{Sc} por ingestão de carne contaminada.

A síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) é uma doença autossômica dominante rara do sistema nervoso, caracterizada principalmente por anormalidades motoras e intelectuais. Apresenta sintomas como ataxia cerebelar, tremores severos, dificuldades de locomoção, distúrbios da fala, irritabilidade e redução da capacidade intelectual (BUGIANI et al. 2000). Deposição de placas amilóides de PrP^{Sc}

em determinadas regiões do cérebro de pacientes é um achado constante (KITAMOTO et al. 1993). Assim como para gCJD, foram identificadas várias mutações no gene *PRNP* associadas a GSS.

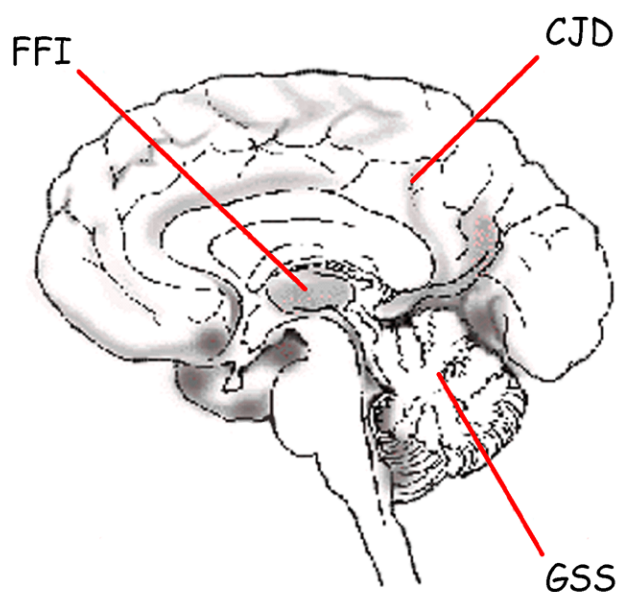
A Insônia Familiar Fatal (FFI) causa distúrbios do sono, do sistema endócrino e motor. Está associada a uma mutação no códon D178N, quando no mesmo alelo do gene *PRNP* se encontra metionina no códon 129 (GOLDFARB et al. 1992).

Um marcador para essa doença é a perda neuronal e astrogliose no tálamo, que está presente em todos os indivíduos com exames histológicos detalhados, independente da duração da doença (MANETTO et al. 1992). Mais tarde foi demonstrado que a perda neuronal na FFI é causada por apoptose (DORANDEU et al. 1998).

O diagnóstico das doenças por prion é baseado em avaliação de sintomas, sinais clínicos e vários exames auxiliares. Por um longo tempo, o eletroencefalograma foi o método de escolha para substanciar o diagnóstico, mas devido a sensibilidade deste teste ser limitada, o seu uso para esse tipo de investigação tem sido questionado (ZERR et al. 2000).

Recentemente avanços na neuroimagem, especificamente em imagem por ressonância magnética, estabeleceu padrões específicos para doenças humanas de prion (TRIBL et al. 2002). Aliado a isso, com o grande aumento do conhecimento das mutações associadas a doenças humanas de prion, o sequenciamento do gene *PRNP* habilita a exclusão/inclusão de causas genéticas para esse tipo de enfermidade (WINDL et al. 1999).

Há também testes bioquímicos para a caracterização da presença de PrP^{res} através de digestão por proteinase K (GLATZEL et al. 2005). Investigações neuropatológicas por meio de histologia em regiões definidas no SNC e imunohistoquímica também são usadas para o diagnóstico da doença, já que o padrão de áreas cerebrais afetadas pelas doenças são normalmente distintos (Figura 9) (BUDKA et al. 1995).



Legenda: Diferentes doenças por prion afetam regiões distintas no cérebro. As principais regiões afetadas por: CJD – córtex, GSS – cerebelo, FFI – tálamo.

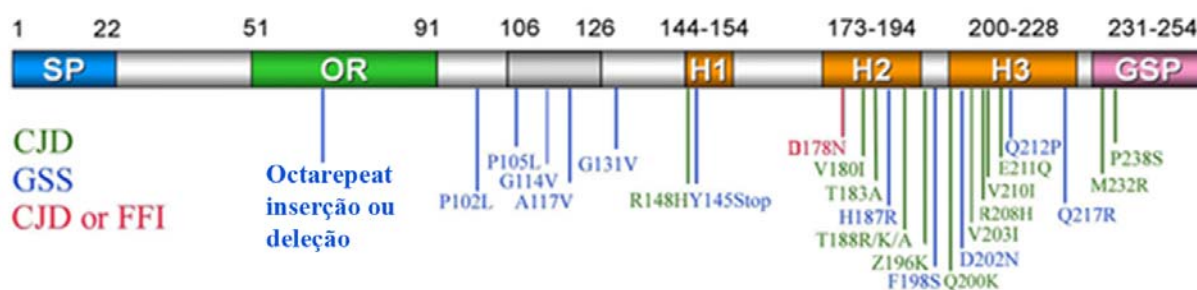
Fonte: Adaptado de SCHNEIDER (2000).

Figura 9 - Principais regiões cerebrais afetadas por TSEs.

1.5 MUTAÇÕES EM PrP^C

O gene humano que codifica para PrP^C está localizado no braço curto do cromossomo 20 (20p12.17), apresenta 3 exons, e sua fase aberta de leitura (*ORF*) está contida no terceiro éxon (GLATZEL et al. 2005).

Atualmente são conhecidas 55 mutações patogênicas e 16 polimorfismos no gene de *PRNP* (Figura 10). Isto inclui 24 mutações “missenses” (tradução da proteína com troca de aminoácidos), 27 mutações por inserção, 2 mutações por deleção, 2 mutações “nonsense” (tradução de proteína truncada), 12 polimorfismos que não resultam em modificação do aminoácido e 4 que resultam em modificação do aminoácido (PRUSINER 1997; COLLINGE 2001; GAMBETTI et al. 2003; PRUSINER 1997).



Legenda: Desenho esquemático de PrP^C mostrando o peptídeo sinal N-terminal (SP) o peptídeo sinal para GPI (GPS), a porção flexível N-terminal com a sequência de octapeptídeo (OR) e o domínio hidrofóbico (cinza escuro). Os retângulos cor de laranja (H1, H2 and H3) representam regiões de estrutura α-hélice. Mutações associadas com doenças humanas por prion genéticas são indicadas, CJD (verde), GSS (azul) and CJD/FFI (vermelho).

Fonte: Adaptado de MARTINS et al. (2010).

Figura 10 - Mutações humanas em PrP^C associadas à TSEs.

O polimorfismo no códon 129 de PrP^C é o mais frequente e pode apresentar os aminoácido metionina (M) ou valina (V). Os indivíduos com metionina (M/M) ou valina (V/V) em homozigose e heterozigotos (M/V) somam 43%, 8% e 49% respectivamente na população normal caucasiana (ZIMMERMANN et al. 1999). Esses valores mudam para 92%, 0% e 8% respectivamente na população japonesa e 97%, 0% e 3% respectivamente

na população Chinesa (DOH-URA et al. 1991; TSAI et al. 2001). O polimorfismo no códon 129 tem apresentado um interesse particular já que ele pode indicar um fator de risco para o CJD esporádico e para a nova variante (DESLYS et al. 1994). Além disso, esse polimorfismo é determinante no fenótipo das doenças hereditárias com a mutação no códon 178 (D→N). Quando esta mutação está associada com 129M ela determina o fenótipo de FFI. Se 129V estiver segregando no mesmo alelo da mutação 178N o fenótipo será gCJD (GOLDFARB et al. 1992).

Postula-se que mutações pontuais associadas a doenças genéticas por prions promovam a conversão espontânea de PrP^C para PrP^{Sc} por uma diminuição da estabilidade da forma nativa de PrP^C (COHEN et al. 1994; HUANG et al. 1994; VAN DER KAMP e DAGGETT 2009). Estudos com proteínas clássicas na formação de amilóides, como presenilina 1 e 2 (associadas a doença de Alzheimer), indicam que a via de formação desses agregados envolve um dobramento parcial. Assim, é possível que na presença de mutações, a maior parte das proteínas de PrP^C adote uma conformação intermediária facilitando a formação de agregados (BOOTH et al. 1997; KHURANA et al. 2001; CANET et al. 2002; BERTRAM e TANZI 2005).

As mutações V180I (KITAMOTO et al. 1993) e T183A (NITRINI et al. 1997) (relacionadas a gCJD) afetam as interações com resíduos vizinhos impedindo a formação de pontes de hidrogênio entre os resíduos 180 e 198 e entre 183 e 162 causando aumento na flexibilidade e instabilidade da

região hidrofóbica da proteína (VAN DER KAMP e DAGGETT 2009; VAN DER KAMP E DAGGETT 2010).

Um grande número de estudos têm usado linhagens celulares transfectadas com mutantes de PrP^C para analisar as propriedades bioquímicas e biológicas destas moléculas. Esses estudos revelaram que algumas mutações levam a molécula de PrP^C a apresentar características bioquímicas semelhantes a PrP^{Sc}, incluindo agregação e resistência a proteases. Correlacionado a essas alterações bioquímicas, alguns mutantes têm mostrado alterações na localização subcelular, incluindo retenção no retículo endoplasmático ou retrotranslocação para o citoplasma com subsequente degradação por proteossoma.

A mutação no códon D178N leva a diminuição da expressão da proteína na superfície celular e a alterações no padrão de glicosilação (PETERSEN et al. 1996). Tanto a mutação D178N como aquela no códon T183A, também associada à CJD, tornam PrP^C incapaz de bloquear a apoptose neuronal induzida por Bax (BOUNHAR et al. 2001), fenômeno esse revertido pela expressão de PrP^C tipo-selvagem. A mutação T183A também confere maior resistência a digestão de PrP^C por proteinase K além de promover a retenção da molécula do retículo endoplasmático (CAMPANA et al. 2006). Uma insolubilidade relativa, diminuição de PrP^C na superfície celular e modificações no padrão de glicosilação também são observados na presença da mutação E200K, também associada a CJD (ASHOK e HEGDE 2009).

Camundongos transgênicos expressando a mutação 177N, T182A e E199K apresentaram alterações no padrão de glicosilação e de deposição de PrP^{Sc} e na estabilidade termodinâmica de PrP^C com a mutação T182A (TELLING et al. 1996; DEARMOND et al. 1997; LIEMANN e GLOCKSHUBER 1999).

Entre as mutações encontradas em pacientes com GSS, P102L, P105L e A117V são comuns. Em modelos celulares, a mutação PrP^C P102L interfere no transporte e absorção de ferro (SINGH et al. 2009), enquanto que a mutação A117V leva a uma relativa insolubilidade, diminuição de PrP^C na superfície e modificações no padrão de glicosilação (ASHOK e HEGDE 2009).

Já camundongos transgênicos expressando PrP^C mutante P101L desenvolveram espontaneamente doença neurodegenerativa com vacuolização, astrogliose e placas amilóides (TELLING et al. 1996).

Camundongos transgênicos expressando PrP^C truncado com deleções entre os aminoácidos 94-134 (Δ 94-134), demonstraram ampla degeneração mielínica central e periférica e ataxia precoce (BAUMANN et al. 2007). Interessantemente, o fenótipo mais proeminente foi observado em animais expressando a deleção dos aminoácidos entre os códons 105-125 (Δ 105-125). Estes desenvolvem uma doença grave em duas semanas de nascimento, com diminuição do peso do corpo, imobilidade, alterações de reflexo, mioclonia e tremor, morrendo em um mês. Análises histopatológicas mostram atrofia cerebelar, perda severa de células granulares cerebelares, gliose e hipertrofia astrocítica (LI et al. 2007). Deleções entre os aminoácidos

177-200 ($\Delta 177-200$), associadas a outras deleções que apresentaram-se inócuas fenotipicamente, causaram doenças associadas à neurodegeneração e sinais associados à disordem cerebelar (MURAMOTO et al. 1997) (Figura 11).



Legenda: Desenho esquemático de PrP^C mostrando o peptídeo sinal N-terminal (SP) o peptídeo sinal para GPI (GPS), a porção flexível N-terminal com a sequência de *octapeptídeo* (OR) e o domínio hidrofóbico (cinza escuro). Os retângulos cor de laranja (H1, H2 and H3) representam regiões de estrutura α -hélice. A figura destaca as deleções em PrP^C que causam neurodegeneração espontânea quando expresso em camundongos. Δ indica o domínio deletado.

Fonte: Adaptado de MARTINS et al. (2010).

Figura 11 - Esquema representativo da molécula de PrP^C: destaque para deleções em modelos de camundongos transgênicos com neurodegeneração espontânea.

As mutações descritas acima são de particular interesse para o nosso grupo. Aquelas relacionadas à GSS estão próximas ou dentro do sítio de interação de PrP^C à ST11 (P102L, P105L, A117V) e as que causam gCJD e FFI estão localizadas no sítio de interação à laminina (D178N, V180I, T183A). Além disso, estas mutações estão inseridas em domínios cujas deleções ($\Delta 94-134$ e $\Delta 177-200$) causam neurodegeneração em

camundongos transgênicos expressando essas proteínas truncadas (MARTINS et al. 2010).

Apesar de todos os estudos na área, ainda não se conhece o mecanismo exato pelo qual as mutações em PrP^C levam à neurodegeneração. Postulamos que o comprometimento das funções normais de PrP^C pode estar associado com a neurodegeneração. Acreditamos que as moléculas de PrP^C mutadas que estão relacionadas a doenças genéticas por prions representam um modelo ideal para o estudo da perda de função de PrP^C e da patogênese da doença.

Desta forma, este estudo pretende avaliar a perda-de-função associada à interação dos PrP^C mutados com STI1 e Ln.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação dos mecanismos relacionados à possível perda de função das proteínas prion celular com mutações associadas à doenças genéticas por prions.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I- Validar linhagem neural *knockout* para PrP^C como modelo de estudo nas funções de PrP^C.
- II- Construção dos vetores de expressão dos mutantes de PrP^C murino P101L, P104L, A116V, D177N, V1179I, T182A e E199K associados ao polimorfismo metionina ou valina no códon 128.
- III- Transfecção dos vetores de expressão dos mutantes de PrP^C murino em linhagem celular *knockout* para PrP^C e seleção das populações celulares transfectadas.
- IV- Avaliação da expressão celular e das características bioquímicas dos diferentes mutantes de PrP^C.
- V- Análise da proliferação celular em cada uma das linhagens expressando os diferentes mutantes de PrP^C.

- VI- Avaliação da sinalização celular em resposta ao tratamento com peptídeo da cadeia γ 1 de laminina ou STI1 nas células expressando os diferentes mutantes de PrP^C.
- VII- Análise da diferenciação neuronal em resposta ao peptídeo da cadeia γ 1 de laminina nas células expressando os diferentes mutantes de PrP^C.

3 MATERIAL E MÉTODOS

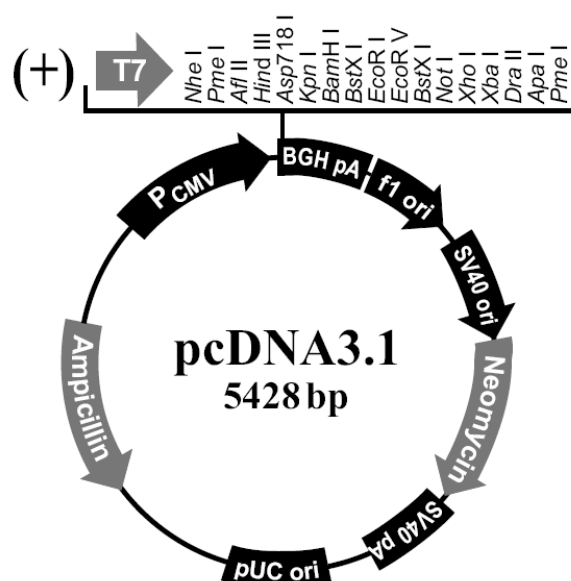
3.1 CULTURA CELULAR

CF10 é uma linhagem neuronal derivada de cérebro de embrião de camundongo deficiente para PrP^C 129/Ola Prnp^{0/0} (MANSON et al. 1994) de 15 dias de vida intra-uterina imortalizada com o plasmídeo pSV3-Neo (ATCC[®]37150) e selecionada com o uso do antibiótico G418. Essas células foram gentilmente cedidas pela Dra. Suzette Priola, do *National Institutes of Health (NIH)* em Hamilton, Estados Unidos. CF10 foi cultivada em meio OptiMEM (Invitrogen) contendo Glutamina (2mM) (Invitrogen, CA, USA), penicilina (100IU) e estreptomicina (100µg/ml) (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino e incubadas em atmosfera de 5% CO₂ à 37°C.

Para cultura primária de neurônios, células derivadas de cérebro de embrião de camundongo deficiente para PrP^C de 14 dias de vida intra-uterina (E14). Essas células foram assepticamente dissecadas em HBSS (Invitrogen) e tratadas com tripsina (0.06%) em HBSS por 20 minutos a 37°C. A tripsina foi inativada com 10% soro fetal bovino em meio Neurobasal (Invitrogen) por 5 min. Após três lavagens com HBSS, as células foram mecanicamente dissociadas em meio Neurobasal suplementados com B-27 (Invitrogen), glutamina (2 mM; Invitrogen), penicilina (100 IU) e estreptomicina (100µg/ml; Invitrogen) e incubadas em atmosfera de 5% CO₂ à 37°C.

3.2 CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO EUCARIÓTICA DOS MUTANTES DE PrP^C MURINO

O plasmídeo utilizado foi o pcDNA3+ (Invitrogen) (figura 9) fusionado a PrP^C tipo selvagem (SUNYACH et al. 2003), que foi gentilmente cedido pelo pesquisador Roger Morris (*Wolfson Centre for age-related Diseases, Guy's Hospital Campus, King's College*).



Legenda: Vetor pcDNA3.1(+), desenhado para expressão estável ou transitória em células de mamíferos. O gene de PrP^C foi clonado entre os sítios de *BamHI* e *EcoRI*.

Fonte: *Invitrogen life technologies*

Figura 12 - Mapa do vetor pcDNA3.1(+), em que PrP^C foi clonado.

PrP^C com as mutações P101L, P104L, A116V, D177N, V1179I, T182A e E199K foram construídas através da técnica de mutação pontual sítio dirigida utilizando-se o sistema *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene). Esse *Kit* faz mutações pontuais utilizando *Pfu Turbo DNA polimerase®*. A enzima *Pfu Turbo DNA polimerase®* replica as

cadeias de nucleotídeos do vetor com alta fidelidade sem remover o iniciador contendo a mutação que está anelado ao vetor.

O procedimento utiliza um vetor com o inserto de interesse e dois iniciadores, *Forward/Reverse*, contendo a mutação que se deseja obter. Os iniciadores são amplificados durante a ciclagem de temperatura pela enzima DNA polimerase do *Kit*. A incorporação dos iniciadores gera plasmídeos com a mutação contida no iniciador. Após a ciclagem por temperatura, o produto é tratado com a endonuclease *DpnI*. Esta enzima é específica para DNAs metilados e é usada para digerir o DNA parental, que é produzido em bactéria *E. coli* *dam+* e, por conseguinte, proporcionando a digestão do vetor molde.

O produto da digestão foi transformado em bactéria XL1-Blue ultracompetente fornecida pelo *Kit*. Em seguida, as bactérias foram sedimentadas através de centrifugação, ressuspensas em meio LB (1% de triptona; 0,5% de extrato de levedura; 1% de NaCl; pH 7,4) e semeadas em placas de LB-ágar (1,5% de ágar), contendo 100µg/ml ampicilina. Após 16 horas de incubação, foram coletadas algumas colônias da placa e crescidas em LB mais ampicilina, para posterior purificação de DNA plasmidial em pequena escala. Os plasmídios foram purificados através do sistema *WizardTM Mini preps DNA Purification System* (Promega) para sequenciamento. Preparações e purificações dos plasmídeos em larga escala foram realizadas usando-se o *kit WizardTM Maxi prep DNA Purification System* (Promega), estes foram novamente seqüenciados antes da transfecção celular.

O vetor com o PrP^C tipo-selvagem, pcDNA3 PrP^C 128M, o qual foi chamado de PrP3F4, devido ao *tag* para reconhecimento do anticorpo 3F4 (DAKO), foi utilizado como molde para construirmos o polimorfismo valina no códon 128 (128V). Após termos os dois vetores prontos (128M e 128V), usando-os como molde, repetimos o procedimento de mutagênese com os iniciadores contendo as mutações para os iniciadores contendo as mutações.

Os iniciadores foram sintetizados baseados na seqüência de *Prnp* murino depositada no *GenBank* sob o número NCBI MN_011170 (Figura 13) e suas seqüências estão demonstradas abaixo:

mFPrPcP101L – 5' CAG TGG AAC AAG **CTC** AGC AAA CCA AAA 3';
mRPrPcP101L – 5' TTT TGG TTT GCT **GAG** CTT GTT CCA CTG 3';
mFPrPcP104L – 5' AAG CCC AGC AAA **CTA** AAA ACC AAC CTC 3';
mRPrPcP104L – 5' GAG GTT GGT TTT **TAG** TTT GCT GGG CTT 3';
mFPrPcA116V – 5' GCA GGG GCT GCG **GTA** GCT GGG GCA GTA 3';
mRPrPcA116V – 5' TAC TGC CCC AGC **TAC** CGC AGC CCC TGC 3';
mFPrPcM128V – 5' CTT GGT GGC TAC **GTG** CTG GGG AGC GCC 3';
mRPrPcM128V – 5' GGC GCT CCC CAG **CAC** GTA GCC ACC AAG 3';
mFPrPcD177N – 5' AAC TTC GTG CAC **AAC** TGC GTC AAT ATC 3';
mRPrPcD177N – 5' GAT ATT GAC GCA **GTT** GTG CAC GAA GTT 3';
mFPrPcV179I – 5' GTG CAC GAC TGC **ATC** AAT ATC ACC ATC 3';
mRPrPcV179I – 5' GAT GGT GAT ATT **GAT** GCA GTC GTG CAC 3';
mFPrPcT182A – 5' TGC GTC AAT ATC **GCC** ATC AAG CAG CAC 3';
mRPrPcT182A – 5' GTG CTG CTT GAT **GGC** GAT ATT GAC GCA 3';
mFPrPcE199K – 5' GAG AAC TTC ACC **AAG** ACC GAT GTG AAG 3';
mRPrPcE199K – 5' CTT CAC ATC GGT **CTT** GGT GAA GTT CTC 3'.

```

1   gtcggatcag cagaccgatt ctgggcgctg cgtcgcacgc gtggcaggac tcctgagtat
61  atttcagaac tgaaccattt caaccgagct gaagcattct gccttcctag tggtagcagt
121 ccaatttagg agagccaagc agactatcag tcatcatggc gaaccttggc tacttgctgc
181 tggccctctt tgtgactatg tggactgatg tcggcctctg caaaaagcgg ccaaagcctg
241 gaggggtgaa caccggtgga agccggtatc ccgggcaggg aagccctgga ggcaaccggt
301 acccacctca ggggtggcacc tgggggcagc cccacggtgg tggctgggga caacccccatg
361 ggggcagctg gggacaacct catggtggta gttggggtca gccccatggc ggtggatggg
421 gccaaaggagg gggtagccat aatcagtgga acaagcccag caaaccaaaa accaacctca
      acct tgttcgggtc gtttggtttt tggttggag
      A      P      P
      116    101    104
481 agcatgtggc aggggctgcg gcagactggg cagtagtggg gggccttggg ggctacatgc
      ccccgacgc cgtcgacccc gtcac      cca ccgatgtacg
      M      128
541 tggggagcgc catgagcagg cccatgatcc attttgcaa cgactgggag gaccgctact
      acccctcgcg g
601 accgtgaaaa catgtaccgc taccctaacc aagtgtacta caggccagtg gatcagtaca
      D      V      T
      177    179    182
661 gcaaccagaa caacttcgtg cacgactgcg tcaatatcac catcaagcag cacacggta
      aagcac gtgctgacgc agttatagtg gtatctcgtc gtc
      E
      199
721 ccaccaccac caagggggag aacttcaccg agaccgatgt gaagatgatg gagcgcgtgg
      ttgaagtggc tctggctaca cttc
781 tggagcagat gtgcgtcacc cagtaccaga aggagtccca ggcctattac gacgggagaa
841 gatccagcag caccgtgctt ttctcctccc ctctgtcat cctcctcacc tccttcctca
901 tcttcctgat cgtgggatga gggaggcctt cctgcttggt ccttcgcatt ctgctggtct
961 aggctggggg aggggttatc cacctgtagc tctttcaatt gaggtgggtc tcattcttgc

```

Legenda: Sequência do gene *Prnp* murino obtido no NCBI com o número de acesso NM_011170, em destaque (vermelho) as regiões onde os iniciadores anelam.

Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov

Figura 13 - Sequência do gene *Prnp* murino.

3.3 SEQUENCIAMENTO

Para o sequenciamento, foi utilizado o sistema *Dynamic™ ET terminator cycle sequencing* (Amersham Pharmacia) e sequenciador

automático *ABI Prism 377 DNA Sequencer* (Perkin elmer). Os iniciadores utilizados foram *Forward* 5' – AAC CGT TAC CCA CCT CAG GGT -3' e *Reverse* 5' – GCG CTC CAT CAT CTT CAC A – 3' que flanqueiam a sequencia de PrP^C.

3.4 TRANSFEÇÃO DOS PLASMÍDEOS EM LINHAGEM CELULAR CF10

Um dia antes das transfeções, 3×10^5 células foram plaqueadas em placas de 35mm de diâmetro com cerca de 60% de confluência.

O procedimento de transfecção utilizou Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) conforme instruções do fabricante. Brevemente, utilizamos 2,5µg de lipofectamina e 1µg de plasmídeo em 300µl de meio sem soro para a incubação do complexo lipossomo-DNA. Depois de 20 minutos de incubação, a solução foi adicionada a placa onde as células foram plaqueadas, juntamente com mais 1,5ml de meio sem soro. As células foram incubadas com essa solução por 4h a 37°C e 5% CO₂ e depois lavadas com PBS e mantidas em meio com soro.

Após a transfecção, as células CF10 foram selecionadas com 2,5mg/mL Geneticina (Gibco) por pelo menos 14 dias para enriquecimento das populações que efetivamente receberam as construções.

3.5 SELEÇÃO DE CÉLULAS CF10 TRANSFECTADAS PELO MÉTODO DE ESFERAS MAGNÉTICAS

Para tornar a seleção celular mais eficiente decidimos usar também o sistema de seleção *MACS® Separators* (Miltenyi Biotec).

Brevemente, 10^7 células foram incubadas com $10\mu\text{g/ml}$ anti-PrP^C 3F4 (Abcam) em tampão recomendado pelo fabricante do *MACS® Separators* (PBS 0,5% BSA 2mM EDTA) por 30 minutos a 4°C. Em seguida, lavamos as células duas vezes no mesmo tampão e a incubamos em $20\mu\text{l}/10^7$ células *Goat anti-Mouse IgG MicroBeads* (Miltenyi Biotec) diluído em PBS 0,5% BSA 2mM EDTA (PBS/EDTA) por 30 minutos a 4°C. Após um novo processo de lavagem, as células foram transferidas para as colunas no suporte magnético. As colunas foram lavadas três vezes com tampão PBS/EDTA e removidas das colunas do suporte para eluição das células ligadas às esferas magnéticas.

Após esse procedimento, obtivemos *pool* celulares enriquecidos da população expressando PrP^C que mantinham sua expressão por, pelo menos, 10 passagens. Para certificarmos que a expressão de PrP^C não era perdida ao longo do tempo, as células foram acompanhadas de análises por citometria de fluxo semanalmente, que nos levou a congelar um grande número de alíquotas e trabalhar apenas por, no máximo, duas semanas com cada, sempre recorrendo a uma nova alíquota após esse período.

3.6 CITOMETRIA DE FLUXO

Alíquotas de 10^6 células foram incubadas com $10\mu\text{g/ml}$ anti-PrP^C 3F4 (Abcam) em PBS 0,5% BSA 0,05% Azida Sódica por 1h à 4°C. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo marcado com phycoeritrina, PE) em mesmo tampão, por 1h à 4°C. Após as lavagens, as células foram incubadas com 4% formaldeído sem metanol por 20 minutos sob agitação. Como controles, foram utilizadas células não marcadas e células marcadas apenas com anticorpo secundário.

A leitura da fluorescência foi realizada usando laser de argônio 488nm e captação de 585/42nm em aparelho *BD FACSCalibur* (Becton Dickinson) e os dados de aquisição foram analisados no programa *Cell Quest Pro* (Becton Dickinson).

3.7 IMUNOFLUORESCÊNCIA

As células CF10 ou cultura primária de neurônios foram plaqueadas em lamínulas de 12mm (10^3 células). Após 24 horas as células foram fixadas com 4% formaldeído sem metanol por 20 minutos e incubadas com PBS 5% BSA 0,2% Triton X-100 por 1h em câmara úmida para bloqueio. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com $1\mu\text{g/ml}$ anti-PrP^C 3F4, Tau, GFAP ou Nestina (todos Abcam) em PBS 0,5% BSA por 3h em câmara úmida à temperatura ambiente. As células foram novamente

lavadas e incubadas com 2 μ g/ml secundário-Alexa 546 ou Alexa 488 (Molecular Probes) juntamente com 0,1 μ g/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) em PBS 0,5% BSA por 1h em câmara úmida à temperatura ambiente. Após novo processo de lavagem as lâminas foram montadas com *Faramount Aqueous Mounting Medium* (DAKO).

3.8 CITOSSENSOR

Para medidas de variação do pH extracelular foram plaqueadas 1x10⁵ células CF10 (*knockout* de PrP^C) e CF10 transfectadas com PrP^C tipo selvagem (CF10 PrP3F4) em *Transwell Permeable Supports* (Corning) em meio OptiMEM (Invitrogen) contendo Glutamina (2mM) (Invitrogen), penicilina (100IU) e estreptomicina (100 μ g/ml) (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após as células aderirem no *transwell*, trocamos o meio para OptiMEM sem soro por 48h. As células foram mantidas em meio sem bicarbonato numa solução de DMEM com 0,09M NaCl e 4mM Glutamina, pH 7,35 para a leitura no *Cytosensor*[®] *Microphysiometer System*.

Os *traswells* contendo as células foram transferidos para uma câmara de fluxo com temperatura controlada acoplada ao equipamento. Bombas peristálticas transportam meio de cultura através da câmara. Com um fluxo constante, as células recebem nutrientes e produtos de degradação metabólica são removidos. Quando o fluxo foi interrompido, normalmente por 1 min., prótons excretados acumulam e acidificam o meio extracelular. Essa

acidificação gira em torno de 0,05 a 0,1 unidades de pH e podem ser detectadas pelo sensor do equipamento que é sensível a quantidade de prótons no meio. A bomba foi então religada, o meio foi lavado e o estado basal foi reestabelecido. Depois de padronizadas as condições basais, esse ciclo foi repetido durante todo o experimento, e as taxas metabólicas foram avaliadas pela acidificação durante o período de interrupção do fluxo do meio durante o tratamento com o reagente de interesse (PARCE et al. 1989; HAFNER 2000).

3.9 WESTERN BLOTTING

Os extratos proteicos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilameida com SDS, transferidas e imobilizadas em membrana de nitrocelulose para análise por *western blotting*. As membranas foram bloqueadas durante 1 hora com TBST (120mM NaCl, 20mM Tris e 0,05% Tween 20) contendo 5% de leite desnatado liofilizado e incubadas durante a noite com o anticorpo primário. Depois de três lavagens de dez minutos com TBST, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário em TBST por 1 hora à temperatura ambiente. A reação foi revelada utilizando os reagentes do sistema *HRP Western detection kit-Cell Signalling* e em seguida expondo filmes radiográficos (Kodak) às membranas.

3.10 ENSAIO DE RESISTÊNCIA A PROTEINASE K

Células CF10 (1×10^6 células) cultivadas em placas de 100mm foram lisadas com 1mL de tampão de lise (10mM Tris-HCl pH7,5, 10mM de NaCl, 10mM EDTA, 0,5% Triton X-100, 0,5% Deoxicolato de Sódio). Os extratos protéicos foram submetidos a concentrações crescentes de proteinase K (PK) (0,5, 1 e 4 μ g/mL) por 30 minutos a 4°C e submetidos a precipitação proteica com metanol (2,5 Volume) por 2h a -80°C. O precipitado foi ressuspenso com solução contendo 150mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 50mM EDTA acrescido de 240mM Tris, 0,8% SDS, 200 mM β -mercaptoetanol, 40% de azul de bromofenol. As amostras foram submetidas à análise de PrP^C por *western blotting*.

3.11 ENSAIO DE MTT

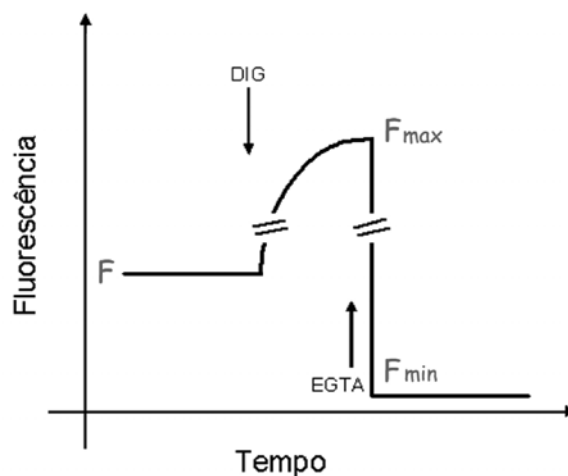
Células em fase *log* foram plaqueadas em placas de 96 poços (1×10^3 células/well) em 200 μ L de meio total. Depois de 24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h foi adicionado a cada poço 500 μ g/mL de MTT e incubado por 4h a 37°C. O sobrenadante foi removido e 100 μ L de DMSO foi adicionado aos poços para ressuspenso o precipitado formado pela redução de MTT pelas células viáveis. As placas foram lidas em leitor de ELISA em filtro de 490nm. Cada ensaio foi feito em triplicata em um total de três ensaios.

3.12 MEDIDAS DE CÁLCIO INTRA-CITOPLAMÁTICO LIVRE POR FLUORIMETRIA

As medidas de cálcio basal em células CF10 foram realizadas em espectrofluorímetro *Wallac 1420 Multilabel Counter* (Perkin Elmer) com comprimento de onda de excitação a 485nm e de emissão a 535nm. As curvas de concentração de Ca^{2+} livre no citoplasma foram obtidas com o indicador fluorescente Fluo-3AM (éster). Brevemente, as células foram incubadas com 10 μM Fluo-3AM por 40 minutos a 37°C. Após três lavagens com tampão PBS, as células foram ressuspensas em tampão Krebs (124 mM NaCl, 4 mM KCl, 25 mM HEPES, 1.2 mM MgSO_4 , 10 mM glucose) suplementado com 2mM CaCl_2 .

Após a primeira leitura, foi adicionado às células 100 μM de Digitonina (Sigma) (um detergente que lisa as células fazendo com que o Fluo-3 livre interaja com o Ca^{2+} do meio extracelular, obtendo-se assim uma leitura de fluorescência máxima que reflete a concentração total de cálcio no sistema) e em seguida 16mM de EGTA (Sigma) para uma terceira leitura (um quelante de íons que compete com Fluo-3 pela ligação com cálcio e que resultará na obtenção de uma fluorescência mínima).

O cálculo de concentração foi feito através da fórmula $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ci free}} \text{ nM} = \frac{kd \text{ Fluo-3AM a } 22^\circ\text{C pH}7,2 (F - F_{\text{min}})}{(F_{\text{max}} - F)}$ (ROCKWELL e STOREY 1999), onde *kd* é constante de dissociação de Fluo-3AM (390nM), *F* é fluorescência obtida, *F_{min}* é a fluorescência mínima obtida com EGTA e *F_{max}* é a fluorescência máxima obtida com Digitonina (Figura 14).



Legenda: Curva de calibração para utilização da fórmula para obtenção da concentração de Ca^{2+} citoplasmático livre.

Figura 14 - Cálculo da concentração para cálcio citoplasmático livre.

3.13 FOSFORILAÇÃO DE ERK1/2

As células CF10 (5×10^4 células) foram cultivadas em meio sem soro fetal bovino em placas de 35mm. Após 48 horas de incubação foram tratadas com $0,5\mu\text{M}$ STI1 por tempo determinado à temperatura de 37°C . As células foram lisadas com $25\mu\text{l}$ de tampão redutor (240mM Tris, $0,8\%$ SDS, 200mM β -mercaptoetanol, 40% de bromofenol blue). Os extratos protéicos foram sonicados, aquecidos à 100°C , e em seguida, as proteínas foram separadas através de eletroforese e submetidas à *western blotting*. Os anticorpos utilizados foram: anticorpo policlonal anti-mapk (PhosphoPlus p44/42 MAP Kinase Thr202/Tyr204 - Cell Signaling) que reconhece as formas fosforiladas de MAPK p44 e 42 (ERK 1 e ERK 2), produzido em coelho e usado na diluição 1:1000, e anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase diluído 1:2000 em TBST. Após a imunodeteção de p42/44MAPK

fosforilada, realizou-se uma lavagem com 1M NaOH por 5 minutos para remover o anticorpo primário contra p42/44MAPK fosforilada da membrana. Após esse procedimento, realizou-se o ensaio de *western blotting* utilizando o anticorpo policlonal anti-p42/44MAPK (p44/42 MAP Kinase Thr202/Tyr204 - Cell Signaling) que reconhece as formas totais de MAPK p44 e 42 (ERK 1 e ERK 2 - Cell Signaling). Os valores foram relativizados segundo a atividade basal na célula CF10 sem tratamento.

3.14 ATIVIDADE DE PKA

As células CF10 (10^5 células) foram cultivadas em meio sem soro fetal bovino em placas de 35mm. Após 48 horas de incubação, as células foram tratadas com o inibidor de fosfodiesterase IBMX (50mM) por 1 h a 37°C. O ativador de PKA forskolina (10 μ M) ou ST11 (1 μ M) foi adicionado por 20 minutos a 37°C. As células foram lavadas com PBS gelado e homogeneizadas em tampão de extração gelado (150 mM NaCl, 20mM MgCl₂, 1% Triton X-100, e 25 mM Tris-HCl, pH 7,4) com coquetel de inibidores de proteases (Roche). Após a lise os extratos foram centrifugados a 6000 xg por dez minutos onde foi separado o sobrenadante. A atividade de PKA foi determinada pela incorporação de γ -ATP a um substrato específico onde utilizamos um “Kit” de atividade de PKA (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). A reação foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante. Os valores foram relativizados segundo a atividade basal na célula CF10 sem tratamento.

3.15 ATIVAÇÃO DA VIA DE mTOR

As células CF10 (10^5 células) foram cultivadas em meio sem soro fetal bovino em placas de 35mm. Após 48 horas de incubação, as células foram tratadas com STI1 por diferentes períodos de incubação para avaliação da fosforilação de Akt, p70S6K, 4E-BP. Os extratos protéicos foram separados através de eletroforese e submetidas a *western blotting*. Os anticorpos utilizados foram: *rabbit anti-phospho-T421/S424-p70S6K*, *rabbit anti-phospho-T308-Akt*, *rabbit anti-phospho-T37/46-4E-BP*, todos da *Cell Signaling Technology*, *mouse anti-actin*, *Sigma*, e *peroxidase anti-mouse* e *anti-rabbit IgG*, *Amersham Biosciences*. A análise de densitometria das bandas foi feita com o auxílio do programa *Scion Image*. Os valores foram relativizados segundo a atividade basal na célula CF10 sem tratamento.

3.16 ATIVAÇÃO DE eIF

As células CF10 (10^5 células) foram cultivadas em meio com ou sem soro fetal bovino em placas de 35mm. Após 48 horas de incubação as células foram tratadas com 200nM de tpsigargina por 15 minutos para avaliação da fosforilação de eIF2alfa. Os extratos protéicos foram separados através de eletroforese e submetidas a *western blotting*. Os anticorpos utilizados foram: *rabbit anti-phospho-S51-eIF2 α* e *mouse anti-eIF2 α* , ambos *BioSource*, e *peroxidase anti-mouse* e *anti-rabbit IgG*, *Amersham Biosciences*). A análise de densitometria das bandas foi feito com o auxílio

do programa *Scion Image*. Os valores foram relativizados segundo a atividade basal na célula CF10 sem tratamento.

3.17 MARCAÇÃO DE CÉLULAS CF10 COM INDICADOR FLUORESCENTE DE Ca^{2+} FLUO-3 AM POR MICROSCOPIA CONFOCAL

As células CF10 (10^4 células) foram cultivadas em meio sem soro fetal bovino em placas P50G-1.5-14F (MatTek). Após 48 horas de incubação essas células foram incubadas com 10 μM do indicador fluorescente de Ca^{2+} Fluo-3 AM (Invitrogen) por 40 minutos a 37°C em meio sem soro fetal bovino. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com meio sem soro contendo 2mM CaCl_2 . Após as lavagens as células foram mantidas em Tampão Krebs (124 mM NaCl, 4 mM KCl, 25 mM Hepes, 1,2 mM MgSO_4 , 10 mM glucose contendo ou não 2mM de CaCl_2).

As variações de intensidade de fluorescência das células foram analisadas por microscopia confocal Bio-Rad Radiance 2100 acoplado a um microscópio Nikon (TE200-U) com objetiva de imersão em água (40X, 1,2 NA) com comprimentos de onda de EX-488 nm (laser de argônio) com filtro de EM-522-535 nm durante o tratamento com 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de peptídeo sintético $\gamma 1$ de laminina (RNIAEIIKDI) ou peptídeo *scrambled* de $\gamma 1$ (IRADIEIKID) ou o peptídeo GGG (RNIAEIIIGGG) (todos *Neosystem*) ou 2 μM de Tapsigargina (THG). Com as imagens adquiridas as células foram analisadas utilizando-se o programa WCIF ImageJ (*National Institute of*

Health - NIH) onde foi feita uma razão entre a fluorescência final e a fluorescência inicial ($F1/F0$).

3.18 ENSAIO DE NEURITOGÊNESE

As células CF10 (2×10^4) foram tratadas com $10\mu\text{g/mL}$ de Mitomicina C (Sigma) por 3h a 37°C e 5% de CO_2 e então plaqueadas sobre lamínulas tratadas com $5\mu\text{g/ml}$ poly-L-lysine (Sigma) em concentrações crescentes de EHS laminina (produzida e purificada em nosso laboratório seguindo o protocolo descrito em PAULSSON et al. 1987) ou peptídeo $\gamma 1$ de laminina (RNIAEIIKDI) ou ainda peptídeo $\gamma 1$ de laminina *scrambled* (SCR) (IRADIEIKID) e incubadas por 48h em CO_2 5% a 37°C . As células foram então fixadas com 4% paraformaldeído (PFA) com 0,12M sacarose em PBS por 20 minutos a temperatura ambiente, lavadas 3 vezes com PBS e marcadas com hematoxilina por 20 minutos.

A análise morfométrica foi feita através do programa *Image J* (National Institutes of Health, Bethesda, MD) com *Neuron J plug in*. Os parâmetros analisados foram: porcentagem de células com neuritos (células com neuritos de qualquer tamanho/número total de células), número de neuritos por células (número de neuritos/ número de células com neurito), comprimento médio dos neuritos (comprimento total dos neuritos/número de neuritos) e neuritos maiores que 2 corpos celulares, aqui estabelecido como $30\mu\text{m}$ (neuritos maiores que $30\mu\text{m}$ /número total de neuritos).

3.19 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram representados por média e erro padrão através da análise de variância (ANOVA) e teste de comparações múltiplas *Dunnett's post-hoc test*. Foi considerada diferença estatisticamente significativa quando foi $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA LINHAGEM CF10

CF10 é uma linhagem celular derivada de cérebro de embrião de camundongo deficiente para PrP^C de 15 dias de vida intra-uterina. Estas células foram obtidas e imortalizadas por transfecção com vetor de expressão do antígeno *large T* de SV40 no laboratório da Dra. Suzette Priola, do *National Institutes of Health (NIH)* em Hamilton, Estados Unidos. Nosso objetivo foi usá-las como modelo de neurônio *knockout* para PrP^C em nossos ensaios. Na caracterização dessa linhagem utilizamos, como parâmetro de comparação, culturas primárias de neurônios derivados de cérebro de embrião de camundongo deficiente para PrP^C de 14 dias de vida intra-uterina (E14).

A expressão de marcadores clássicos de diferenciação foi utilizada para definir CF10 como uma linhagem neural. Os marcadores foram: Tau, uma proteína associada a microtúbulos predominantemente encontrada em axônios, GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), filamento intermediário expresso somente em astrócitos, e Nestina, um marcador de células indiferenciadas.

Como observado na figura 15A, assim como neurônios primários a linhagem CF10 apresenta uma morfologia mais protoplasmática, poucos processos citoplasmáticos e expressa todos os marcadores estudados, um

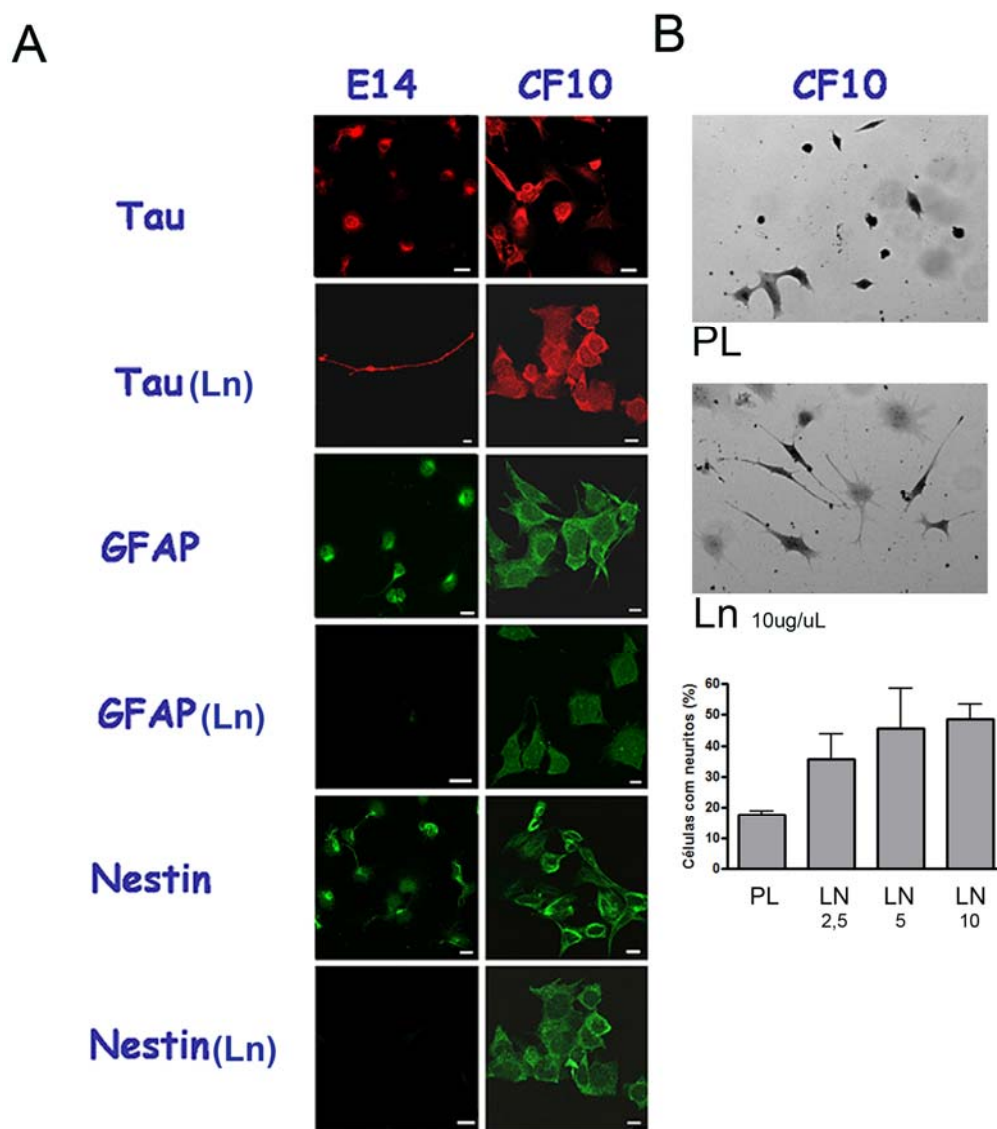
resultado que reflete uma condição aparentemente mais indiferenciada para essas células. Quando as mesmas foram plaqueadas sobre um substrato de laminina, um dos principais componentes de matriz extracelular, os neurônios de cultura primária apresentam formação de neuritos e a diminuição do corpo celular, além de marcação positiva somente para a proteína Tau, e negativa para GFAP e Nestina. Por outro lado, a linhagem CF10 manteve-se expressando os três marcadores e não apresentou alteração morfológica.

Para que esta característica fosse contornada, antes do tratamento de diferenciação, as células foram tratadas com mitomicina C, um intercalante de DNA que aumenta a quebra das fitas simples/dubla, impedindo ou atrasando a síntese de DNA (MARTINEZ et al. 2008).

Após padronização da concentração e tempo de tratamento com mitomicina C que garantisse a parada do ciclo celular e o não comprometimento na viabilidade celular, foram realizados experimentos de diferenciação, plaqueando as células tratadas sobre laminina.

O resultado é observado pela contagem de células apresentando neuritos (Figura 15B) onde, morfológicamente, a linhagem CF10 apresenta, como cultura primária tratada com Ln, maior número de neuritos e diminuição do corpo celular, um estado que consideramos mais diferenciado.

É importante destacar que mesmo sem expressar PrP^C as células CF10 respondem ao tratamento com a molécula inteira de Ln. Isso se deve a expressão de outros receptores de Ln por essas células, como as integrinas.



Legenda: Comparação da linhagem CF10 com cultura primária de neurônios provenientes de embriões de 14 dias. A) Imunofluorescência para marcadores de diferenciação neuronal, Tau, GFAP e Nestina. As células CF10 ou cultura primária E14 foram plaqueadas em lamínulas tratadas com 5 μ g/mL PL ou PL+ 10 μ g/ml Ln. A barra representa 10 μ m. B) Foto representativa dos tratamentos com PL ou PL+Ln em concentrações crescentes para análise morfológica de diferenciação neuronal (contagem de neuritos). As células CF10 foram tratadas com 10 μ g/mL Mitomicina C por 3 horas a 37°C a 5% CO₂ e plaqueadas sobre lamínulas tratadas com 5 μ g/mL PL ou PL+ 2,5, 5 ou 10 μ g/ml Ln. As células foram então fixadas com 4% PFA e marcadas com hematoxilina por 20 minutos. A análise morfométrica foi feita através da porcentagem de células com neuritos (células com neuritos/número total de células).

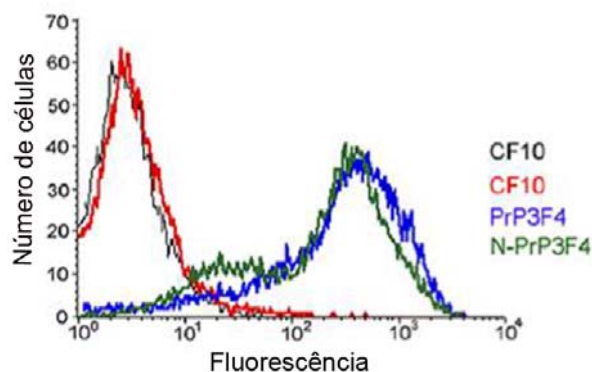
Figura 15 - Caracterização da linhagem CF10.

4.2 EXPRESSÃO DE PrP^C EM CÉLULAS CF10

Uma das abordagens importantes para este estudo foi a reconstituição da expressão de PrP^C nas células CF10. Esta célula, expressando PrP^C, permitiu a avaliação dos efeitos específicos mediados por PrP^C.

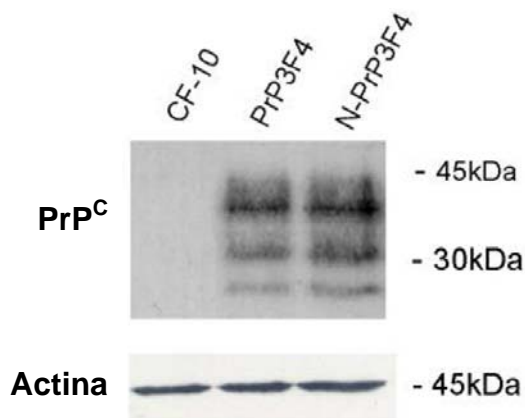
Células CF10 foram transfectadas com um vetor de expressão (pcDNA3) que codifica a proteína PrP^C murina. Esta, entretanto, apresenta troca nos aminoácidos 108 a 111, de LKHV para MKHM, que é específica da proteína humana e que leva ao reconhecimento deste epítipo pelo anticorpo monoclonal 3F4. Além disso, foi gerada ainda uma terceira linhagem de CF10 que expressava um mutante N-terminal de PrP3F4 (de ^{NH2}KKRPKP para ^{NH2}KWHPHP) que não apresenta internalização constitutiva (SUNYACH et al. 2003).

Após a transfecção e seleção, as células que expressavam PrP^C tipo-selvagem, CF10 PrP3F4, ou o mutante, CF10 N-PrP3F4, foram analisadas e selecionadas por citometria de fluxo com base na expressão de PrP^C na superfície celular (figura 16). A expressão total das proteínas (não, mono e di-glicosiladas), pode ainda ser observada por *western blotting* a partir de extratos celulares (Figura 17).



Legenda: Citometria de fluxo de células não permeabilizadas e incubadas com 10 μ g/mL anticorpo 3F4 e 1/200 anti-IgG marcado com PE mostrando o perfil de expressão de PrP^C na linhagem CF10. Em preto temos o perfil de fluorescência da célula não transfectada e em vermelho temos a CF10 marcada apenas com anticorpo secundário. Em azul e verde, células CF10 transfectadas com PrP3F4 e N-PrP3F4 respectivamente. As células CF10 transfectadas com PrP3F4 e N-PrP3F4 apresentam uma expressão similar de PrP^C na membrana.

Figura 16 - Perfil de expressão de PrP^C em CF10 transfectada.



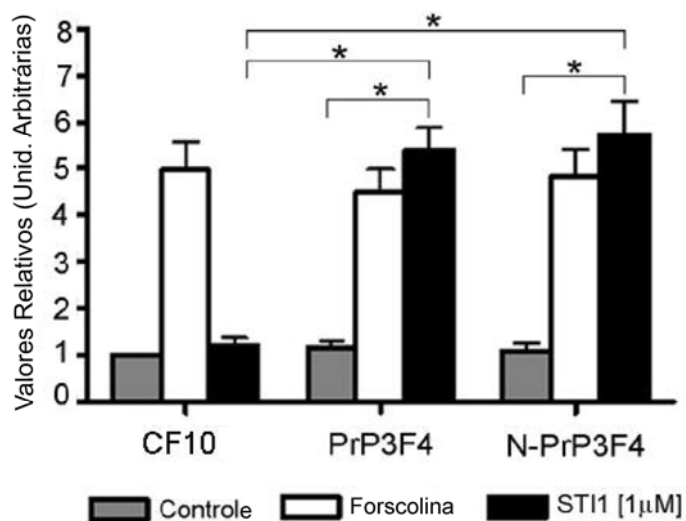
Legenda: Células CF10 e CF10 transfectadas com os vetores de PrP^C (PrP3F4) e PrP^C deficiente do sítio de internalização (N-PrP3F4). O ensaio de *western blotting* foi realizado com 11ng/mL anticorpo monoclonal anti-PrP^C 3F4 e mostra expressão similar das proteínas exógenas e padrão de glicosilação.

Figura 17 - *Western blotting* para PrP3F4 e N-PrP3F4 em CF10 transfectada.

4.3 PAPEL DO TRÁFEGO CELULAR NA SINALIZAÇÃO MEDIADA PELA INTERAÇÃO PrP^C – STI1

As células CF10, CF10 PrP3F4 e CF10 N-PrP3F4 foram usadas inicialmente num artigo que estudou a importância do tráfego intracelular de PrP^C na sinalização mediada por sua interação com STI1. A proteína STI1 liga-se com alta afinidade à PrP^C induzindo sinais neuroprotetores via PKA, e promovendo diferenciação dependente da sinalização de ERK1/2 em culturas primárias de neurônios hipocâmpais (ZANATA et al. 2002; LOPES et al. 2005).

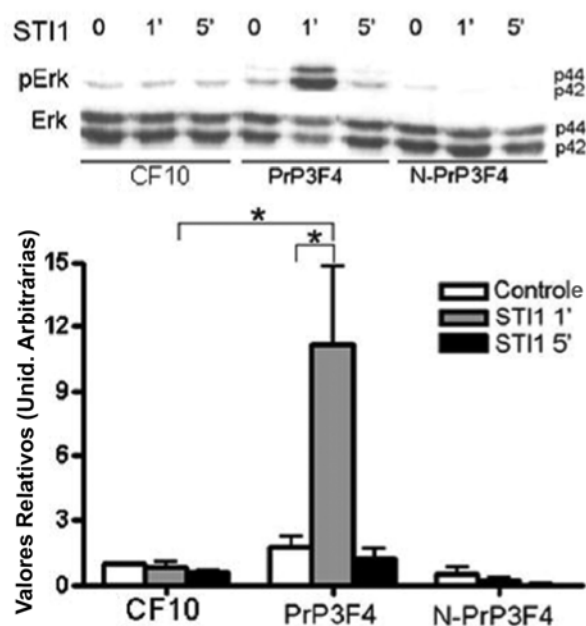
Para avaliar a respostas das células frente ao tratamento com STI1 avaliamos primeiramente a ativação de PKA. A figura 18 mostra, como esperado, que as células CF10 que não expressam PrP^C não apresentam resposta ao tratamento com STI1. Porém, estas células apresentam atividade normal de PKA uma vez que esta pode ser ativada por forskolina, um ativador clássico desta via. Por outro lado, células CF10 PrP3F4 e CF10 N-PrP3F4 apresentaram aumentos semelhantes na atividade de PKA após tratamento com STI1. Estes dados indicam que STI1 ativa especificamente a via de PKA por ligação a PrP^C e que ativação de PKA não depende de internalização de PrP^C.



Legenda: As células CF10, CF10 PrP3F4 e CF10 N-PrP3F4 foram tratadas com 10µM forskolina ou 1µM ST11 por 20min. a 37°C 5% CO₂ e a atividade de PKA foi determinada pela incorporação de γ -ATP a um substrato específico. As células CF10 não ativam PKA quando tratadas com ST11. Entretanto, as células expressando PrP3F4 e N-PrP3F4 resgataram a ativação de PKA por ST11. Esse resultado sugere que a ativação de PKA induzida pela ligação de PrP^C-ST11 não depende de internalização de PrP^C.

Figura 18 - Atividade de PKA em células CF10, CF10 PrP3F4 e CF10 N-PrP3F4 tratadas com ST11.

A ativação de ERK1/2 pelo complexo PrP^C-ST11 também foi avaliada nestas células. Os resultados apontam que a ativação de ERK1/2 foi restrita à célula expressando a proteína tipo-selvagem (Figura 19), indicando que a internalização de PrP^C é crítica para a ativação de ERK1/2.



Legenda: Células CF10, PrP3F4 e N-PrP3F4 foram tratadas com 0,5 μ M STI1 por um ou cinco minutos a 37°C 5% CO₂ e a fosforilação de ERK1/2 foi analisada por *western blotting* e densitometria utilizando *Scion Image software*. Os valores foram relativizados segundo a atividade basal de ERK1/2 na célula CF10 sem tratamento. As células CF10 e CF10 N-PrP3F4 não ativam ERK1/2 quando tratadas com STI1. Entretanto, a célula expressando PrP3F4 resgatou a ativação de ERK1/2 por STI1. Esse resultado sugere que a ativação de ERK1/2 induzido pela ligação de PrP^C-STI1 depende de internalização de PrP^C.

Figura 19 - Atividade de ERK1/2 em células CF10, CF10 PrP3F4 e CF10 N-PrP3F4 tratadas com STI1.

Estes resultados foram associados a outros realizados por outros componentes do grupo e pela aluna Fabiana Caetano e compuseram o artigo CAETANO et al. 2008, publicado no periódico *J. Neuroscience: Endocytosis of Prion Protein is required for ERK 1/2 signaling induced by stress-inducibile protein 1* (Anexo 1).

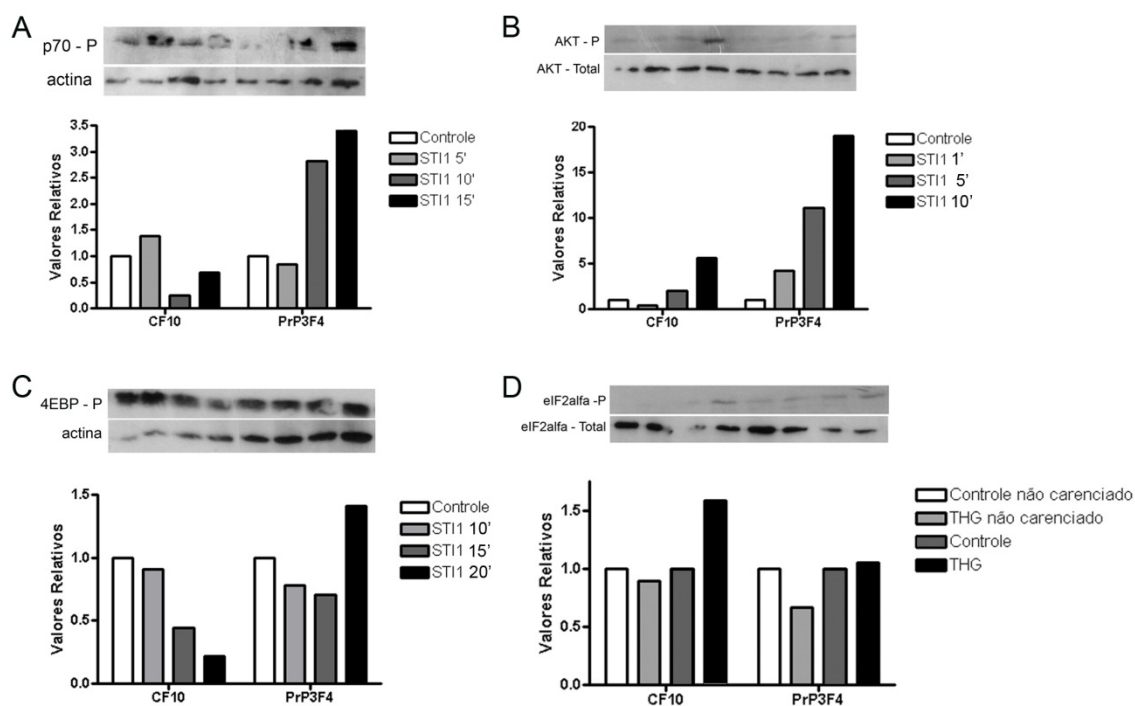
4.4 A INTERAÇÃO PrP^C – STI1 ATIVA A VIA DE PI3K / AKT / mTOR EM CÉLULAS CF10 PrP3F4

Nosso grupo demonstrou que a ligação de PrP^C-STI1 aumenta a síntese de proteínas em neurônios através da ativação de PI3K/Akt/mTOR, sendo que os fenótipos de diferenciação e proteção neuronal mediada por essa interação dependem do aumento nas taxas de tradução (ROFFE et al. 2010). Esse mesmo trabalho mostrou, ainda, que linhagens celulares infectadas com PrP^{Sc} ou neurônios primários expostos a extratos de cérebro infectados com PrP^{Sc} apresentam uma maior ativação de eIF2 α , responsável pelo bloqueio da tradução, e que essas mesmas células não respondem a estímulos de síntese de proteína, como pelo tratamento com STI1 ou insulina.

Na tentativa de avaliar se as células CF10 e CF10 PrP3F4 podem mimetizar esses resultados de culturas de neurônios primários também para essas vias, foram realizados experimentos para quantificar sua capacidade de promover a fosforilação de Akt, p70S6K e 4E-BP após o tratamento com STI1. Resultados preliminares apontam que, como esperado, as células CF10 que não expressam PrP^C não respondem ao tratamento com STI1 (Figura 20 A-C). Entretanto, a reconstituição da expressão de PrP^C nas células CF10 PrP3F4 as torna capazes de ativar as vias de AKt (Figura 20A), p70S6K (Figura 20B) e 4E-BP (Figura 20C).

Sabe-se que o estresse de retículo endoplasmático (RE) ativa uma família de enzimas conhecida por *PKR-like endoplasmic reticulum kinase*

(PERKs), que por sua vez ativam eIF2 α , diminuindo ou parando a síntese de proteínas na células. Assim, verificamos a resposta das linhagens CF10 e CF10 PrP3F4 à fosforilação de eIF2 α mediante ao estresse de RE provocado pelo tratamento com tapsigargina. Os resultados preliminares apontam que há fosforilação de eIF2 α em células CF10, mas não em CF10 PrP3F4 (figura 20D). Isso sugere que a presença de PrP^C protege as células contra o estresse de retículo e, por conseguinte, da parada da síntese de proteínas causada por ativação dessa via.



Legenda: CF10 e CF10 PrP3F4 foram carenciadas e tratadas com 170nM de STI1 em diferentes tempos para os ensaios ativação de (A) p70S6K, (B) Akt e (C) 4E-BP. (D) Células não carenciadas e carenciadas foram tratadas com 200nM de THG para avaliação de ativação de eIF2 α , indicador de estresse de RE. A interação de PrP^C-STI1 induz ativação de Akt, p70S6K, 4E-BP em células CF10 PrP3F4 enquanto o estresse de retículo ativa eIF2 α apenas em CF10.

Figura 20 - Envolvimento de PrP^C na síntese de proteínas e na proteção contra estresse de retículo.

Esses resultados, associado aos demais achados do grupo, confirmam a idéia do papel de PrP^C, e sua interação com STI1, na manutenção da homeostase celular.

4.5 ASSOCIAÇÃO DE PrP^C – PEPTÍDEO γ 1 DE LAMININA AUMENTA O METABOLISMO CELULAR EM CÉLULAS CF10 PrP3F4

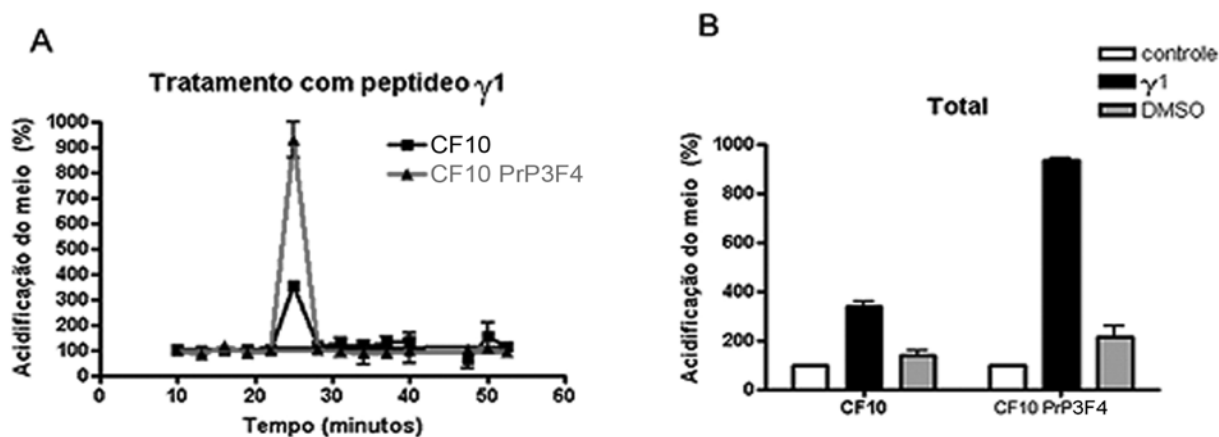
Sabe-se que a sinalização celular envolve a fosforilação de várias enzimas, um processo dependente de ATP e que, portanto, requer o aumento do metabolismo celular. A produção de ATP é realizada a partir da geração de elétrons provenientes da degradação de glicose. Esta gera ainda como subprodutos o CO₂ e o ácido láctico que são hidrolisados no interior da célula a HCO₃⁻/H⁺ e lactato/H⁺ e secretados, levando a acidificação do meio extracelular.

Na tentativa de comprovar que a reconstituição de PrP^C nas células CF10 PrP3F4 era capaz de resgatar sinalizações celulares promovidas por sua ligação a laminina, avaliamos o consumo de energia (ATP) destas células pela acidificação do meio extracelular usando um citossensor (*Cytosensor[®] Microphysiometer system*) (HAFNER 2000).

Uma vez que a laminina liga-se a vários outros receptores celulares além de PrP^C, todos os ensaios referentes aos efeitos do complexo PrP^C-laminina foram realizados usando-se apenas o decapeptídeo da cadeia γ 1 de laminina que representa o sítio de ligação a PrP^C.

A adição do peptídeo $\gamma 1$ de laminina ($50\mu\text{g/ml}$) promove um pequeno aumento na acidificação do meio extracelular em células CF10. Entretanto, em células CF10 expressando PrP^C tipo selvagem (PrP3F4) o peptídeo $\gamma 1$ promoveu um aumento de cerca de 9 vezes na acidificação do meio extracelular (Figura 21A). O gráfico comparativo entre as porcentagens de acidificação do meio de cultura de células CF10 e CF10 PrP3F4 antes e depois do tratamento com o peptídeo $\gamma 1$ está mostrado na figura 21B.

Esses dados indicam que o peptídeo $\gamma 1$ de laminina promove um incremento no metabolismo celular dependente da expressão de PrP^C.



Legenda: Análise da acidificação do meio extracelular promovida pelo tratamento das células com o peptídeo $\gamma 1$ de laminina. A) Células CF10 e CF10 PrP3F4 tratadas com $50\mu\text{g/ml}$ pep. $\gamma 1$ de laminina e monitoradas ao longo do tempo para o pH do meio extracelular. B) Comparação da acidificação do meio após o tratamento com o peptídeo $\gamma 1$ de laminina.

Figura 21 - Análise de resposta metabólica de células CF10 e CF10 PrP3F4 tratadas com o peptídeo $\gamma 1$ de laminina.

4.6 A INTERAÇÃO PrP^C – PEPTÍDEO γ 1 DE LAMININA PROMOVE SINALIZAÇÃO POR CÁLCIO MEDIADA POR RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO

O estudo da sinalização intracelular responsável pela neuritogênese promovida pela interação PrP^C-peptídeo γ 1 de Ln em culturas primárias de neurônios hipocâmpais foi realizado inicialmente com o uso de inibidores específicos para determinadas vias de sinalização. Os dados obtidos mostram que inibidores para PKC (*bisindolylmaleimide I* - BIM), ERK1/2 (*1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis (2-aminophenyltio) butadiene* - U0126) e PLC (U73122) foram capazes de inibir esta resposta celular (figura 1 do anexo 2).

Para confirmar estes resultados foram analisadas a fosforilação de ERK1/2 e PKC em culturas primárias de neurônios hipocâmpais tratadas com o peptídeo γ 1 de Ln, que mostrou a participação dessas vias no fenótipo final, a neuritogênese. Além disso, a ativação de fosfolipase C (PLC) era o componente mais *upstream* desta via (Figura 2 do anexo 2).

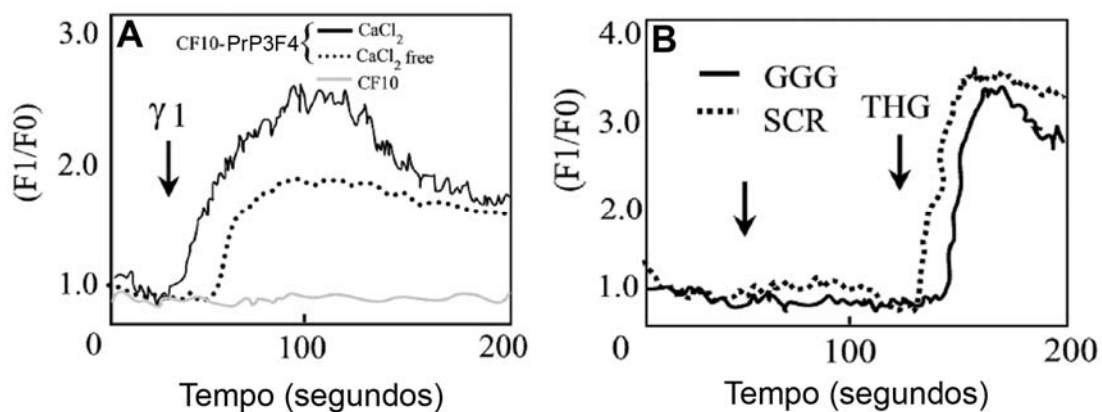
Corfimando a atividade de PLC , mostramos que o tratamento de neurônios hipocâmpais com o peptídeo γ 1 de Ln promove aumento de Ca²⁺ intracelular (Figura 3 do anexo 2) com a mobilização de cálcio do RE seguido da entrada de cálcio do meio extracelular de maneira dependente de PrP^C. Estudos sob minha responsabilidade foram conduzidos para caracterizar se a internalização de PrP^C após a interação com o peptídeo γ 1 de Ln é necessária para o aumento de Ca²⁺ citossólico ([Ca²⁺]_{ci}). Para isso

foram usadas células CF10 PrP3F4 e CF10 N-PrP3F4 contendo a mutação N-terminal que impede sua internalização.

Quando CF10 PrP3F4 foi tratada com o peptídeo $\gamma 1$ em meio contendo cálcio, houve um aumento de $[Ca^{2+}]_{ci}$. Quando o tratamento foi realizado em meio sem cálcio, o aumento de $[Ca^{2+}]_{ci}$ foi 40% menor que o anterior. Como esperado o tratamento com o peptídeo $\gamma 1$ não induziu aumento de $[Ca^{2+}]_{ci}$ em CF10 (Figuras 22A e 24).

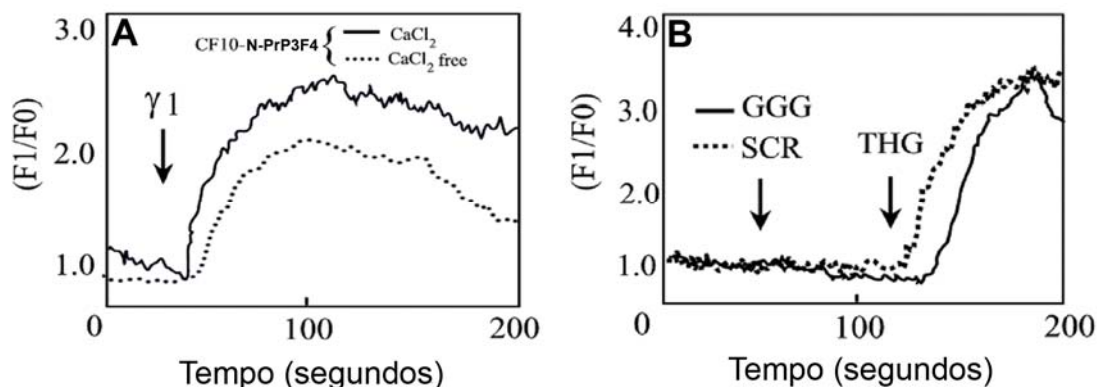
Ensaio realizado com as células CF10 N-PrP3F4 (Figuras 23A e 24), mostraram que a sinalização é semelhante aquela observada nas células CF10 PrP3F4 que expressam PrP^C tipo selvagem.

Vale ressaltar os controles realizados onde células CF10 PrP3F4 (Figura 22B) ou CF10 N-PrP3F4 (Figura 23B) não responderam ao tratamento com um peptídeo $\gamma 1$ *scrambled* (SCR) ou com um peptídeo $\gamma 1$ onde três aminoácidos da região carboxi-terminal (KDI), importantes para a ligação a PrP^C, foram substituídos por GGG.



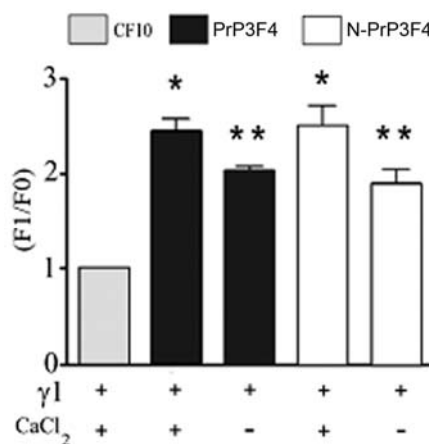
Legenda: (A) O tratamento com 50 μ g/ml peptídeo $\gamma 1$ induziu aumento de $[Ca^{2+}]_{ci}$ em células CF10 PrP3F4 em meio contendo cálcio (linha contínua) e em meio sem cálcio (linha tracejada). O mesmo tratamento não induziu o aumento de $[Ca^{2+}]_{ci}$ em células CF10 (linha cinza claro). (B) Tratamento com 50 μ g/ml peptídeo GGG ou SCR não promoveu aumento de $[Ca^{2+}]_{ci}$ apesar das mesmas apresentarem cálcio em estoques intracelulares que foram liberados pelo tratamento com 2 μ M tapsigargina (THG).

Figura 22 - Aumento da concentração de cálcio citoplasmático pelo tratamento de células CF10 expressando PrP^C tipo-selvagem com o peptídeo $\gamma 1$ de Ln.



Legenda: (A) O tratamento com 50µg/ml peptídeo $\gamma 1$ induziu o aumento de $[Ca^{2+}]_{Ci}$ em células CF10 N-PrP3F4 em meio contendo cálcio (linha contínua) e em meio sem cálcio (linha tracejada). (B) Tratamento com 50µg/ml peptídeo GGG ou SCR não promoveu aumento de $[Ca^{2+}]_{Ci}$ apesar das células apresentarem cálcio em estoques intracelulares que foram liberados pelo tratamento com 2µM tapsigargina (THG).

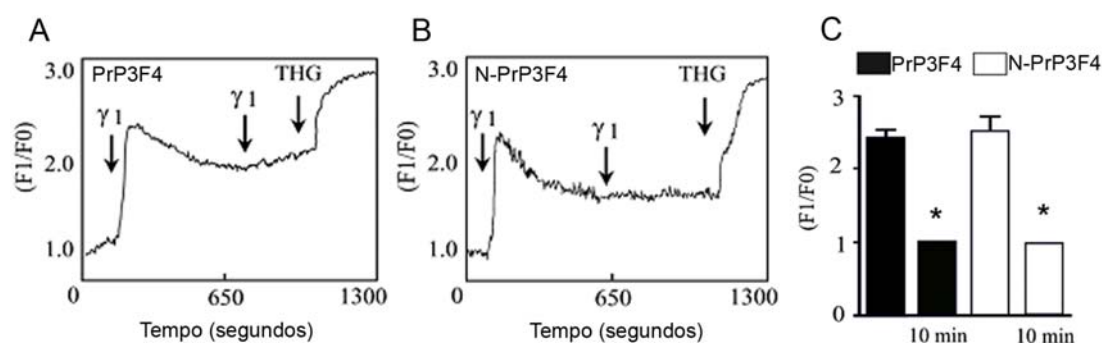
Figura 23 - Aumento da concentração de cálcio citoplasmático mediado pelo peptídeo $\gamma 1$ de Ln em CF10 expressando PrP^C mutante incapaz de ser internalizado.



Legenda: Quantificação dos níveis de $[Ca^{2+}]_{Ci}$ intracelular após o tratamento de células CF10 PrP3F4 ou CF10 N-PrP3F4 com o peptídeo $\gamma 1$ em meio contendo ou não cálcio. * $p < 0,05$ de CF10 vs CF10 PrP3F4 ou CF10 N-PrP3F4 com cálcio no meio extracelular e ** $p < 0,05$ de CF10 vs CF10 PrP3F4 ou CF10 N-PrP3F4 sem cálcio no meio extracelular.

Figura 24 - Quantificação dos ensaios de cálcio em CF10 tratadas com peptídeo $\gamma 1$ de Ln.

Foram ainda conduzidos experimentos onde as células CF10 PrP3F4 e CF10 N-PrP3F4 foram tratadas com o peptídeo $\gamma 1$ e após 10 min submetidas a um novo tratamento com o mesmo peptídeo. Os resultados indicam que o segundo tratamento com o peptídeo não induziu o aumento de $[Ca^{2+}]_{Ci}$ em CF10 PrP3F4 ou CF10 N-PrP3F4 (Figura 25) embora houvesse cálcio em estoques intracelulares como demonstrado com a adição de THG.



Legenda: (A) Células CF10 PrP3F4 ou (B) CF10 N-PrP3F4 foram submetidas a um primeiro tratamento com $50\mu\text{g/mL}$ peptídeo $\gamma 1$ de Ln e após 10 minutos da primeira indução receberam um segundo tratamento com o mesmo peptídeo. A seguir um terceiro tratamento foi realizado com $2\mu\text{M}$ tapsigargina (THG). (C) Quantificação de $[Ca^{2+}]_{Ci}$ após o primeiro e o segundo pulso de tratamento das células CF10 PrP3F4 ou CF10 N-PrP3F4 com o peptídeo $\gamma 1$ de Ln.

Figura 25 - Ensaio de sinalização de cálcio em células CF10 PrP3F4 e CF10 N-PrP3F4 após o tratamento com dois pulsos do peptídeo $\gamma 1$ de Ln .

Esse conjunto de dados confirmam os resultados obtidos em culturas primárias de neurônios (anexo 2) onde o aumento de Ca^{2+} intracelular mediado pela interação PrP^C-peptídeo $\gamma 1$ de Ln ocorre às custas da mobilização de estoques intracelulares de Ca^{2+} e pela entrada de cálcio do meio extracelular. Além disso, eles indicam que a sinalização intracelular de Ca^{2+} mediada pela interação PrP^C-peptídeo $\gamma 1$ de Ln não depende da

internalização de PrP^C. Entretanto, mesmo não sendo internalizado, o PrP^C que permanece na superfície da célula fica dessensibilizado uma vez que não é capaz de responder a um segundo estímulo com o peptídeo $\gamma 1$ de Ln.

Os dados obtidos nas células CF10 e CF10 PrP3F4 confirmaram e complementaram os dados obtidos em culturas primárias de neurônios do tipo-selvagem e *knockout* para PrP^C (os dados na íntegra podem ser vistos no anexo 2). Os resultados apontavam que a interação de PrP^C com o peptídeo $\gamma 1$ de Ln levam a ativação de PLC, liberação de InsP₃, mobilização de Ca²⁺ do retículo endoplasmático, ativação de PKC e entrada de Ca²⁺ extracelular através de canais estoque dependentes (SOCs) (ver anexo 2).

O fato de PrP^C ser uma proteína GPI ancorada indicou que sua atuação sobre a PLC deveria ser indireta e que possivelmente um receptor acoplado a proteína G fizesse parte de um complexo com PrP^C-peptídeo $\gamma 1$ de Ln.

Nosso grupo conduziu ensaios de *phage display*, coimunoprecipitação e colocalização, estes últimos em culturas primárias de neurônios tipo-selvagem e *knockouts* de PrP^C e mostrou que receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR1 e mGluR5) se associam a PrP^C. A expressão destes receptores em células HEK 293 reconstituiu a sinalização mediada por PrP^C/Ln. Além disso, o uso de antagonistas para mGluR1 e mGluR5 foi capaz de bloquear o aumento de cálcio intracelular e a neuritogênese promovidos pelo tratamento de culturas primárias de neurônios hipocâmpais com peptídeo $\gamma 1$ de Ln. Portanto, receptores mGluR1 e mGluR5 estão

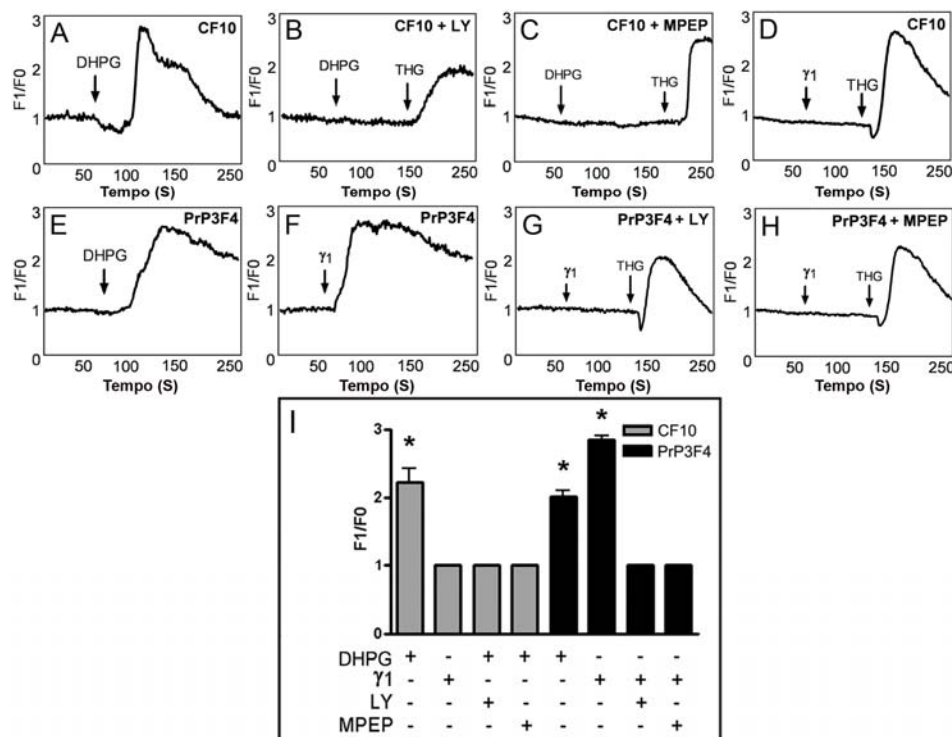
envolvidos na transdução de sinais disparados pela interação PrP^C-Ln (BERALDO et al. 2011, anexo 2).

Na tentativa de continuar a validação as células CF10 e CF10 PrP3F4 como modelo semelhante a neurônios de cultura primária expressando ou não PrP^C, conduzimos ensaios para estabelecer o papel dos receptores mGluR1 e mGluR5 na sinalização PrP^C-peptídeo γ 1 de Ln nestas células.

Células CF10 apresentam aumento de $[Ca^{2+}]_{ci}$ quando tratadas com *s(S)-3,5-dihydroxyphenylglycine* (DHPG), um agonista de receptores mGluR1 e R5 (Figura 26A). Este aumento é bloqueado pelos inibidores específicos de mGluR1 (LY367385) (Figura 26B) e de mGluR5 (*2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine* - MPEP) (Figura 26C). Estes dados indicam que a célula CF10 apresenta receptores mGluR1 e mGluR5 funcionais apesar de não expressarem PrP^C e por consequência não responderem com aumento de $[Ca^{2+}]_{ci}$ após o tratamento com o peptídeo γ 1 de Ln (Figura 26D). Por sua vez as células CF10 PrP3F4, onde a expressão de PrP^C foi reconstituída, continuam expressando receptores mGluR1 e mGluR5 funcionais, visto pela resposta ao agonista DHPG (Figura 26E) e, como esperado, respondem com aumento de $[Ca^{2+}]_{ci}$ ao o tratamento com o peptídeo γ 1 de Ln (Figura 26F). Quando as células CF10 PrP3F4 são tratadas com o peptídeo γ 1 de Ln na presença dos inibidores de mGluR1 (Figura 26G) ou mGluR5 (Figura 26H) não ocorre aumento de $[Ca^{2+}]_{ci}$. A figura 26I mostra os resultados quantitativos destes ensaios.

Estes dados indicam que, assim como em neurônios de cultura primária de animais tipo selvagem, em células CF10 PrP3F4 a interação

PrP^C-peptídeo $\gamma 1$ de Ln leva a um aumento de $[Ca^{2+}]_{Ci}$ mediado por receptores mGluR1 e mGluR5.



Legenda: Aumento intracelular de cálcio mediado pela ligação de PrP^C-peptídeo $\gamma 1$ de Ln é dependente de mGluR1 e mGluR5 em CF10 PrP3F4. Análise da concentração de $[Ca^{2+}]_{Ci}$ em células CF10 marcadas com $10\mu M$ Fluo 3AM e tratadas com (A) agonista de receptores mGluR1 e mGluR5, $100\mu M$ DHPG, (B) incubação prévia por 20 minutos a $37^\circ C$ a $5\% CO_2$ com antagonista de mGluR1, (LY367385, $100\mu M$) e, em seguida, com DHPG, (C) incubação prévia por 20 minutos com o antagonista de mGluR5 (MPEP, $10\mu M$) e, em seguida, com DHPG, (D) $50\mu g/mL$ de peptídeo $\gamma 1$ de Ln. Células CF10 PrP3F4 marcadas com $10\mu M$ Fluo 3AM foram tratadas com (E) DHPG, (F) $50\mu g/mL$ de peptídeo $\gamma 1$ de Ln, (G) antagonista mGluR1, LY, e peptídeo $\gamma 1$ de Ln, (H) antagonista de mGluR5, MPEP, e peptídeo $\gamma 1$ de Ln. Como controle positivo da reação foi utilizado $2\mu M$ THG. (I) Média \pm erro padrão dos níveis intracelulares de cálcio em CF10, CF10 PrP3F4. Experimentos independentes foram comparados ($n=3$) por one-way ANOVA e Dunnett's *post-hoc test*. * $p < 0,05$ de CF10 tratada com DHPG vs CF10 tratada com pep. $\gamma 1$ de Ln ou CF10 pré-tratada com LY ou MPEP e tratada com DHPG; CF10 PrP3F4 tratada com DHPG ou com pep. $\gamma 1$ de Ln vs CF10 PrP3F4 pré-tratada com LY ou MPEP e tratada com pep. $\gamma 1$ de Ln.

Figura 26 - Participação dos receptores mGluR1/5 na transdução de sinal dependentes de PrP^C em CF10.

Os dados apresentados nos itens anteriores mostram que a reconstituição da expressão de PrP^C na linhagem celular CF10, derivada de animais *knockout* de PrP^C, levou a expressão de uma molécula de PrP^C funcional nas células CF10 PrP3F4. Portanto, validando esta linhagem celular como modelo neuronal de estudo da resposta celular depende de PrP^C.

4.7 GERAÇÃO DE LINHAGENS DE CÉLULAS CF10 EXPRESSANDO MUTANTES DE PrP^C RELACIONADAS ÀS DOENÇAS GENÉTICAS POR PRIONS

Uma vez que a expressão da proteína tipo-selvagem de PrP^C de camundongo foi capaz de reconstituir as funções desta proteína em células CF10, decidimos usar estas células como modelo de estudo de perda de função das proteínas PrP^C associadas com doenças genéticas por prions.

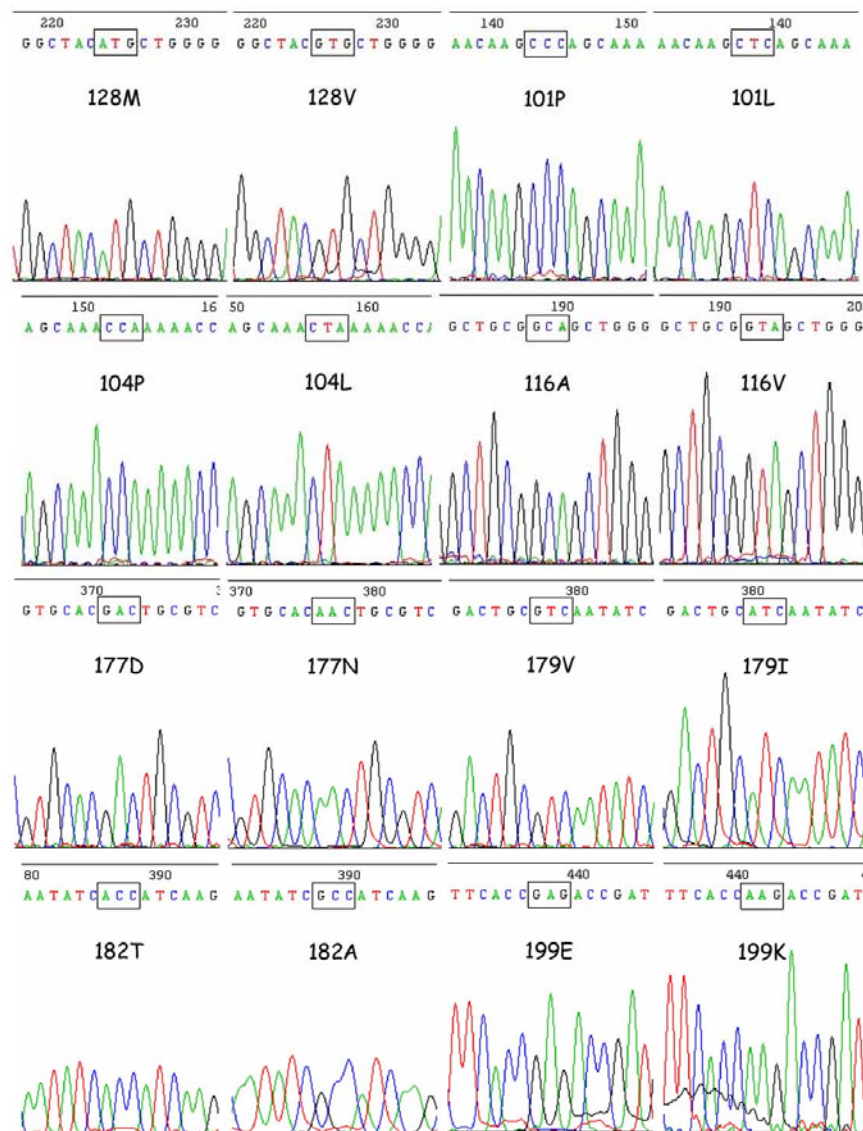
Inicialmente pretendíamos trabalhar com a proteína PrP^C humana, mas por indicação do comitê de biossegurança optamos por usar proteína PrP^C de camundongo e produzir mutações nos aminoácidos equivalentes (humano-camundongo). Isto é factível dada a conservação da molécula entre as duas espécies e de dados na literatura mostrarem que mutações equivalentes às humanas, quando expressas em camundongos, causam doenças degenerativas muito semelhantes às observadas em humanos (TELLING et al. 1996; YANG et al. 2009).

O cDNA de PrP^C de camundongo com o domínio 3F4, clonado no vetor pcDNA3 e utilizado para gerar as células CF10 PrP3F4, foi usado como molde para reação de mutagênese sítio dirigida a partir do protocolo descrito no item 3.2 de Material e Métodos. As alterações na sequência geraram a mudança dos aminoácidos Prolina¹⁰¹Leucina (CCC para CTC), Prolina¹⁰⁴Leucina (CCA para CTA), Alanina¹¹⁶Valina (GCA para GTA), Metionina¹²⁸Valina (ATG para **GTG**), Aspartato¹⁷⁷Asparagina (GAC para **AAC**), Valina¹⁷⁹Isoleucina (GTC para **ATC**), Treonina¹⁸²Alanina (ACC para **GCC**) e Glutamato¹⁹⁹Lisina (GAG para **AAG**). O códon 129 de PrP^C humano apresenta um polimorfismo de metionina para valina, sendo que o aminoácido metionina é o mais comum na população geral (DOH-URA et al. 1991; ZIMMERMANN et al. 1999; TSAI et al. 2001). Assim, o plasmídeo tipo-selvagem (PrP3F4) apresenta metionina no códon 128 (128M).

Os plasmídeos com as sequências de PrP^C mutado, bem como aquele com a sequência do tipo-selvagem (128M) e aquele com o polimorfismo (128V), foram sequenciados e os resultados podem ser vistos na figura 27.

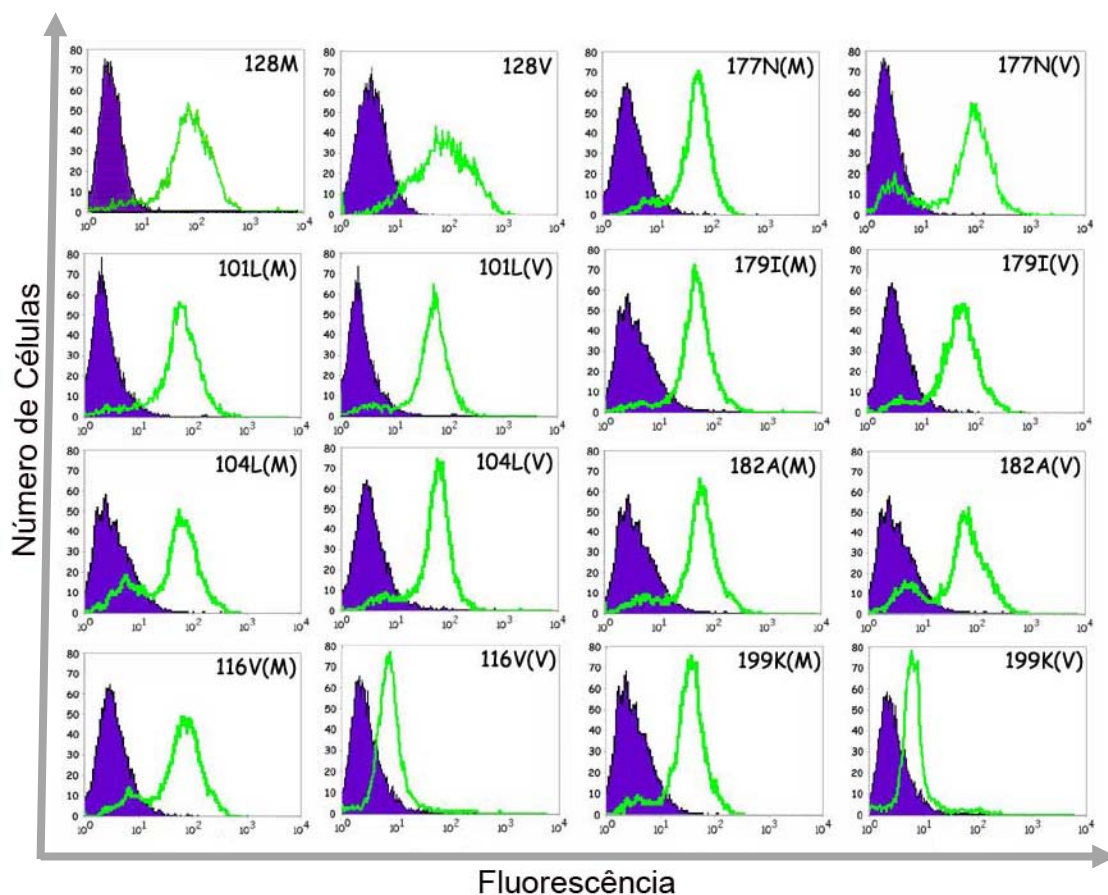
As células CF10 foram transfectadas com estes vetores e selecionadas com o uso de esferas magnéticas, obtendo-se assim populações celulares expressando PrP^C das seguintes linhagens: CF10 transfectada com PrP^C tipo-selvagem 128M (PrP3F4) e os mutantes de interesse. Estes foram nomeados conforme o códon mutado e o polimorfismo V ou M no códon 128 entre parêntesis, 101L, 104L, 116V, 177N, 179I 182A e 199K combinados com o polimorfismo na posição 128:

128M ou 128V. A expressão de PrP^C foi avaliada por citometria de fluxo, *western blotting* e imunofluorescência (Figuras 28 e 29).



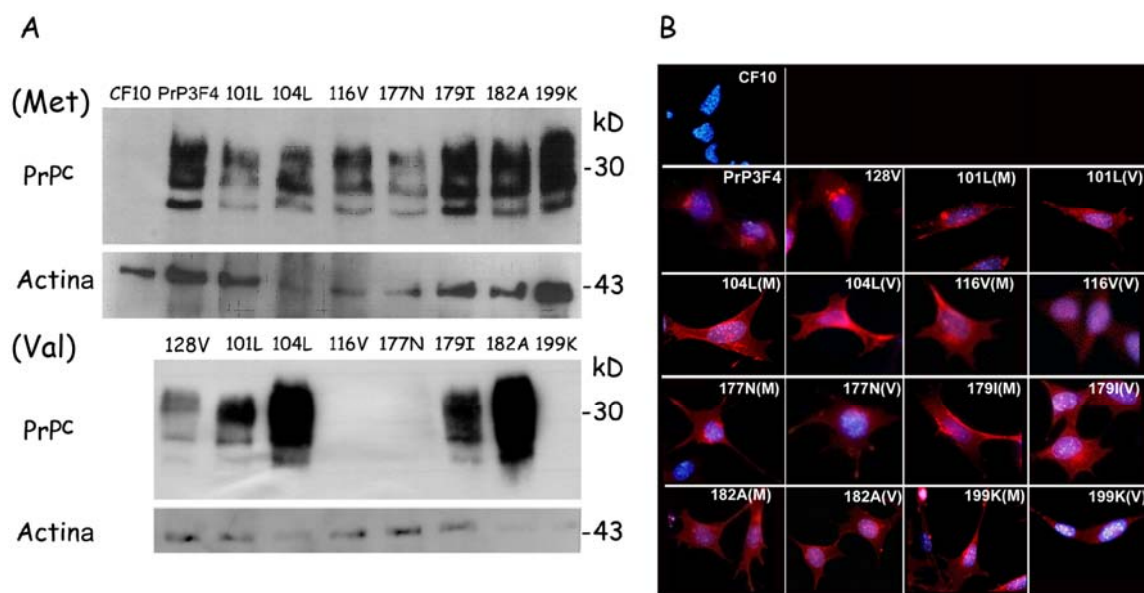
Legenda: Eletroferograma da sequência gênica de PrP^C clonada em pcDNA3 demonstrando a presença das mutações nos códons de interesse. Vemos 128Metionina (128M) para 128Valina (128V), 101Prolina (101P) para 101Leucina (101L), 104Prolina (104P) para 104Leucina (104L), 116Alanina (116A) para 116Valina (116V), 177Aspartato (177D) para 177Asparagina (177N), 179Valina (179V) para 179Isoleucina (179I), 182Treonina (182T) para 182Alanina (182A) e 199Glutamato (199E) para 199Lisina (199K).

Figura 27 - Eletroferograma do cDNA de PrP^C tipo-selvagem e mutantes clonados em pcDNA3.



Legenda: Histogramas de intensidade de fluorescência obtidos por citometria de fluxo para análise da expressão de PrP^C em CF10. Vemos CF10 128M, 128V e os mutantes 101L(M), 101L(V), 104L(M), 104L(V), 116V(M), 116V(V), 177N(M), 177N(V), 179I(M), 179I(V), 182A(M) 182A(V), 199K(M) e 199K(V). Em roxo, células marcadas apenas com anticorpo secundário, em verde, células marcadas com anticorpo anti-3F4 e anticorpo secundário conjugado a *R-phycoerythrin*.

Figura 28 - Perfil de expressão das diferentes construções de PrP^C em células CF10.



Legenda: Expressão total de PrP^C em células CF10 transfectas. A- *Western Blotting* para a avaliação da expressão das diferentes construções de PrP^C em células CF10. As células foram lisadas e os extratos protéicos submetidos à eletroforese (SDS-PAGE). A seguir, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose. A expressão das moléculas de PrP^C foi avaliada pelo uso do anticorpo anti-PrP^C/3F4. B- Expressão das diferentes construções de PrP^C em células CF10 avaliada por imunofluorescência. As células foram permeabilizadas e marcadas com anti-PrP^C/3F4 e secundário Alexa 546 (vermelho). Os núcleos foram corados com DAPI (azul).

Figura 29 - Análise da expressão das diferentes construções de PrP^C em células CF10 por *western blotting* e imunofluorescência.

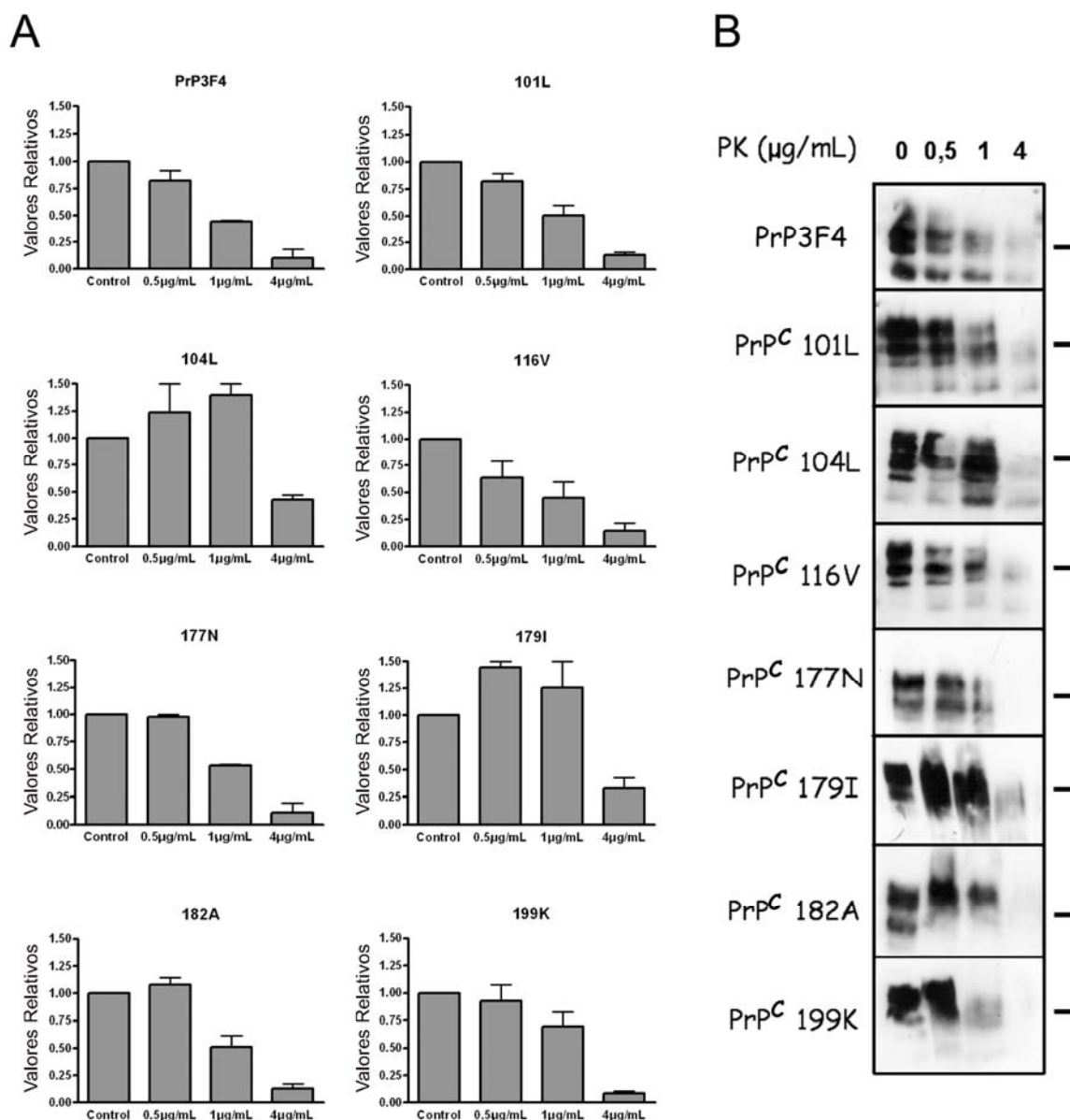
É possível observar a expressão de PrP^C por citometria de fluxo (Figura 28) e imunofluorescência (Figura 29B) em todas as linhagens celulares que foram geradas. Entretanto, o ensaio de *western blotting* (Figura 29A) mostra uma baixa expressão das construções 129V, 116V(V), 177N(V) e 199K(V). Como conseguimos todos os mutantes de metionina e PrP3F4 128M com níveis semelhantes de expressão, decidimos levar o trabalho a diante com apenas essas linhagens dos mutantes combinados com 128M.

4.8 CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA À PROTEINASE K DE MUTANTES DE PrP^C EXPRESSO EM CÉLULAS CF10

Um marcador de doença de prion em humanos e animais é a conversão de PrP^C na forma patogênica PrP^{Sc}. Como dito anteriormente, mutações pontuais associadas a doenças genéticas por prions podem promover a conversão espontânea de PrP^C para PrP^{Sc} por uma diminuição da estabilidade da forma nativa de PrP^C (COHEN et al. 1994; HUANG et al. 1994).

Alguns trabalhos mostraram que PrP^C mutante pode apresentar uma maior resistência a proteinase K (PK) quando comparado com PrP^C tipo-selvagem, apesar dessa resistência ser muito abaixo daquela observada na molécula de PrP^{Sc} proveniente de células ou cérebro infectado. Sabe-se que a degradação de PrP^{Sc} derivado de homogenato de cérebro de animais contaminados ocorre com, pelo menos, 50µg/mL de PK (PASTRANA et al. 2006).

Os extratos celulares de células expressando os diferentes mutantes de PrP^C foram submetidos a digestão com 0.5, 1 e 4 µg/ml de PK. A seguir a expressão de moléculas de PrP^C resistentes foi analisada por *western blotting*. As mutações em PrP^C murino 104L, 177N, 179I, 182A e 199K foram mais resistentes ao tratamento com PK quando comparadas com PrP^C tipo-selvagem, enquanto que os mutantes 101L e 116V são tão sensíveis quanto PrP^C tipo selvagem (Figura 30).



Legenda: Extratos proteicos de células CF10 transfectadas com PrP^C tipo-selvagem e mutantes foram tratados com concentrações crescentes de PK (0, 0.5, 1 and 4 µg/mL). As proteínas resistentes ao tratamento foram detectadas por *western blotting*. A- Média ± erro padrão da intensidade da banda relativo ao controle. B- Imagem representativa do *western blotting*. O peso molecular está indicado por uma barra no lado direito do painel que representa 30 kDa. Os mutantes 104L, 177N, 179I, 182A e 199K foram mais resistentes à degradação proteolítica quando comparados a proteína tipo-selvagem.

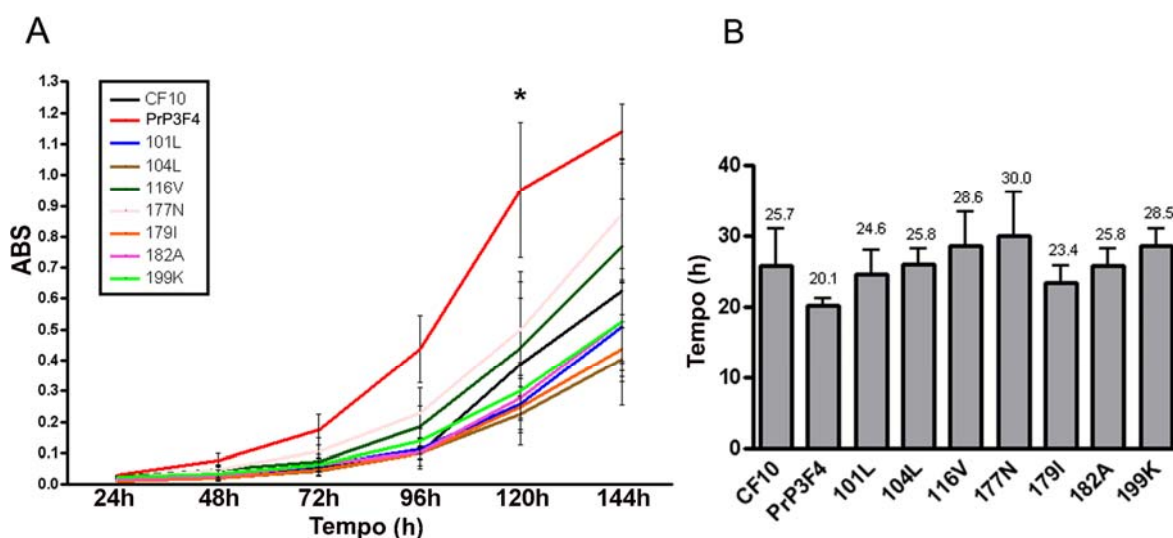
Figura 30 - Análise de proteólise limitada por proteinase K dos mutantes de PrP^C.

4.9 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS CF10 EXPRESSANDO PrP^C TIPO-SELVAGEM E MUTANTES DE PrP^C

As linhagens de células CF10 expressando PrP^C tipo-selvagem bem como os mutantes de PrP^C foram avaliadas quanto a sua proliferação através de curvas de crescimento.

A célula CF10 PrP3F4 apresenta uma maior proliferação celular (Figura 31A) e, portanto, menor tempo de dobramento (Figura 31B), quanto comparada com a célula CF10 ou CF10 expressando os mutantes de PrP^C.

Desta forma, a presença de PrP^C parece aumentar a proliferação celular, entretando, a expressão de mutantes de PrP^C não é capaz de reconstituir a função de PrP^C para este fenótipo.



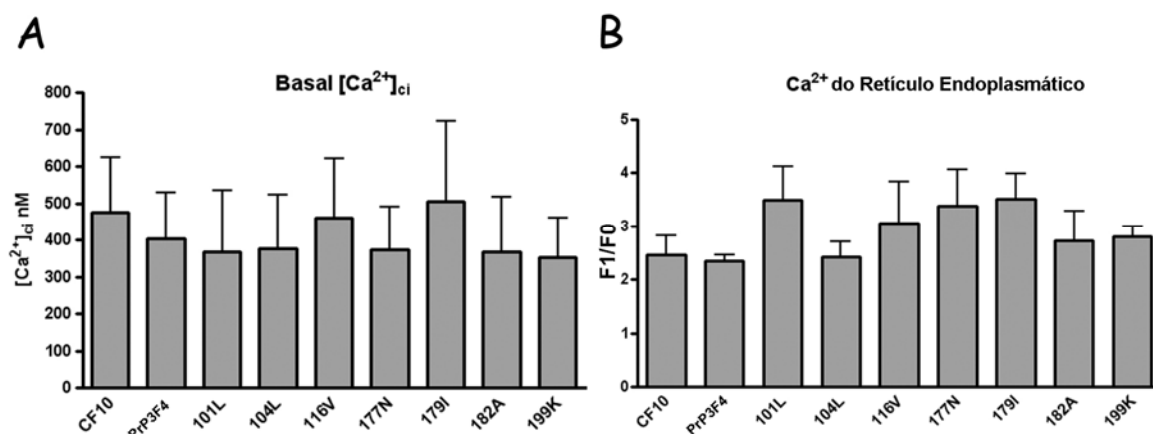
Legenda: A- Análise da curva de crescimento temporal avaliada por ensaio de MTT. Células CF10 em fase *log* de crescimento foram plaqueadas e analisadas nos tempos de 24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h. * $p < 0,05$ em 120h para CF10 PrP3F4 vs todas as outras células. B- Tempo médio de dobramento de cada linhagem.

Figura 31 - Curva de crescimento e tempo de dobramento de célula CF10, CF10 PrP3F4 e CF10 expressando mutantes de PrP^C.

4.10 AVALIAÇÃO DA SINALIZAÇÃO POR CÁLCIO EM CÉLULAS CF10 EXPRESSANDO MUTANTES DE PrP^C EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM PEPTÍDEO γ 1 DE Ln

Como mostrado no ítem 4.6 dos resultados, PrP^C interage com o peptídeo γ 1 de Ln em células CF10 PrP3F4 promovendo um aumento intracelular de Ca²⁺, através da mobilização de estoques intracelulares e ativando canais na membrana.

Numa primeira abordagem, foram avaliadas as concentrações basais de Ca²⁺ citossólico e de retículo endoplasmático (ER) entre as células CF10, CF10 PrP3F4 e aquelas expressando os diferentes mutantes de PrP^C. Três ensaios independentes foram realizados e não observamos diferenças estatísticas entre as concentrações basais de Ca²⁺ citossólico livre e nos estoques no ER entre as linhagens (Figura 32).

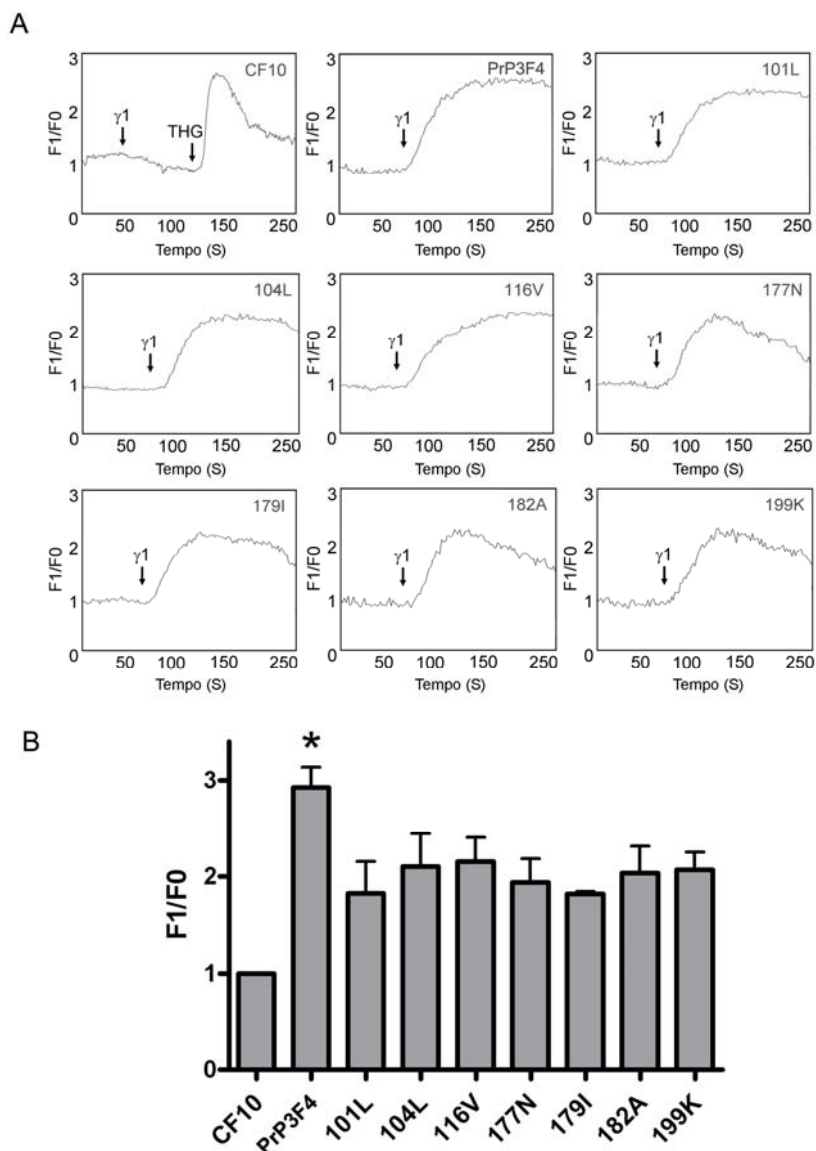


Legenda: As concentrações basais de cálcio em CF10 e em CF10 expressando as diferentes construções de PrP^C são semelhantes. A- Concentrações basais de Ca²⁺ citossólico. As células foram incubadas com 10μM Fluo-3AM e, após o período de incubação, uma primeira leitura de fluorescência foi analisada em um espectrofluorímetro. A seguir, foi adicionado 100μM digitonina (um detergente que lisa as células fazendo com que o Fluo-3 livre interaja com o Ca²⁺ do meio extracelular, obtendo-se assim uma leitura de fluorescência máxima que reflete a concentração total de Ca²⁺ no sistema) e, em seguida, 16mM EGTA para uma terceira leitura (um quelante de íons que compete com Fluo-3 pela ligação com Ca²⁺ e que resultará na obtenção de uma fluorescência mínima). O cálculo de concentração foi feito através da fórmula $[Ca^{2+}]_{ci} free nM = kd Fluo-3AM a 22^{\circ}C pH7,2 (F - Fmin) / (Fmax - F)$. B- Concentrações de Ca²⁺ no RE. As células foram incubadas com Fluo-3AM e, após o período de incubação, elas foram tratadas com 2μM THG, que induz de maneira inespecífica a liberação de cálcio do RE. As variações de intensidade de fluorescência das células foram analisadas por microscopia confocal onde foi calculada a razão entre a fluorescência depois e a fluorescência antes do tratamento com THG (F1/F0).

Figura 32 - Avaliação dos níveis basais de cálcio em CF10 expressando os mutantes de PrP^C.

A seguir, foi avaliada a concentração de cálcio citossólico ($[Ca^{2+}]_{ci}$) em células CF10 expressando as diferentes construções de PrP^C tratadas com o peptídeo $\gamma 1$ de Ln. Todas as células transfectadas mostraram aumento de $[Ca^{2+}]_{ci}$ após o tratamento. Entretanto, o aumento nas concentrações de $[Ca^{2+}]_{ci}$ mediado pelo peptídeo $\gamma 1$ de Ln é

significativamente menor nas células expressando os mutantes de PrP^C do que aquele observado nas células CF10 PrP3F4 (Figura 33). Isso sugere, portanto, que as células que expressam os mutantes de PrP^C apresentam uma deficiência na sinalização celular por cálcio mediada pela interação PrP^C-peptídeo γ 1 de Ln.



Legenda: Prejuízo na sinalização de cálcio mediada pelo peptídeo $\gamma 1$ de Ln em CF10 expressando mutantes de PrP^C. A- Células CF10 e CF10 PrP3F4 ou CF10 expressando os mutantes de PrP^C (101L, 104L, 116V, 177N, 179I, 182A e 199K). As células foram marcadas com 10 μ M Fluo 3AM e tratadas com 50 μ g/mL peptídeo $\gamma 1$ de laminina e/ou com 2 μ M THG em meio suplementado com 2mM de CaCl₂. As variações de intensidade de fluorescência das células foram analisadas por microscopia confocal onde foi calculada a razão entre a fluorescência depois e a fluorescência antes dos tratamentos (F1/F0). B- Média \pm erro padrão dos níveis intracelulares de cálcio em CF10, CF10 PrP3F4 e CF10 PrP^C mutantes. Experimentos independentes foram comparados (n=4) por one-way ANOVA e Dunnett's *post-hoc test*. *p<0,05 CF10 PrP3F4 vs CF10 e todas as CF10 PrP^C mutantes.

Figura 33 - A sinalização de cálcio é prejudicada em células expressando mutantes de PrP^C associados à TSEs.

4.11 DIFERENCIAÇÃO MEDIADA PELO PEP. γ 1 de Ln EM CÉLULAS CF10, CF10 PrP^C3F4 e CF10 EXPRESSANDO MUTANTES DE PrP^C

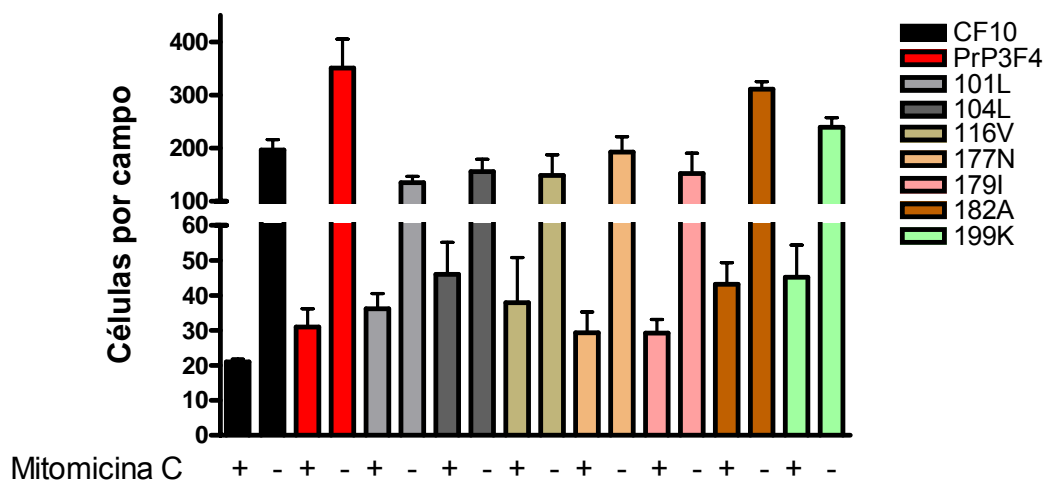
A interação entre PrP^C e o peptídeo γ 1 de Ln promove ativação das vias de cálcio que, por sua vez, estão envolvidas na neuritogênese em culturas primárias de neurônios hipocâmpais (GRANER et al. 2000; BERALDO et al. 2011).

Nossos resultados mostraram diferença na sinalização de cálcio entre PrP3F4 e mutantes de PrP^C quando estes são tratados com o peptídeo γ 1 de Ln (figura 33). Portanto, decidimos avaliar se a expressão de PrP^C tipo-selvagem pode resgatar o fenótipo de diferenciação nas células CF10 de forma semelhante ao observado em neurônios de cultura primária (BERALDO et al. 2011). Além disso, se havia comprometimento deste fenótipo em células CF10 expressando mutantes de PrP^C.

Ensaio preliminares indicaram que a inibição da proliferação nas células CF10 com mitomicina C permitia sua diferenciação por Ln íntegra. Portanto, havia uma diferenciação por Ln independente de PrP^C e para que ela ocorresse era necessário inibir a proliferação (Figura 15). Nossa hipótese inicial para esta ausência de fenótipo era de que o estado proliferativo destas células impedia sua diferenciação. Além disso, a diferenciação mediada por Ln íntegra seria mediada por outros ligantes de Ln como por exemplo integrinas.

Foram então realizados ensaios onde as células foram tratadas com mitomicina C, um intercalante de DNA que aumenta a quebra de

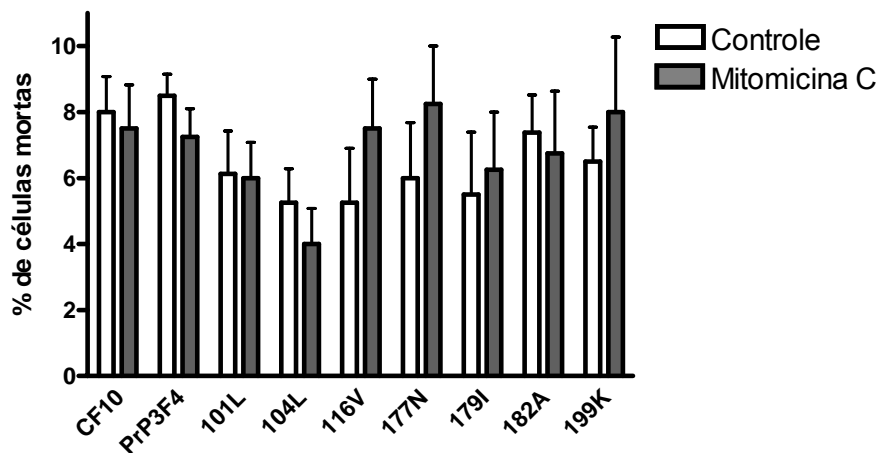
simples/dubla fita, impedindo ou atrasando sua síntese (MARTINEZ et al. 2008), na concentração de 10 μ g/mL por 3 horas. Este tratamento foi capaz de inibir a proliferação das células CF10, CF103F4 e CF10 expressando os mutantes de em cerca de 10 vezes (Figura 34).



Leganda: As células CF10, CF10 PrP3F4 e CF10 expressando os mutantes de PrP^C tratadas ou não com 10 μ g/mL mitomicina C, foram plaqueadas em lamínula previamente tratadas com 5 μ g/mL PL. Após de 48h de incubação, as células foram fixadas em 4% PFA e coradas com hematoxilina para captura de imagem e contagem de células por campo em, pelo menos, 5 campos por experimento. As células não tratadas com mitomina C apresentaram, em média, 10X mais células por campo quando comparada com as células tratadas. O gráfico mostra média \pm erro padrão do número de células por campo. Experimentos independentes foram comparados (n=4).

Figura 34 - Número médio de células por campo com ou sem o tratamento com mitomicina C.

Apesar de sua atividade sobre a proliferação, mitomicina não altera a viabilidade de nenhuma das linhagens de CF10 em estudo (Figura 35).

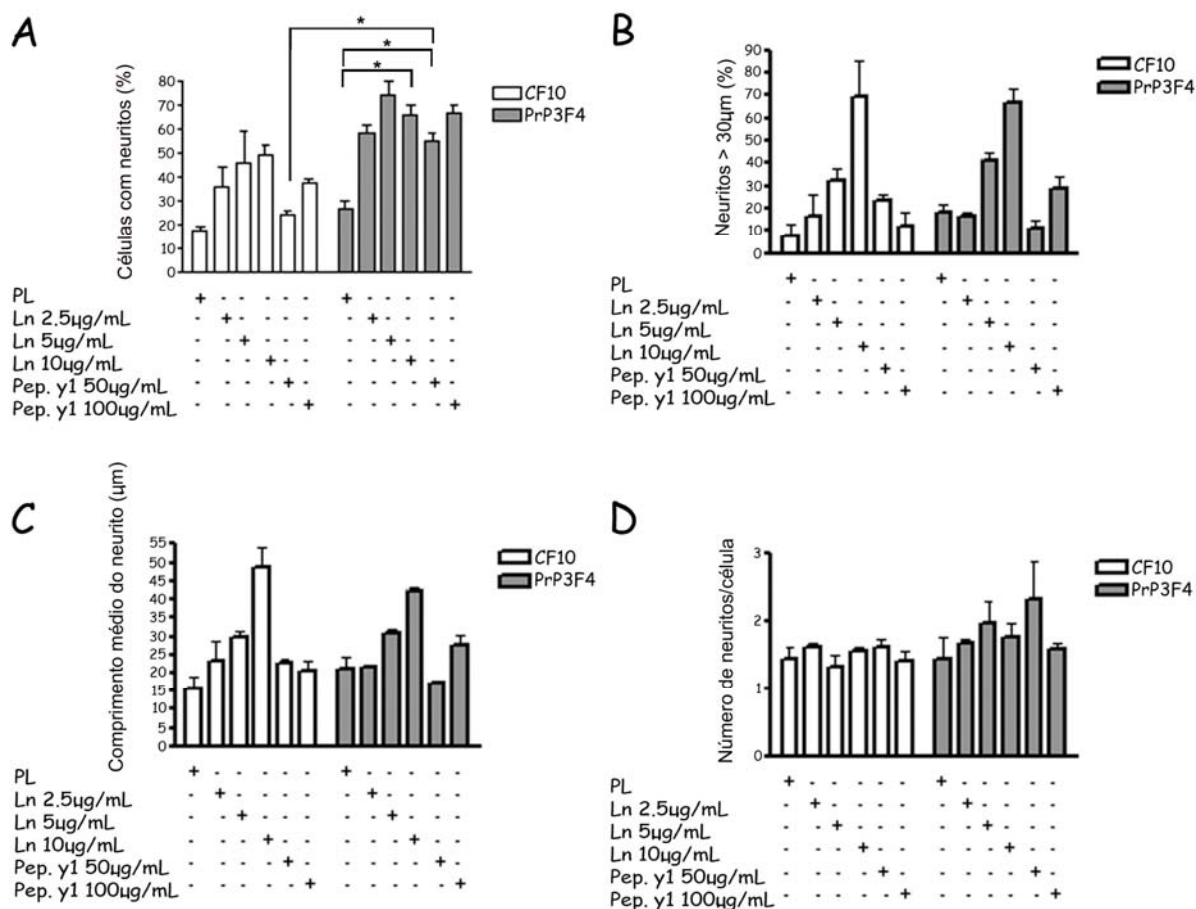


Legenda: Células CF10, CF10 PrP3F4 e CF10 expressando os mutantes de PrP^C foram tratadas com 10µg/mL mitomicina C por 3h. a 37°C a 5% CO₂ e a viabilidade celular analisada por exclusão com azul de tripan. Não houve diferença significativa na viabilidade entre as diferentes linhagens de CF10 tratadas ou não com mitomicina.

Figura 35 - Viabilidade das células CF10, CF10PrP3F4 e CF10 PrP^C mutantes após tratamento com mitomicina C.

Foram então iniciados experimentos com células CF10 e CF10 PrP3F4 plaqueadas sobre poli-lisina, poli-lisina + laminina e poli-lisina + peptídeo γ 1 de Ln. O intuito do tratamento foi encontrar uma concentração de laminina ou de pep. γ 1 onde apenas as células CF10 PrP3F4 respondessem, em comparação com CF10. Isto determinaria um efeito específico mediado por PrP^C. Para caracterização da diferenciação destas células foram avaliados parâmetros morfológicos como: % de células com neuritos (Figura 36A), % de células com neuritos maiores que 30 µm (Figura 36B), tamanho médio dos neuritos (Figura 36C) e número de neuritos por célula (Figura 36D).

A Ln íntegra, particularmente na concentração de 10 μ g/ml, foi capaz de modificar todos os parâmetros de diferenciação (Figuras 36A-C) menos o número de neuritos por célula (Figura 36D) tanto em células CF10 quanto em CF10 PrP3F4, reproduzindo o que já havia sido demonstrado, em parte, na figura 15. Interessantemente, o peptídeo γ 1 de Ln nas concentrações de 50 μ g/mL e 100 μ g/mL foi capaz de promover a neuritogênese, medida pela porcentagem de células com neuritos, apenas nas células CF10 PrP3F4 (Figura 36A). Concentrações menores de peptídeo não tiveram efeito nos parâmetros avaliados (dados não mostrados).



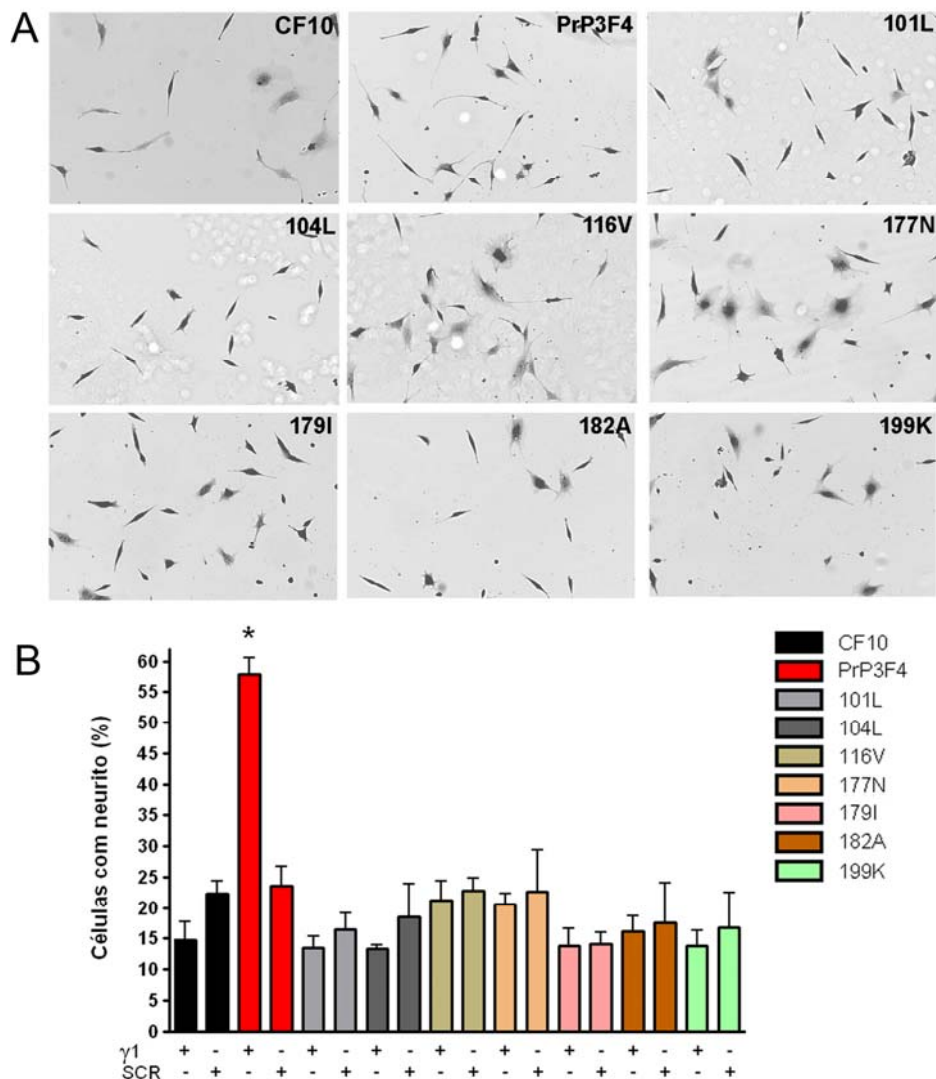
Legenda: Legenda: Análise da diferenciação neuronal promovida por Ln e seu peptídeo da cadeia $\gamma 1$ ligante de PrP^C. Células CF10 e CF10 PrP3F4 foram tratadas com 10 μ g/mL mitomicina por 3 horas. A seguir receberam tratamento com 5 μ g/mL polilisina, Ln (2.5, 5 e 10 μ g/mL) e pep. $\gamma 1$ de Ln (50 e 100 μ g/ml) por 48 horas. As células foram fixadas com 4% PFA e coradas com hematoxilina e os parâmetros morfométricos quantificados. A- Porcentagem de células com neuritos (células com neuritos de qualquer tamanho/número total de células). B- Neuritos maiores que 2 corpos celulares, aqui estabelecido como 30 μ m (neuritos maiores que 30 μ m/número total de neuritos). C- Comprimento médio dos neuritos (comprimento total dos neuritos/número de neuritos). D- número de neuritos por células (número de neuritos/número de células com neurito). Todos os valores representam a média \pm erro padrão de 3 experimentos independentes comparados por one-way ANOVA e Dunnett's *post-hoc test*. * $p < 0,05$.

Figura 36 - Padronização do ensaio de diferenciação em células CF10 e CF10 PrP3F4.

Estabelecidas as condições de diferenciação em células CF10 PrP3F4 mediada pela interação PrP^C-peptídeo γ 1 de Ln, foram conduzidos ensaios com todos os mutantes de PrP^C do presente estudo.

As células receberam 10 μ g/mL mitomicina por 3 horas e a seguir, 2x10⁴ células foram plaqueadas em lamínulas pré-tratadas com 5 μ g/mL de PL ou PL + 50 μ g/mL de pep. γ 1 de Ln ou PL + 50 μ g/mL de *scrambled* (SCR) do pep. γ 1 de Ln e incubadas por 48 horas a 37°C a 5% CO₂. A avaliação da neuritogênese, número de células com neuritos, mostrou que de forma semelhante à célula CF10 que não expressa PrP^C, nenhuma das linhagens de CF10 expressando os mutantes de PrP^C foi capaz de sofrer diferenciação mediada pelo peptídeo γ 1 de Ln. Entretanto, as células CF10 PrP3F4 apresentavam uma diferenciação robusta (Figura 37).

Estes resultados indicam que os mutantes de PrP^C, responsáveis por doenças genéticas por prions, apresentam perda de função quanto a sua atividade de promover diferenciação pela interação específica entre PrP^C e Ln.



Legenda: Células CF10, CF10 PrP^C3F4 e CF10 expressando os mutantes de PrP^C foram tratadas com 10µg/mL mitomicina C e plaqueadas sobre lamínulas tratadas com 5µg/mL PL ou PL+ 50µg/mL SCR ou PL+ 50µg/mL pep. γ1. Após 48h de incubação, as células foram então fixadas com 4% de PFA e marcadas com hematoxilina. A análise morfométrica foi feita através da porcentagem de células com neuritos (células com neuritos/número total de células). A) Imagens representativas dos campos avaliados das linhagens de células CF10, CF10 PrP^C3F4 e os mutantes de PrP^C 101L, 104L, 116V, 177N, 179I, 182A e 199K. B) Média ± erro padrão do número de células com neuritos CF10, CF10 PrP^C3F4 e CF10 PrP^C mutantes. Experimentos independentes foram comparados (n=4) por one-way ANOVA e Dunnett's *post-hoc test*. *p<0,05 CF10 PrP^C3F4 tratadas com pep. γ1 de Ln vs todas as outras células.

Figura 37 - Mutantes de PrP^C responsáveis por doenças genéticas por prions são incapazes de induzir neuritogênese mediada pela interação PrP^C-Ln.

5 DISCUSSÃO

A perda de função biológica de PrP^C é um possível mecanismo pelo qual a formação de PrP^{Sc} pode resultar em neurodegeneração (HETZ et al. 2003), ou ter um importante papel na contribuição para a mesma. Numerosos estudos têm proposto várias funções para PrP^C, incluindo papel em neuroproteção, inibição de apoptose, proteção contra estresse oxidativo, sinalização celular, adesão, mielinização, tráfico de íons e envolvimento na atividade sináptica (HETZ et al. 2003; WESTERGARD et al. 2007; MARTINS et al. 2010). Apesar destes achados, ainda há um debate na literatura quanto a função biológica de PrP^C principalmente pela falta de fenótipos patológicos que sejam incompatíveis com a vida em camundongos *knockouts* para PrP^C. Os fenótipos encontrados nestes animais foram: alterações na transmissão neuronal e atividade elétrica, alterações na neurogênese, no ritmo circadiano e aumento da sensibilidade à isquemia, hipóxia e convulsões (CHIESA e HARRIS 2009, MARTINS et al. 2010). Uma explicação para estes fenótipos pouco letais pode ser a existência de mecanismos compensatórios por proteínas com funções redundantes a PrP^C (BUELER et al. 1992). Alguns mecanismos compensatórios já foram descritos nas vias de sinalização em células provenientes destes animais entre eles: hiperativação da via de MAPK (BROWN et al. 2002; CHIARINI et al. 2002; LOPES et al. 2005) e maior atividade de integrina $\alpha_v\beta_3$ (HAJJ et al. 2007).

PrP^C é uma proteína GPI ancorada que está preferencialmente localizada em domínios de membrana ricos em colesterol e esfingolípídios (*lipid rafts*) (FIVAZ et al. 2002). Esses domínios de membrana contêm moléculas que recrutam proteínas especializadas em transdução de sinal (GORODINSKY e HARRIS 1995) e é possível que PrP^C possa modular a atividade dessas proteínas tanto por interação direta quanto indireta. Nosso grupo vem trabalhando com PrP^C há aproximadamente 15 anos e os resultados acumulados ao longo desse tempo nos permitiram propor que PrP^C participa de uma plataforma multiprotéica na superfície celular responsável por modular diferentes vias de sinalização. Isso se deve a sua capacidade de associar-se a um grande número de proteínas, entre elas STI1 e Ln, e modular diferentes vias de transdução de sinal, bem como sua habilidade de mover-se seletivamente entre a membrana plasmática e compartimentos endocíticos intracelulares.

Interessantemente os fenótipos mais relevantes relacionados a alterações em PrP^C encontram-se em camundongos PrP^C *knockouts* onde a expressão de moléculas de PrP^C deletadas de domínios específicos foi reconstituída. Estes animais desenvolvem doenças neurodegenerativas severas logo nas primeiras semanas de vida (revisado por MARTINS et al. 2010). Entre as deleções deletérias, estão aquelas entre os aminoácidos 105-125 e entre 177-200 onde estão, respectivamente, os sítios de interação de PrP^C com STI1 e Ln. Curiosamente, mutações na molécula de PrP^C humana, responsáveis por GSS, estão mapeadas preferencialmente no

domínio de interação a STI1 enquanto que o domínio de ligação da Ln concentra mutações responsáveis por CJD ou FFI.

Portanto, a deleção de domínios específicos de PrP^C em camundongos transgênicos ou a presença de mutações associadas a TSEs podem alterar funções celulares dependentes de PrP^C, principalmente daquelas relacionadas ao seu papel neurotrófico. Desta forma, é extremamente importante conhecer os mecanismos associados à perda-de-função destes mutantes nas atividades de sinalização, sobrevivência e diferenciação desencadeados quando estes se associam a STI1 e Ln.

Assim, o presente estudo teve como principal objetivo avaliar o comportamento de células que expressam diferentes mutações em PrP^C, associadas à doenças genéticas por prions, e compará-las com as células expressando PrP^C tipo-selvagem.

Nesse sentido, nosso primeiro desafio foi a escolha de um bom modelo celular, que se mostrasse de fácil cultivo e capaz de reproduzir os fenômenos observados em cultura primária de neurônios derivados de animais transgênicos para PrP^C. A linhagem CF10 foi a escolhida por ser uma linhagem imortalizada e de origem neural, derivada de um camundongo que não expressa PrP^C e na qual a expressão de proteínas PrP^C exógenas de interesse poderia ser reconstituída, e sua função avaliada, sem a interferência da proteína endógena. Estas células foram inicialmente usadas para gerar duas linhagens, uma que expressa PrP^C murino tipo-selvagem com o epítipo humano 3F4 (CF10 PrP3F4) e outra cujo PrP^C apresenta uma mutação na região amino-terminal que impede sua internalização. Estas

células foram ferramentas importantes para mostrar que as células CF10 PrP^C podem resgatar respostas celulares específicas mediadas por PrP^C e mimetizam de forma bastante fidedigna o que se observa em culturas primárias de neurônios. Estas células foram amplamente usadas em três artigos recentes do grupo (CAETANO et al. 2008; BERALDO et al. 2010; BERALDO et al. 2011).

Os resultados descritos nos itens 4.2, 4.3 e Caetano e cols. (2008) (ANEXO 1) demonstram que a expressão de PrP^C tipo-selvagem em células CF10 leva a resposta ao estímulo com STI1, aumentando a atividade de PKA e ERK1/2. Os resultados apontaram ainda que a internalização de PrP^C é importante para ativar a via de ERK1/2 mas não a via de PKA. Desta maneira, PrP^C poderia modular vias de sinalização dependentes de STI1 e direcionar para vias de sinalização distintas.

A endocitose de proteínas GPI ancoradas é muito complexa e pode variar dependendo o tipo celular (FIVAZ et al. 2002). Apesar da internalização de PrP^C já ter sido relacionada a caveolina (PETERS et al. 2003), evidências têm favorecido a sua endocitose por clatrina (SHYNG et al. 1994; SUNYACH et al. 2003; TAYLOR et al. 2005). A *low-density lipoprotein receptor-like protein* (LRP1) parece ter um importante papel na internalização de PrP^C (MORRIS et al. 2006; TAYLOR e HOOPER 2006; PARKYN et al. 2008), permitindo que PrP^C internalize dentro de vesículas de clatrina. LRP1 tem sido relacionada com a ativação de sinalização por ERK (ORR et al. 2003), e poderia auxiliar, dentre outras proteínas, na

internalização de PrP^C disparada pela interação com STI1 e na ativação de ERK.

Foi demonstrado ainda que as células CF10 expressando PrP^C parecem ser responsivas ao tratamento com STI1, ativando vias de sinalização relacionadas com síntese de proteínas, um evento essencial para a plasticidade neuronal e a formação de memórias de longa duração (SHORS 2004; STOICA et al. 2011). Mais do que isso, nossos resultados mostraram que células que não expressam PrP^C são mais susceptíveis ao estresse do retículo endoplasmático, medido pela fosforilação de eIF2 α , do que aquelas que expressam PrP^C. Indicando, portanto, um papel importante de PrP^C na proteção contra este tipo de estresse. Vale lembrar que células infectadas por prions ou que foram expostas a extratos de cérebros de animais infectados também apresentam redução na síntese de proteínas e maior fosforilação de eIF2 α (ROFFEE et al. 2010). Desta forma, podemos supor que a perda de função das proteínas mutantes de PrP^C, quando associadas a STI1, poderia participar das alterações patológicas e clínicas presentes nas doença genéticas por prions. No presente estudo, não houve tempo hábil para estudar o comprometimento na síntese de proteínas causado pelo estresse de retículo endoplasmático nas células CF10 que expressam os diferentes mutantes de PrP^C. Entretanto, este é um projeto que deve ser iniciado em breve pelo grupo.

As células CF10 e CF10 PrP3F4 foram ainda instrumentos importantes para mapear toda a sinalização desencadeada pela interação de PrP^C com o peptídeo da cadeia γ 1 de Ln. Em particular, resultados robustos confirmaram

que a sinalização deste complexo envolvia aumento de cálcio citoplasmático que era mobilizado do retículo endoplasmático. Esta sinalização, diferentemente da via de ERK1/2 induzida por STI1, não depende da internalização de PrP^C. Entretanto, a ligação do peptídeo γ 1 de Ln dessensibiliza a sinalização de cálcio por PrP^C.

O uso de células CF10 e CF10 PrP3F4 foi ainda muito relevante na identificação do receptores mGluR1 e mGluR5 como participantes do complexo PrP^C- peptídeo γ 1 de Ln na sinalização e diferenciação neuronais (BERALDO et al. 2011 e dados do presente estudo).

O trabalho prosseguiu com a construção e expressão de vários mutantes de PrP^C associados a doenças por prion e que se encontram em sítios de ligação de PrP^C à STI1 e Ln. Vale lembrar que o PrP^C expresso em CF10 é murino e suas mutações equivalentes as existentes em PrP^C humano. Esta abordagem tornou o estudo mais seguro para nosso grupo, dada a existência de barreira entre espécies (camundongo-humanos) para a transmissão de doenças por prions (BERINGUE et al. 2008; SIGURDSON et al. 2010). Além disso, estas mutações equivalentes às humanas já foram expressas em camundongos e são capazes de promover patologias semelhantes às vistas em humanos, causando vacuolização, astrogliose e placas amiloides (TELLING et al. 1996; YANG et al. 2009).

As linhagens celulares derivadas de células CF10 expressando cada um dos mutantes foram selecionadas a partir da expressão de PrP^C na superfície celular por ensaios de citometria de fluxo e imunofluorescência. Este ponto foi muito importante neste trabalho uma vez que algumas destas

proteínas mutadas, como a PrP^C177N, podem ser retidas no retículo endoplasmático (PETERSEN et al. 1996; FIORITI et al. 2005). Isto comprometeria a análise das interações na superfície celular, destas moléculas de PrP^C com Ln e STI1, entretanto, os nossos dados apontam que todas as proteínas mutantes estão localizadas na superfície celular.

A proposta inicial era trabalhar com as mutações associadas com o polimorfismo metionina e valina no códon 128. Entretanto, ensaios de *western blotting* mostraram pouca expressão das proteínas 116V(128V), 177N(128V) e 199K(128V) nas linhagens de CF10 geradas inicialmente. Desta forma, decidimos prosseguir os ensaios apenas com os mutantes com o polimorfismo 128M.

Foi descrito que PrP^C murino com as mutações em 182A e 177N são mais resistentes ao tratamento com PK quando comparados com PrP^C tipo-selvagem, enquanto que as mutações nos códons 101L e 116V têm sensibilidade semelhante (HSIAO et al. 1990; HEGDE et al. 1999; KIACHOPOULOS et al. 2005; WATANABE et al. 2008). Nossos dados estão totalmente de acordo com estes. Adicionalmente, os mutantes 104L, 179I e 199K, gerados neste trabalho, também foram mais resistentes à digestão pela proteinase K que o PrP^C tipo-selvagem. O papel da alteração na resistência a proteinase K sobre a função de PrP^C não é conhecido. Entretanto, a resistência a proteinase K não deve interferir com as funções de PrP^C avaliadas neste trabalho uma vez que, nem todos os mutantes estudados são resistentes a proteinase K mas todos eles apresentam

comprometimento na sinalização por cálcio e na neuritogênese mediada por laminina.

Alguns artigos recentes têm estudado o papel de PrP^C no ciclo celular, particularmente em células tumorais. PrP^C promove proliferação em células de tumores gástricos (LIANG et al. 2006; PAN et al. 2006) e aumento da transição G1/S por um mecanismo que envolve regulação de ciclina D1 e CDK4 (LIANG et al. 2007). Além disso, anticorpos contra PrP^C são capazes de inibir o crescimento de xenotransplantes de tumores de cólon (MCEWAN et al. 2009). A proliferação de células de glioblastoma também é aumentada pela interação de PrP^C-ST11 (ERLICH et al. 2007). Interessantemente, PrP^C também induz proliferação em células tronco embrionárias humanas (LEE e BASKAKOV 2010) e dados do nosso grupo mostram efeitos similares em precursores neurais murinos (SANTOS et al. submetido).

Apesar do fenótipo de proliferação não estar presente em culturas primárias de neurônios, as células de origem neural CF10 são imortalizadas, o que permite, portanto, avaliar o papel da expressão de PrP^C tipo-selvagem e dos mutantes de PrP^C na sua proliferação. Nossos dados mostraram que a re-introdução de PrP^C tipo-selvagem em células CF10 aumenta sua proliferação se comparada aquela das células CF10. Interessantemente, todas as linhagens CF10 expressando PrP^C mutados apresentam proliferação semelhante à das células CF10, sugerindo que as moléculas de PrP^C mutado não são capazes de resgatar a modulação positiva de PrP^C

sobre o ciclo celular. Estes resultados caracterizam o nosso primeiro exemplo de perda de função dos mutantes de PrP^C.

Atualmente a correlação entre as doenças por prion e a homeostase de cálcio têm conduzido a questões que envolvem, além do papel da molécula infecciosa, o papel de PrP^C na modulação da sinalização dependente de cálcio e o prejuízo que a depleção de PrP^C pode causar em modelos celulares e animais.

Neurônios hipocampais isolados de animais *knockouts* para PrP^C apresentam um menor influxo de cálcio via canais de cálcio voltagem dependentes, quando despolarizados, do que aqueles oriundos de camundongos tipo-selvagem (FUHRMANN et al. 2006).

A infecção de PrP^{Sc} conduz a estresse de retículo endoplasmático por *unfolded protein response* (UPR), que libera cálcio aumentando a sua concentração citoplasmática. O aumento de cálcio citoplasmático nessas condições pode hiperativar calcineurina (CaN), uma proteína fosfatase do tipo 2B (PP2B) que pode se ligar a proteínas residentes na membrana mitocondrial para a liberação de citocromo C e assim conduzir a ativação de caspases, levando à apoptose. CaN pode ainda defosforilar *cAMP response element-binding* (CREB), um fator de transcrição com um importante papel na plasticidade neuronal e formação de memória a longo prazo (WANG et al. 1999; HETZ et al. 2003; MANSUY 2003). Interessantemente, camundongos infectados com prion tratados com um inibidor de CaN, durante a fase sintomática da doença, apresentaram redução da gravidade dos sintomas

clínicos e maior sobrevida em comparação com os controles (MUKHERJEE et al. 2010).

Dados apontam ainda que a expressão do mutante 177N(128M) em células N2a conduziu o acúmulo desse PrP^C mutado no RE, maior sensibilidade à estresse de retículo e diminuição dos estoques de cálcio nessa organela (TORRES et al. 2010).

Estudos *in vivo* também mostraram que, se comparados a camundongos tipo-selvagem, camundongos *knockout* para PrP^C apresentam maior mortalidade promovida por agentes convulsionantes como o análogo do receptor ionotrópico de glutamato, ácido caínico (WALZ et al. 1999) o qual pode ser bloqueado por inibidor do receptor *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA) (RANGEL et al. 2007). Os receptores NMDA são formados por um canal tetramérico (2 subunidade NR1 e 2 NR2) e podem ser ativados por glutamato sendo permeáveis tanto a sódio quanto a cálcio (MELDRUM 2000). Interessantemente a expressão de subtipos de receptores NMDA pode ser regulada por PrP^C (MAGLIO et al. 2004) e PrP^C pode se associar à subunidade NR2D destes receptores (KHOSRAVANI et al. 2008). Essa ligação promove uma inibição dos receptores NR2D prevenindo assim a despolarização e o influxo de Ca²⁺ (KHOSRAVANI et al. 2008) o que pode promover uma proteção contra agentes convulsionantes. Além disso, camundongos *knockout* para PrP^C têm uma diminuição dos potenciais de pós-hiperpolarização, o que aumenta o período refratário do potencial de ação do neurônio, aumentando também o seu tempo de resposta a um estímulo (COLLING et al. 1996; HERMS et al. 2001).

Esses achados nos conduziram a analisar, inicialmente, as concentrações basais de cálcio nas células usadas neste estudo. Nossos dados apontam que as concentrações basais de cálcio livre no citoplasma, bem como seu estoque no retículo endoplasmático é semelhante em células CF10, CF10 PrP3F4 ou CF10 que expressam os mutantes de PrP^C. Por outro lado, a resposta celular ao aumento de $[Ca^{+2}]_{ci}$ induzido pelo tratamento com o peptídeo da cadeia $\gamma 1$ de Ln mostrou-se significativamente menor em células CF10 expressando os mutantes de PrP^C do que nas CF10 PrP3F4. Indicando, portanto que respostas celulares ativadas pelo complexo PrP^C-Ln podem estar comprometidas nos mutantes de PrP^C.

A regulação fina na homeostase de cálcio é de fundamental importância para a vida celular, principalmente em neurônios, em que aumentos transitórios locais de cálcio direcionam para sinalizações altamente coordenadas como sinais eletroquímicos, crescimento de neuritos, sinaptogênese, transmissão sináptica, plasticidade e sobrevivência. Durante o envelhecimento e em condições patogênicas, desarranjos na homeostase de cálcio podem prejudicar diversas funções neuronais. Consequentemente, a desregulação de cálcio é reconhecidamente comum em várias doenças neurodegenerativas, tais como Alzheimer, Parkinson e Huntington, que compartilham aspectos comuns com as doenças por prions, incluindo agregação de proteínas, estresse oxidativo e perturbação no metabolismo celular (MATTSON 2007).

Nossos resultados (BERALDO et al. 2011, ANEXO 2), mostram que a interação de PrP^C com o peptídeo da cadeia $\gamma 1$ de laminina promove

ativação das vias de PKC e ERK1/2 que são, por sua vez, primariamente ativadas pelo aumento de Ca^{2+} intracelular, mediando a diferenciação neuronal. Deste modo, a diferença de sinalização de cálcio observada nos mutantes de PrP^C poderia ter impacto na diferenciação celular, um importante fenótipo para a plasticidade neuronal e formação de memórias (DE SILVA et al. 1998; YAMAUCHI 2005; FUHRMANN et al. 2006).

Foram então realizados experimentos para avaliar a diferenciação mediada pelo peptídeo $\gamma 1$ de Ln em células CF10, CF10 PrP3F4 e CF10 expressando os diferentes mutantes de PrP^C. Como observado em cultura primária de neurônios (GRANER et al. 2000; BERALDO et al. 2011) o peptídeo $\gamma 1$ de Ln induziu diferenciação em células que expressam PrP^C mas não naquelas derivadas de animais *knockout* desta proteína. Surpreendentemente, as células expressando todos os mutantes de PrP^C usados neste estudo não foram capazes de se diferenciar frente ao tratamento com o peptídeo $\gamma 1$ de Ln. Esta foi a primeira demonstração na literatura que proteínas mutantes de PrP^C perdem seu papel biológico relacionado a diferenciação neuronal.

Nossa hipótese inicial residia no fato de as funções associadas ao complexo PrP^C-Ln estariam comprometidas nos mutantes de PrP^C mapeados no sítio de ligação a Ln (177N, 179I e 182A). Entretanto, como todos os mutantes de PrP^C perdem sua função, outros mecanismos devem estar envolvidos no processo. Nossos dados mostram que o complexo PrP^C-Ln usa os receptores metabotrópicos de glutamato do tipo I, mGluR1 e mGluR5, para transduzir os sinais responsáveis pela diferenciação tanto em

neurônios de culturas primarias (BERALDO et al. 2011) quanto em CF10 PrP^C3F4 (dados deste trabalho). Sabemos que PrP^C interage diretamente com estes receptores (BERALDO et al. 2011), entretanto os sítios de ligação entre as duas moléculas não é conhecido. Portanto, poderíamos supor que mutações nos aminoácidos 101, 104, 116 e 199, fora do sítio de interação de PrP^C à Ln, poderiam mapear dentro do sítio de ligação de PrP^C aos receptores mGluR1/5. Outra possibilidade com relação à mutação 199K é o fato desta estar inserida numa região de α -hélice na molécula de PrP^C (BENNION e DAGGETT 2002) o que poderia alterar diretamente a estrutura da região adjacente onde está mapeado o sítio de ligação de PrP^C a Ln. Os próximos estudos do grupo estarão voltados em identificar os sítios de interação entre PrP^C e os receptores mGluR1/5.

É importante ainda apontar que cérebros de camundongos infectados com prions de origem bovina, assim como aqueles de humanos com CJD esporádica, apresentam comprometimento na via de mGluR1, fosfolipase C e PKC (RODRIGUEZ et al. 2005; RODRIGUEZ et al. 2006), indicando que o comprometimento das funções de PrP^C em TSE esporádicas pode também alterar as atividades relacionadas com a ligação de PrP^C a receptores mGluR1/5.

Em suma, este trabalho mostra que mutações em PrP^C comprometem a proliferação celular e as funções sinalizadoras do complexo PrP^C-Ln que promovem aumento na diferenciação neuronal. Estas alterações podem afetar diretamente a função sináptica e os processos cognitivos que são observados em paciente com doenças por prions.

Durante muitos anos o desenvolvimento de abordagens terapêuticas para as doenças por prions esteve concentrado no bloqueio da proteína nativa ou da conversão desta a PrP^{Sc}. Nenhum sucesso foi obtido e estas doenças continuam sem opção de tratamento. O entendimento dos mecanismos de perda de função de PrP^C é de extrema importância e pode representar uma alternativa importante para o desenho de novas e eficientes abordagens terapêuticas para estas doenças.

6 CONCLUSÕES

- I- Células CF10 e CF10 expressando PrP^C tipo-selvagem geradas neste trabalho representam um modelo robusto para o estudo das funções de PrP^C em células neurais.
- II- Todas as funções descritas para as interação de PrP^C-Ln e PrP^C-STI1 foram reconstituídas nas células CF10 que expressam PrP^C tipo-selvagem.
- III- A expressão de mutantes de PrP^C nestas células confirma resultados da literatura quanto a resistência destes a digestão por proteinase K.
- IV- A resistência a proteinase K não está diretamente relacionada à perda de função de PrP^C uma vez que mutantes de PrP^C sensíveis a esta protease também perdem sua função.
- V- Os mutantes de PrP^C (101L, 104L, 116V, 177N, 179I, 182A e 199K) perdem a atividade sobre o controle positivo da proliferação celular.
- VI- Os mutantes de PrP^C (101L, 104L, 116V, 177N, 179I, 182A e 199K) têm uma diminuição na sinalização por cálcio mediada por sua interação com o peptídeo γ 1 de Ln.
- VII- Os mutantes de PrP^C (101L, 104L, 116V, 177N, 179I, 182A e 199K) perdem a atividade sobre a neuritogênese mediada pela interação com o peptídeo γ 1 de laminina.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguzzi A, Polymenidou M. Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. **Cell** 2004; 116:313-27.

Aguzzi A, Weissmann C. Spongiform encephalopathies: a suspicious signature. **Nature** 1996; 383:666-7.

Ashok A, Hegde RS. Selective processing and metabolism of disease-causing mutant prion proteins. **PLoS Pathog** 2009; 5:e1000479-

Azzalin A, Ferrara V, Arias A, et al. Interaction between the cellular prion (Pr^{PC}) and the 2P domain K⁺ channel TREK-1 protein. **Biochem Biophys Res. Commun** 2006; 346:108-15.

Bainbridge J, Walker KB. The normal cellular form of prion protein modulates T cell responses. **Immunol Lett** 2005; 96:147-50.

Basler K, Oesch B, Scott M, et al. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. **Cell** 1986; 46:417-28.

Baumann F, Tolnay M, Brabeck C, et al. Lethal recessive myelin toxicity of prion protein lacking its central domain. **EMBO J** 2007; 26:538-47.

Bennett RL, Blalock WL, Abtahi DM, Pan Y, Moyer SA, May WS. RAX, the PKR activator, sensitizes cells to inflammatory cytokines, serum withdrawal, chemotherapy, and viral infection. **Blood** 2006; 108:821-9.

Bennion BJ, Daggett V. Protein conformation and diagnostic tests: the prion protein. **Clin Chem** 2002; 48:2105-14.

Beraldo FH, Arantes CP, Santos TG, et al. Metabotropic glutamate receptors transduce signals for neurite outgrowth after binding of the prion protein to laminin gamma1 chain. **FASEB J** 2011; 25:265-79.

Beraldo FH, Arantes CP, Santos TG, et al. Role of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in calcium signaling induced by prion protein interaction with stress-inducible protein 1. **J Biol Chem** 2010; 285:36542-50.

Beringue V, Herzog L, Reine F, et al. Transmission of atypical bovine prions to mice transgenic for human prion protein. **Emerg Infect Dis** 2008; 14:1898-901.

Berridge MJ. Unlocking the secrets of cell signaling. **Annu Rev Physiol** 2005; 67:1-21.

Bertram L, Tanzi RE. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. **J Clin Invest** 2005; 115:1449-57.

Booth DR, Sunde M, Bellotti V, et al. Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis. **Nature** 1997; 385:787-93.

Bounhar Y, Zhang Y, Goodyer CG, LeBlanc A. Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. **J Biol Chem** 2001; 276:39145-9.

Bredemeyer AJ, Carrigan PE, Fehniger TA, Smith DF, Ley TJ. Hop cleavage and function in granzyme B-induced apoptosis. **J Biol Chem** 2006; 281:37130-41.

Brini M, Miuzzo M, Pierobon N, Negro A, Sorgato MC. The prion protein and its paralogue Doppel affect calcium signaling in Chinese hamster ovary cells. **Mol Biol Cell** 2005; 16:2799-808.

Brown DR. Prion and prejudice: normal protein and the synapse. **Trends Neurosci** 2001; 24:85-90.

Brown DR, Nicholas RS, Canevari L. Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. **J Neurosci Res** 2002; 67:211-24.

Brown DR, Qin K, Herms JW, et al. The cellular prion protein binds copper in vivo. **Nature** 1997; 390:684-7.

Brown DR, Schulz-Schaeffer WJ, Schmidt B, Kretzschmar HA. Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. **Exp Neurol** 1997; 146:104-12.

Brown DR, Wong BS, Hafiz F, Clive C, Haswell SJ, Jones IM. Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. **Biochem J** 1999; 344 Pt 1:1-5.

Brown P, Preece M, Brandel JP, et al. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease at the millennium. **Neurology** 2000; 55:1075-81.

Budka H, Aguzzi A, Brown P, et al. Neuropathological diagnostic criteria for Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (prion diseases). **Brain Pathol** 1995; 5:459-66.

Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, et al. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. **Cell** 1993; 73:1339-47.

Bueler H, Fischer M, Lang Y, et al. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell- surface PrP protein. **Nature** 1992; 356:577-82.

Bugiani O, Giaccone G, Piccardo P, Morbin M, Tagliavini F, Ghetti B. Neuropathology of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. **Microsc Res Tech** 2000; 50:10-5.

Caetano FA, Lopes MH, Hajj GN, et al. Endocytosis of prion protein is required for ERK1/2 signaling induced by stress-inducible protein 1. **J Neurosci** 2008; 28:6691-702.

Calvert CM, Sanders D. Inositol trisphosphate-dependent and-independent Ca²⁺ mobilization pathways at the vacuolar membrane of *Candida albicans*. **J Biol Chem** 1995; 270:7272-80.

Campana V, Sarnataro D, Fasano C, Casanova P, Paladino S, 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** 2006; 119:433-42.

Canet D, Last AM, Tito P, et al. Local cooperativity in the unfolding of an amyloidogenic variant of human lysozyme. **Nat Struct Biol** 2002; 9:308-15.

Carlson GA, Westaway D, DeArmond SJ, Peterson-Torchia M, Prusiner SB. Primary structure of prion protein may modify scrapie isolate properties. **Proc Natl Acad Sci U. S. A** 1989; 86:7475-9.

Caughey B, Race RE, Ernst D, Buchmeier MJ, Chesebro B. Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. **J Virol** 1989; 63:175-81.

Caughey B, Raymond GJ. Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells. **J Virol** 1993; 67:643-50.

Chang HC, Nathan DF, Lindquist S. In vivo analysis of the Hsp90 cochaperone Sti1 (p60). **Mol Cell Biol** 1997; 17:318-25.

Chen JJ. Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2alpha kinase: relevance to anemias. **Blood** 2007; 109:2693-9.

Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. **EMBO J** 2002; 21:3317-26.

Chiesa R, Harris DA. Fishing for prion protein function. **PLoS Biol** 2009; 7:e75

Cohen FE, Pan KM, Huang Z, Baldwin M, Fletterick RJ, Prusiner SB. Structural clues to prion replication. **Science** 1994; 264:530-1.

Coitinho AS, Freitas AR, Lopes MH, et al. The interaction between prion protein and laminin modulates memory consolidation. **Eur J Neurosci** 2006; 24:3255-64.

Colling SB, Collinge J, Jefferys JG. Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca(2+)-activated K⁺ currents. **Neurosci Lett** 1996; 209:49-52.

Collinge J. Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. **Annu Rev Neurosci** 2001; 24:519-50.

Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, et al. Prion protein is necessary for normal synaptic function. **Nature** 1994; 370:295-7.

Criado JR, Sanchez-Alavez M, Conti B, et al. Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons. **Neurobiol Dis** 2005; 19:255-65.

de Almeida CJ, Chiarini LB, da Silva JP, PM ES, Martins MA, Linden R. The cellular prion protein modulates phagocytosis and inflammatory response. **J Leukoc Biol** 2005; 77:238-46.

de Silva HA, Aronson JK, Grahame-Smith DG, Jobst KA, Smith AD. Abnormal function of potassium channels in platelets of patients with Alzheimer's disease. **Lancet** 1998; 352:1590-3.

DeArmond SJ, Sanchez H, Yehiely F, et al. Selective neuronal targeting in prion disease. **Neuron** 1997; 19:1337-48.

Deslys JP, Marce D, Dormont D. Similar genetic susceptibility in iatrogenic and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. **J Gen Virol** 1994; 75:23-7.

Dever TE. Gene-specific regulation by general translation factors. **Cell** 2002; 108:545-56.

Doh-ura K, Kitamoto T, Sakaki Y, Tateishi J. CJD discrepancy. **Nature** 1991; 353:801-2.

Dorandeu A, Wingertsmann L, Chretien F, et al. Neuronal apoptosis in fatal familial insomnia. **Brain Pathol** 1998; 8:531-7.

Erllich RB, Kahn SA, Lima FR, et al. STI1 promotes glioma proliferation through MAPK and PI3K pathways. **Glia** 2007; 55:1690-8.

Fioriti L, Dossena S, Stewart LR, et al. Cytosolic prion protein (PrP) is not toxic in N2a cells and primary neurons expressing pathogenic PrP mutations. **J Biol Chem** 2005; 280:11320-8.

Fivaz M, Vilbois F, Thurnheer S, et al. Differential sorting and fate of endocytosed GPI-anchored proteins. **EMBO J** 2002; 21:3989-4000.

Fournier JG, Escaig-Haye F, Billette DV, et al. Distribution and submicroscopic immunogold localization of cellular prion protein (PrP_c) in extracerebral tissues. **Cell Tissue Res** 1998; 292:77-84.

Fuhrmann M, Bittner T, Mitteregger G, et al. Loss of the cellular prion protein affects the Ca²⁺ homeostasis in hippocampal CA1 neurons. **J Neurochem** 2006; 98:1876-85.

Gabriel JM, Oesch B, Kretzschmar H, Scott M, Prusiner SB. Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. **Proc Natl Acad Sci U. S. A** 1992; 89:9097-101.

Gambetti P, Kong Q, Zou W, Parchi P, Chen SG. Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. **Br Med Bull** 2003; 66:213-39.

Glatzel M, Ott PM, Linder T, et al. Human prion diseases: epidemiology and integrated risk assessment. **Lancet Neurol** 2003; 2:757-63.

Glatzel M, Stoeck K, Seeger H, Luhrs T, Aguzzi A. Human prion diseases: molecular and clinical aspects. **Arch Neurol** 2005; 62:545-52.

Goggin K, Beaudoin S, Grenier C, Brown AA, Roucou X. Prion protein aggresomes are poly(A)⁺ ribonucleoprotein complexes that induce a PKR-mediated deficient cell stress response. **Biochim Biophys Acta** 2008; 1783:479-91.

Goldfarb LG, Petersen RB, Tabaton M, et al. Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. **Science** 1992; 258:806-8.

Gorodinsky A, Harris DA. Glycolipid-anchored proteins in neuroblastoma cells form detergent-resistant complexes without caveolin. **J Cell Biol** 1995; 129:619-27.

Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, et al. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. **Brain Res Mol Brain Res** 2000; 76:85-92.

Hafner F. Cytosensor Microphysiometer: technology and recent applications. **Biosens Bioelectron** 2000; 15:149-58.

Hajj GNM, Lopes MH, Mercadante AF, et al. Cellular prion protein interaction with vitronectin supports axonal growth and is compensated by integrins. **J Cell Sci** 2007; 120:1915-26.

Halfmann R, Alberti S, Lindquist S. Prions, protein homeostasis, and phenotypic diversity. **Trends Cell Biol** 2010; 20:125-33.

Halfmann R, Lindquist S. Epigenetics in the extreme: prions and the inheritance of environmentally acquired traits. **Science** 2010; 330:629-32.

Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. **Mol Cell** 2000; 5:897-904.

Harris DA. Cellular biology of prion diseases. **Clin Microbiol Rev** 1999; 12:429-44.

Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. **Genes Dev** 2004; 18:1926-45.

Hegde RS, Tremblay P, Groth D, DeArmond SJ, Prusiner SB, Lingappa VR. Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration. **Nature** 1999; 402:822-6.

Herms JW, Korte S, Gall S, Schneider I, Dunker S, Kretzschmar HA. Altered intracellular calcium homeostasis in cerebellar granule cells of prion protein-deficient mice. **J Neurochem** 2000; 75:1487-92.

Herms JW, Madlung A, Brown DR, Kretzschmar HA. Increase of intracellular free Ca²⁺ in microglia activated by prion protein fragment. **Glia** 1997; 21:253-7.

Herms JW, Tings T, Dunker S, Kretzschmar HA. Prion protein affects Ca²⁺-activated K⁺ currents in cerebellar purkinje cells. **Neurobiol Dis** 2001; 8:324-30.

Hetz C, Maundrell K, Soto C. Is loss of function of the prion protein the cause of prion disorders? **Trends Mol Med** 2003; 9:237-43.

Hetz C, Maundrell K, Soto C. Is loss of function of the prion protein the cause of prion disorders? **Trends Mol Med** 2003; 9:237-43.

Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, et al. The same prion strain causes vCJD and BSE. **Nature** 1997; 389:448-50, 526.

Horiuchi M, Yamazaki N, Ikeda T, Ishiguro N, Shinagawa M. A cellular form of prion protein (PrPC) exists in many non-neuronal tissues of sheep. **J Gen Virol** 1995; 76:2583-2587.

Hornshaw MP, McDermott JR, Candy JM, Lakey JH. Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: structural studies using synthetic peptides. **Biochem Biophys Res Commun** 1995; 214:993-9.

Hsiao KK, Scott M, Foster D, Groth DF, DeArmond SJ, Prusiner SB. Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein. **Science** 1990; 250:1587-90.

Huang Z, Gabriel JM, Baldwin MA, Fletterick RJ, Prusiner SB, Cohen FE. Proposed three-dimensional structure for the cellular prion protein. **Proc Natl Acad Sci U. S. A** 1994; 91:7139-43.

Invitrogen life technologies. Available from:
<URL:<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/V79020?ICID=search-product>> [2011 fev 17]

Kang SW, Rane NS, Kim SJ, Garrison JL, Taunton J, Hegde RS. Substrate-specific translocational attenuation during ER stress defines a pre-emptive quality control pathway. **Cell** 2006; 127:999-1013.

Kevil CG, De BA, Payne DK, Coe LL, Laroux FS, Alexander JS. Translational regulation of vascular permeability factor by eukaryotic initiation factor 4E: implications for tumor angiogenesis. **Int J Cancer** 1996; 65:785-90.

Khosravani H, Zhang Y, Tsutsui S, et al. Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. **J Gen Physiol** 2008; 131:i5.

Khosravani H, Zhang Y, Tsutsui S, et al. Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. **J Cell Biol** 2008; 181:551-65.

Khurana R, Gillespie JR, Talapatra A, et al. Partially folded intermediates as critical precursors of light chain amyloid fibrils and amorphous aggregates. **Biochemistry** 2001; 40:3525-35.

Kiachopoulos S, Bracher A, Winklhofer KF, Tatzelt J. Pathogenic mutations located in the hydrophobic core of the prion protein interfere with folding and attachment of the glycosylphosphatidylinositol anchor. **J Biol Chem** 2005; 280:9320-9.

Kitamoto T, Ohta M, Doh-ura K, Hitoshi S, Terao Y, Tateishi J. Novel missense variants of prion protein in Creutzfeldt-Jakob disease or Gerstmann-Straussler syndrome. **Biochem Biophys Res Commun** 1993; 191:709-14.

Klamt F, Dal-Pizzol F, Conte da Frola ML JR, et al. Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. **Free Radic Biol Med** 2001; 30:1137-44.

Kovacs GG, Trabattoni G, Hainfellner JA, Ironside JW, Knight RS, Budka H. Mutations of the prion protein gene phenotypic spectrum. **J Neurol** 2002; 249:1567-82.

Koyasu S. The role of PI3K in immune cells. **Nat Immunol** 2003; 4:313-9.

Krebs B, Wiebelitz A, Balitzki-Korte B, et al. Cellular prion protein modulates the intracellular calcium response to hydrogen peroxide. **J Neurochem** 2007; 100:358-67.

Kristensson K, Feuerstein B, Taraboulos A, Hyun WC, Prusiner SB, DeArmond SJ. Scrapie prions alter receptor-mediated calcium responses in cultured cells. **Neurology** 1993; 43:2335-41.

Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T, et al. Prions prevent neuronal cell-line death. **Nature** 1999; 400:225-6.

Ladogana A, Puopolo M, Croes EA, et al. Mortality from Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders in Europe, Australia, and Canada. **Neurology** 2005; 64:1586-91.

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

Lee YJ, Baskakov IV. Treatment with normal prion protein delays differentiation and helps to maintain high proliferation activity in human embryonic stem cells. **J Neurochem** 2010; 114:362-73.

Li A, Christensen HM, Stewart LR, Roth KA, Chiesa R, Harris DA. Neonatal lethality in transgenic mice expressing prion protein with a deletion of residues 105-125. **EMBO J** 2007; 26:548-58.

Liang J, Pan Y, Zhang D, et al. Cellular prion protein promotes proliferation and G1/S transition of human gastric cancer cells SGC7901 and AGS. **FASEB J** 2007; 21:2247-56.

Liang J, Pan YL, Ning XX, et al. Overexpression of PrPC and its antiapoptosis function in gastric cancer. **Tumour Biol** 2006; 27:84-91.

Liemann S, Glockshuber R. Influence of amino acid substitutions related to inherited human prion diseases on the thermodynamic stability of the cellular prion protein. **Biochemistry** 1999; 38:3258-67.

Lima FR, Arantes CP, Muras AG, Nomizo R, Brentani RR, Martins VR. Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. **J Neurochem** 2007; 103:2164-76.

Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR. Physiology of the prion protein. **Physiol Rev** 2008; 88:673-28.

Liu D, Si H, Reynolds KA, Zhen W, Jia Z, Dillon JS. Dehydroepiandrosterone protects vascular endothelial cells against apoptosis through a Galphai protein-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and regulation of antiapoptotic Bcl-2 expression. **Endocrinology** 2007; 148:3068-76.

Lopes MH, Hajj GN, Muras AG, et al. Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. **J Neurosci** 2005; 25:11330-9.

Luckenbill-Edds L. Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth. **Brain Res Brain Res Rev** 1997; 23:1-27.

Ma J, Lindquist S. Conversion of PrP to a self-perpetuating PrP^{Sc}-like conformation in the cytosol. **Science** 2002; 298:1785-8.

Magalhaes AC, Silva JA, Lee KS, et al. Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. **J Biol Chem** 2002; 277:33311-8.

Maglio LE, Perez MF, Martins VR, Brentani RR, Ramirez OA. Hippocampal synaptic plasticity in mice devoid of cellular prion protein. **Brain Res Mol Brain Res** 2004; 131:58-64.

Maglio LE, Perez MF, Martins VR, Brentani RR, Ramirez OA. Hippocampal synaptic plasticity in mice devoid of cellular prion protein. **Brain Res Mol Brain Res** 2004; 131:58-64.

Manetto V, Medori R, Cortelli P, et al. Fatal familial insomnia: clinical and pathologic study of five new cases. **Neurology** 1992; 42:312-9.

Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J. 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. **Mol Neurobiol** 1994; 8:121-7.

Mansuy IM. Calcineurin in memory and bidirectional plasticity. **Biochem Biophys Res Commun** 2003; 311:1195-208.

Martinez A, Hinz JM, Gomez L, et al. Differential expression of TP53 associated genes in Fanconi anemia cells after mitomycin C and hydroxyurea treatment. **Mutat Res** 2008; 656:1-7.

Martins VR, Beraldo FH, Hajj GN, et al. Prion protein: orchestrating neurotrophic activities. **Curr Issues Mol Biol** 2010; 12:63-86.

Martins VR, Linden R, Prado MA, et al. Cellular prion protein: on the road for functions. **FEBS Lett** 2002; 512:25-8.

Mattson MP. Calcium and neurodegeneration. **Aging Cell** 2007; 6:337-50.

McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, et al. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. **Adv Enzyme Regul** 2006; 46:249-79.

McEwan JF, Windsor ML, Cullis-Hill SD. Antibodies to prion protein inhibit human colon cancer cell growth. **Tumour Biol** 2009; 30:141-7.

McLennan NF, Brennan PM, McNeill A, et al. Prion protein accumulation and neuroprotection in hypoxic brain damage. **Am J Pathol** 2004; 165:227-35.

Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J Nutr** 2000; 130:1007S-15S.

Meyer RK, McKinley MP, Bowman KA, Braunfeld MB, Barry RA, Prusiner SB. Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. **Proc Natl Acad Sci U. S. A** 1986; 83 - 2310-2314.

Morris RJ, Parkyn CJ, Jen A. Traffic of prion protein between different compartments on the neuronal surface, and the propagation of prion disease. **FEBS Lett** 2006; 580:5565-71.

Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, et al. Signal transduction through prion protein. **Science** 2000; 289:1925-8.

Mukherjee A, Morales-Scheihing D, Gonzalez-Romero D, Green K, Taglialatela G, Soto C. Calcineurin inhibition at the clinical phase of prion disease reduces neurodegeneration, improves behavioral alterations and increases animal survival. **PLoS Pathog** 2010; 6: pii: e1001138.

Munnik T, Irvine RF, Musgrave A. Phospholipid signalling in plants. **Biochim Biophys Acta** 1998; 1389:222-72.

Muramoto T, DeArmond SJ, Scott M, Telling GC, Cohen FE, Prusiner SB. Heritable disorder resembling neuronal storage disease in mice expressing prion protein with deletion of an alpha-helix. **Nat Med** 1997; 3:750-5.

[NCBI] National Center Biothecnology Information. **Nucleotide: NM_011170**. Avaliable from: <URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide>> [2008 jan 07]

Nitrini R, Rosemberg S, Passos-Bueno MR, et al. Familial spongiform encephalopathy associated with a novel prion protein gene mutation. **Ann Neurol** 1997; 42:138-46.

Oesch B, Westaway D, Walchli M, et al A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. **Cell** 1985; 40:735-46.

Oliveira MD, Souza LB, Pinto LP, Freitas RA. [Immunohistochemical study of components of the basement membrane in odontogenic cysts]. **Pesqui Odontol Bras** 2002; 16:157-62.

Orr AW, Pedraza CE, Pallero MA, et al. Low density lipoprotein receptor-related protein is a calreticulin coreceptor that signals focal adhesion disassembly. **J Cell Biol** 2003; 161:1179-89.

Orsi A, Fioriti L, Chiesa R, Sitia R. Conditions of endoplasmic reticulum stress favor the accumulation of cytosolic prion protein. **J Biol Chem** 2006; 281:30431-8.

Pan Y, Zhao L, Liang J, et al. Cellular prion protein promotes invasion and metastasis of gastric cancer. **FASEB J** 2006; 20:1886-8.

Paquet C, Bose A, Polivka M, et al. Neuronal phosphorylated RNA-dependent protein kinase in Creutzfeldt-Jakob disease. **J Neuropathol Exp Neurol** 2009; 68:190-8.

Parce JW, Owicki JC, Kercso KM, et al. Detection of cell-affecting agents with a silicon biosensor. **Science** 1989; 246:243-7.

Parkyn CJ, Vermeulen EG, Mootosamy RC, et al. LRP1 controls biosynthetic and endocytic trafficking of neuronal prion protein. **J Cell Sci** 2008; 121:773-83.

Paroo Z, Ye X, Chen S, Liu Q. Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling. **Cell** 2009; 139:112-2.

Passos AP, Garcia CR. Inositol 1,4,5-trisphosphate induced Ca²⁺ release from chloroquine-sensitive and -insensitive intracellular stores in the intraerythrocytic stage of the malaria parasite *P. chabaudi*. **Biochem Biophys Res Commun** 1998; 245:155-60.

Pastrana MA, Sajnani G, Onisko B, Castilla J, Morales R, Soto C, Requena JR. Isolation and characterization of a proteinase K-sensitive PrP^{Sc} fraction. **Biochemistry** 2006; 45:15710-7.

Pattison IH. Scrapie in the welsh mountain breed of sheep and its experimental transmission to goats. **Vet Rec** 1965; 77:1388-90.

Paulsson M, Aumailley M, Deutzmann R, Timpl R, Beck K, Engel J. Laminin-nidogen complex. Extraction with chelating agents and structural characterization. **Eur J Biochem** 1987; 166:11-19.

Peters PJ, Mironov A, Jr., Peretz D, et al. Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. **J Cell Biol** 2003; 162:703-17.

Petersen RB, Parchi P, Richardson SL, Urig CB, Gambetti P. Effect of the D178N mutation and the codon 129 polymorphism on the metabolism of the prion protein. **J Biol Chem** 1996; 271:12661-8.

Prado MA, Alves-Silva J, Magalhaes AC, et al. PrPc on the road: trafficking of the cellular prion protein. **J Neurochem** 2004; 88:769-781.

Preissner KT. Structure and biological role of vitronectin. **Annu Rev Cell Biol** 1991; 7:275-310.

Prestori F, Rossi P, Bearzatto B, et al. Altered neuron excitability and synaptic plasticity in the cerebellar granular layer of juvenile prion protein knock-out mice with impaired motor control. **J Neurosci** 2008; 28:7091-3.

Priola SA, Caughey B. Inhibition of scrapie-associated PrP accumulation. Probing the role of glycosaminoglycans in amyloidogenesis. **Mol Neurobiol** 1994; 8:113-20.

Prusiner SB. Molecular biology of prion diseases. **Science** 1991; 252:1515-22.

Prusiner SB. Prion diseases and the BSE crisis. **Science** 1997; 278:245-51.

Prusiner SB. Prions. **Proc Natl Acad Sci U. S. A** 1998; 95:13363-83.

Rangel A, Burgaya F, Gavin R, Soriano E, Aguzzi A, Del Rio JA. Enhanced susceptibility of Prnp-deficient mice to kainate-induced seizures, neuronal apoptosis, and death: Role of AMPA/kainate receptors. **J Neurosci Res** 2007; 85:2741-55.

Rangel A, Burgaya F, Gavin R, Soriano E, Aguzzi A, Del Rio JA. Enhanced susceptibility of Prnp-deficient mice to kainate-induced seizures, neuronal apoptosis, and death: Role of AMPA/kainate receptors. **J Neurosci Res** 2007; 85:2741-55.

Richardson EP, Jr., Masters CL. The nosology of Creutzfeldt-Jakob disease and conditions related to the accumulation of PrPCJD in the nervous system. **Brain Pathol** 1995; 5:33-41.

Richter JD, Sonenberg N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. **Nature** 2005; 433:477-80.

Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. **Curr Opin Cell Biol** 1997; 9:180-6.

Rockwell PL, Storey BT. Determination of the intracellular dissociation constant, $K(D)$, of the fluo-3. $Ca(2+)$ complex in mouse sperm for use in estimating intracellular $Ca(2+)$ concentrations. **Mol Reprod Dev** 1999; 54:418-28.

Rodriguez A, Freixes M, Dalfo E, Martin M, Puig B, Ferrer I. Metabotropic glutamate receptor/phospholipase C pathway: a vulnerable target to Creutzfeldt-Jakob disease in the cerebral cortex. **Neuroscience** 2005; 131:825-32.

Rodriguez A, Martin M, Albasanz JL, et al. Group I mGluR signaling in BSE-infected bovine-PrP transgenic mice. **Neurosci Lett** 2006; 410:115-20.

Roffe M, Beraldo FH, Bester R, et al. Prion protein interaction with stress-inducible protein 1 enhances neuronal protein synthesis via mTOR. **Proc Natl Acad Sci U. S. A** 2010; 107:13147-52.

Ron D. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. **J Clin Invest** 2002; 110:1383-8.

Rosenwald IB, Lazaris-Karatzas A, Sonenberg N, Schmidt EV. Elevated levels of cyclin D1 protein in response to increased expression of eukaryotic initiation factor 4E. **Mol Cell Biol** 1993; 13:7358-63.

[RSC] Advancing the Chemical Sciences. **Battle with the prions**. Available from: <URL:<http://www.rsc.org/chemistryworld/Issues/2005/October/prions.asp>> [2011 jan 12]

Rudd PM, Merry AH, Wormald MR, Dwek RA. Glycosylation and prion protein. **Curr Opin Struct Biol** 2002; 12:578-86.

Sabatini DM. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. **Nat Rev Cancer** 2006; 6:729-34.

Sales N, Hassig R, Rodolfo K, et al. Developmental expression of the cellular prion protein in elongating axons. **Eur J Neurosci** 2002; 15:1163-77.

Santuccione A, Sytnyk V, Leshchyns'ka I, Schachner M. Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. **J Cell Biol** 2005; 169:341-54.

Schaeffer HJ, Weber MJ. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. **Mol Cell Biol** 1999; 19:2435-44.

Schneider P. Über die Bedeutung zellwandfreier Bakterienformen (CWD) auch in Bezug auf (Para-) Tuberkulose, Morbus Crohn und BSE. **Elektronische Bücher (Ebooks)**. [serial online]. 2000. Available from: <URL:<http://www.pferdmedizin.com/cwd>> [2011 jan 12]

Schumacher RJ, Hurst R, Sullivan WP, McMahon NJ, Toft DO, Matts RL. ATP-dependent chaperoning activity of reticulocyte lysate. **J Biol Chem** 1994; 269:9493-9.

Shaked GM, Meiner Z, Avraham I, Taraboulos A, Gabizon R. Reconstitution of prion infectivity from solubilized protease-resistant PrP and nonprotein components of prion rods. **J Biol Chem** 2001; 276:14324-8.

Shors TJ. Memory traces of trace memories: neurogenesis, synaptogenesis and awareness. **Trends Neurosci** 2004; 27:250-6.

Shyng SL, Heuser JE, Harris DA. A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. **J Cell Biol** 1994; 125:1239-50.

Shyu WC, Lin SZ, Chiang MF, et al. Overexpression of PrPC by adenovirus-mediated gene targeting reduces ischemic injury in a stroke rat model. **J Neurosci** 2005; 25:8967-77.

Sigurdson CJ, Nilsson KP, Hornemann S, et al. A molecular switch controls interspecies prion disease transmission in mice. **J Clin Invest** 2010; 120:2590-9.

Singh A, Mohan ML, Isaac AO, et al. Prion protein modulates cellular iron uptake: a novel function with implications for prion disease pathogenesis. **PLoS One** 2009; 4:e4468.

Smith DF, Sullivan WP, Marion TN, et al. Identification of a 60-kilodalton stress-related protein, p60, which interacts with hsp90 and hsp70. **Mol Cell Biol** 1993; 13:869-76.

Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. **Cell** 1987; 51:229-40.

Stockel J, Safar J, Wallace AC, Cohen FE, Prusiner SB. Prion protein selectively binds copper(II) ions. **Biochemistry** 1998; 37:7185-93.

Stoica L, Zhu PJ, Huang W, Zhou H, Kozma SC, Costa-Mattioli M. Selective pharmacogenetic inhibition of mammalian target of Rapamycin complex I (mTORC1) blocks long-term synaptic plasticity and memory storage. **Proc Natl Acad Sci U. S. A** 2011;

Sunyach C, Jen A, Deng J, et al. The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. **EMBO J** 2003; 22:3591-601.

Supattapone S, Bosque P, Muramoto T, et al. Prion protein of 106 residues creates an artificial transmission barrier for prion replication in transgenic mice. **Cell** 1999; 96:869-78.

Taylor DR e Hooper NM. The prion protein and lipid rafts. **Mol Membr Biol** 2006; 23:89-99.

Taylor DR, Watt NT, Perera WS, Hooper NM. Assigning functions to distinct regions of the N-terminus of the prion protein that are involved in its copper-stimulated, clathrin-dependent endocytosis. **J Cell Sci** 2005; 118:5141-53.

Telling GC, Haga T, Torchia M, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB. Interactions between wild-type and mutant prion proteins modulate neurodegeneration in transgenic mice. **Genes Dev** 1996; 10:1736-50.

Telling GC, Scott M, Hsiao KK, et al. Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from humans to transgenic mice expressing chimeric human-mouse prion protein. **Proc Natl Acad Sci U. S. A** 1994; 91:9936-40.

Telling GC, Scott M, Mastrianni J, et al. Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. **Cell** 1995; 83:79-90.

Tobler I, Deboer T, Fischer M. Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice. **J Neurosci** 1997; 17:1869-79.

Tobler I, Gaus SE, Deboer T, et al. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. **Nature** 1996; 380:639-642.

Torres M, Castillo K, Armisen R, Stutzin A, Soto C, Hetz C. Prion protein misfolding affects calcium homeostasis and sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress. **PLoS One** 2010; 5:e15658.

Tribl GG, Strasser G, Zeitlhofer J, et al. Sequential MRI in a case of Creutzfeldt-Jakob disease. **Neuroradiology** 2002; 44:223-6.

Tsai MT, Su YC, Chen YH, Chen CH. Lack of evidence to support the association of the human prion gene with schizophrenia. **Mol Psychiatry** 2001; 6:74-8.

Tuite MF, Serio TR. The prion hypothesis: from biological anomaly to basic regulatory mechanism. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2010; 11:823-33.

van der Kamp MW, Daggett V. The consequences of pathogenic mutations to the human prion protein. **Protein Eng Des Sel** 2009; 22:461-8.

van der Kamp MW, Daggett V. Pathogenic mutations in the hydrophobic core of the human prion protein can promote structural instability and misfolding. **J Mol Biol** 2010; 404:732-48.

Vassallo N, Herms J. Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. **J Neurochem** 2003; 86:538-44.

Vassallo N, Herms J, Behrens C, et al. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by cellular prion protein and its role in cell survival. **Biochem Biophys Res Commun** 2005; 332:75-82.

Venneti S. Prion diseases. **Clin Lab Med** 2010; 30:293-309.

Venstrom KA, Reichardt LF. Extracellular matrix. 2: Role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system. **FASEB J** 1993; 7:996-1003.

Vossler MR, Yao H, York RD, Pan MG, Rim CS, Stork PJ. cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. **Cell** 1997; 89:73-82.

Walz R, Amaral OB, Rockenbach IC, Roesler R, Izquierdo I, Cavalheiro EA, Martins VR, Brentani RR. Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. **Epilepsia** 1999; 40:1679-82.

Wang JM, Chao JR, Chen W, Kuo ML, Yen JJ, Yang-Yen HF. The antiapoptotic gene *mcl-1* is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. **Mol Cell Biol** 1999; 19:6195-206.

Warner RG, Hundt C, Weiss S, Turnbull JE. Identification of the heparan sulfate binding sites in the cellular prion protein. **J Biol Chem** 2002; 277:18421-30.

Watanabe Y, Hiraoka W, Shimoyama Y, Horiuchi M, Kuwabara M, Inanami O. Instability of familial spongiform encephalopathy-related prion mutants. **Biochem Biophys Res Commun** 2008; 366:244-9.

Weise J, Crome O, Sandau R, Schulz-Schaeffer W, Bahr M, Zerr I. Upregulation of cellular prion protein (PrP^c) after focal cerebral ischemia and influence of lesion severity. **Neurosci Lett** 2004; 372:146-50.

Weise J, Sandau R, Schwarting S, et al. Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt activation, enhanced postischemic caspase-3 activation, and exacerbation of ischemic brain injury. **Stroke** 2006; 37:1296-1300.

Wek RC, Cavener DR. Translational control and the unfolded protein response. **Antioxid Redox Signal** 2007; 9:2357-71.

Westergard L, Christensen HM, Harris DA. The cellular prion protein (PrP^C): its physiological function and role in disease. **Biochim Biophys Acta** 2007; 1772:629-44.

Whatley SA, Powell JF, Politopoulou G, Campbell IC, Brammer MJ, Percy NS. Regulation of intracellular free calcium levels by the cellular prion protein. **Neuroreport** 1995; 6:2333-7.

Wickner RB, Edskes HK, Ross ED, Pierce MM, Shewmaker F, Baxa U, Brachmann A. Prions of yeast are genes made of protein: amyloids and enzymes. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol** 2004; 69:489-96.

Wickner RB, Edskes HK, Shewmaker F, Nakayashiki T, Engel A, McCann L, Kryndushkin D. Yeast prions: evolution of the prion concept. **Prion** 2007; 1:94-100.

Windl O, Giese A, Schulz-Schaeffer W, et al. Molecular genetics of human prion diseases in Germany. **Hum Genet** 1999; 105:244-52.

Wong C, Xiong LW, Horiuchi M, et al. Sulfated glycans and elevated temperature stimulate PrP(Sc)-dependent cell-free formation of protease-resistant prion protein. **EMBO J** 2001; 20:377-86.

Wong K, Qiu Y, Hyun W, et al. Decreased receptor-mediated calcium response in prion-infected cells correlates with decreased membrane fluidity and IP3 release. **Neurology** 1996; 47:741-50.

Yamauchi T. Neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II--discovery, progress in a quarter of a century, and perspective: implication for learning and memory. **Biol Pharm Bull** 2005; 28:1342-54.

Yang W, Cook J, Rassbach B, Lemus A, DeArmond SJ, Mastrianni JA. A New Transgenic Mouse Model of Gerstmann-Straussler-Scheinker Syndrome Caused by the A117V Mutation of PRNP. **J Neurosci** 2009; 29:10072-80.

Zaccolo M, Pozzan T. CAMP and Ca²⁺ interplay: a matter of oscillation patterns. **Trends Neurosci** 2003; 26:53-55.

Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, et al. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. **EMBO J** 2002; 21:3307-16.

Zerr I, Schulz-Schaeffer WJ, Giese A, et al. Current clinical diagnosis in Creutzfeldt-Jakob disease: identification of uncommon variants. **Ann Neurol** 2000; 48:323-9.

Zimmer SG, DeBenedetti A, Graff JR. Translational control of malignancy: the mRNA cap-binding protein, eIF-4E, as a central regulator of tumor formation, growth, invasion and metastasis. **Anticancer Res** 2000; 20:1343-51.

Zimmermann K, Turecek PL, Schwarz HP. Genotyping of the prion protein gene at codon 129. **Acta Neuropathol (Berl)** 1999; 97:355-8.

Curriculum Vitae

DADOS PROFISSIONAIS

Nome Cleiton Fagundes Machado
Nascimento 16/06/1977, São Paulo, SP, Brasil
Endereço Fundação Antônio Prudente
Centro Internacional de Pesquisa e Ensino (CIPE) do Hospilpta A.C.Camargo
Laboratório de Biologia Celular e Molecular
Rua Taguá, 440 Liberdade
CEP 01508-010 São Paulo SP Brasil
Fone: 55 11 2189-5000 Ramal: 2977

ÁREAS DE ATUAÇÃO

Biotecnologia, Biologia Molecular, Biologia Celular, Genética, Bioquímica e Bioestatística.

ANO FORMAÇÃO ACADÊMICA

2007-2011 **Doutorado em Ciências**
Fundação Antônio Prudente, FAP, São Paulo, SP, Brasil / Ludwig Institute for Cancer Research
Tese: Estudo funcional de mutantes da proteína prion celular associados às doenças de prion.
Orientadora: Dra. Vilma Regina Martins
Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP.

2005 - 2007 **Mestrado em Ciências**
Fundação Antônio Prudente, FAP, São Paulo, SP, Brasil / Ludwig Institute for Cancer Research
Dissertação: Determinação da atividade funcional da proteína prion celular com o polimorfismo N171S e a mutação D178N presentes no domínio de ligação à laminina.
Orientadora: Dra. Vilma Regina Martins
Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES.

2000 - 2003 **Graduação em Ciências Biológicas (Licenciatura Plena e Bacharelado)**
Universidade Cidade de São Paulo, UNICID, São Paulo, Brasil.
Monografia: Prevalência de *Trypanosoma cruzi* em candidatos a doador de sangue na FPS/HSP
Orientadora: Dra. Ana Lúcia Beirão Cabral

ANO HISTÓRICO PÓS-GRADUAÇÃO

2005 – 2005 **Bases da Biologia Molecular e Celular**
Duração: 144 horas
Fundação Antônio Prudente (Centro de Ensino e Pesquisa Hospita do Câncer - A.C. Camargo)

2005 – 2005 **Patologia dos Tumores**
Duração: 120 horas
Fundação Antônio Prudente (Centro de Ensino e Pesquisa Hospita do Câncer - A.C. Camargo)

2005 – 2005 **Bioestatística Aplicada à Pesquisa**
Duração: 60 horas
Fundação Antônio Prudente (Centro de Ensino e Pesquisa Hospita do Câncer - A.C. Camargo)

2005 – 2005 **Metodologia Científica e Comunicação**
Duração: 72 horas

2008 – 2008 Fundação Antônio Prudente (Centro de Ensino e Pesquisa Hospita do Câncer - A.C. Camargo)
Neurofisiologia
Duração: 120 horas
Instituto de Ciênica Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP)

ANO CURSOS COMPLEMENTARES

2007 - 2007 **Curso Proteômica** (8 horas)

Invitrogen

XXXVI SBBq – 2007

2007 - 2007 **Bioestatística** (25 horas)

Faculdade de Saúde Pública

Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, SP, Brasil

2006 - 2006 **Treinamento BD FACSCalibur** (6 horas)

Centro de Treinamento Bio c.t. BD Biosciences

BD Biosciences

2006 - 2006 **II International Workshop on Imaging Function in Cells and Organisms** (Oficina) (40 horas)

Laboratório de Biologia Celular

Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil

2006 - 2006 **Biosecurity of transgenic Organisms Symposium** (Simpósio) (24 horas)

Laboratório de Oncologia Experimental

Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, SP, Brasil

2005 - 2005 **IV São Paulo Research Conference Cancer today from Molecular Biology to treatment.** (Conferência) (32 horas)

Laboratório de Oncologia Experimental

Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, SP, Brasil

IDIOMAS

Inglês Intermediário

Espanhol Básico

HABILIDADES PROFISSIONAIS

Conhecimento em bioestatística e técnicas de biotecnologia como: Clonagem gênica, sequenciamento, expressão e purificação de proteínas, western blot, ELISA, eletroforese para proteína e DNA, citometria de fluxo, imuno-histoquímica/citoquímica, PCR, microscopia ótica e confocal, cultura celular, transformação celular, transfecção celular, etc. Experiência em laboratório Nível de Biossegurança 2 (NB2). Dois anos de estágio durante a graduação no departamento de sorologia do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas de São Paulo da Faculdade de Medicina da USP.

ARTIGOS PUBLICADOS

1. FABIANA A. CAETANO; FLAVIO H. BERALDO; **CLEITON F. MACHADO**; ANDRE L. GUIMARAES; IVANA SOUSA; DAISY Y. L. WONG, VILMA R. MARTINS; VANIA F. PRADO; R. JANE RYLET AND MARCO A. M. PRADO. Amyloid-beta increases the localization of prion protein at the cell surface. **Journal of Neurochemistry**, 2011 Feb 26. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07225.x. [Epub ahead of print].

2. FLAVIO H. BERALDO, CAMILA P. ARANTES, **CLEITON F. MACHADO**, KILL S. LEE, FABIANA A. CAETANO, GABRIEL L. MANCINI, MARCO A. PRADO, VILMA R. MARTINS. Metabotropic glutamate receptors transduce signals for neurite outgrowth after binding of the prion protein to laminin gamma1 chain. **FASEB Journal**, 2011, 25(1):265-79.

3. CAETANO, F. ; LOPES, M. H. ; HAJJ, G. N. M. ; **MACHADO, C. F.** ; MAGALHAES, A. ; VIEIRA, M. ; AMERICO, T. ; MASSENSINI, A. ; PRIOLA, S. ; VORBERG, I. ; LINDEN, R. ; PRADO, V. F. ; MARTINS, V. R. ; PRADO, M. A. M. . Prion protein endocytosis is required for ERK 1/2 signaling evoked by stress-inducible protein 1. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, p. 6691-6702, 2008.

ARTIGOS EM PREPARAÇÃO

2. **CLEITON F. MACHADO**, DOMINIQUE BOURGEON, FLAVIO F. BERALDO, TIAGO G. SANTOS, VILMA R. MARTINS. The neuritogenesis is impaired in new neuron cell line expressing mutant prion proteins treated with L γ 1 peptide.

1. LANDEMBERGER, M.C., **MACHADO, C. F.**, LOBÃO-SOARES, B., MALLUCCI, G., CHESEBRO, B., WALZ, R., MARTINS, V.R. Cellular prion protein levels are associated with seizure threshold in null mice and transgenic strains.

APRESENTAÇÃO ORAL DE TRABALHO

1. **MACHADO, C. F.**, BERALDO, F.H.B., BOUGEON D, MARTINS, V. R. Impairment in signal transduction in neurons expressing mutant prion proteins, 2010. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho) In: Meeting of the brazilian society for cell biology, 2010 (Bourbon Convention Ibirapuera, São Paulo).

RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS

22. MACHADO, C. F., BERALDO, F. H., BOUGEON D, MARTINS, V. R. Abnormal Signaling Mediated by Laminin in Neurons Expressing Mutant Prion Protein IN: PRION 2010, 2010, SALZBURG. PRION - CONFERENCE, 2010. V.4. P.182 - 182

21. LANDEMBERGER, M. C., MACHADO, C. F., GOMES, H.R, CHIMELLI, L., ROSEMBERG, S., NITRINI, R., MARTINS, V. R. The Notification of Human Prion Diseases in Brazil from 2005-2010 In: PRION 2010, 2010, SALZBURG. PRION - CONFERENCE, 2010. V.4. P.160 - 161

20. MACHADO, C. F., BERALDO, F.H.B., BOUGEON D, MARTINS, V. R. Impairment in signal transduction in neurons expressing mutant prion proteins In: Meeting of the brazilian society for cell biology, 2010, São Paulo. Meeting of the brazilian society for cell biology. , 2010. v.1. p.130 – 130.

19. MACHADO CF, BERALDO FH, BOURGEON D, MARTINS VR. Impairment in calcium signaling mediated by Laminin in neurons expressing mutant prion protein associated with genetic prion diseases. In: X Simpósio brasileiro de Matriz extracelular - SIMEC, 2009, Buzios. V Simpósio Internacional sobre Matriz extracelular. , 2009. v.1. pg 31.

18. BERALDO, F.H., ARANTES, C. P., LEE, K.S. MACHADO, C.F. FABIANA A. CAETANO, MANCINI, G.L, PRADO, M.A., MARTINS, V.R. Involvement of Calcium signaling on Cellular Prion Protein/ laminin γ -1 chain peptide interaction - 10th Symposium on Calcium-Binding Proteins in Normal and Transformed Cells - LEUVEN - BELGIUM (SEPTEMBER 2008).

17. BERALDO, F. H. ; ARANTES, C. P. ; LEE, K. S. ; MACHADO, C. F. ; MANCINI, G. L. ; PRADO, M. A. M. ; MARTINS, V. R. Calcium signaling induced by cellular prion protein/Laminin gamma-1 chain peptide interaction. In: Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) 2008, 2008, Águas de Lindóia. XXXVII Annual Meeting Program 2008, 2008. v. 1. p. 112.

16. MACHADO, C. F. ; LOPES, M. H. ; MARTINS, V. R. . The expression of exogenous cellular prion (PrPc) reconstitutes specific signaling pathways in PrPc-null neurons. In: Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2008, 2008, Águas de Lindóia. XXXVII Annual Meeting Program 2008. , 2008, 2008. v. 1. p. 112.

15. CAETANO, F. ; LOPES, M. H. ; MACHADO, C. F. ; ARANTES, C. P. ; PRADO, V. F. ; LINDEN, R. ; MARTINS, V. R. ; PRADO, M. A. M. . Prion Protein and Stress-Inducible Protein 1 trafficking: The role of endocytosis in signaling. In: XIV congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, 2008, São Paulo. XIV congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, 2008. v. 1. p. 199.

14. BERALDO, F. H. ; ARANTES, C. P. ; MACHADO, C. F. ; PRADO, M. A. M. ; Markus, R. P. ; MARTINS, V. R. . Intracellular calcium increase dependent on both STI1/PrPc and the nicotinic acetylcholine receptor induces activation of ERK and PKC. In: XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, 2008, São Paulo. XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, 2008. v. 1. p. 195.
13. MACHADO, C. F. ; LOPES, M. H. ; MARTINS, V. R. Rescue signaling pathways in PrPc-null neurons expressing exogenous PrPc. In: XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, 2008, São Paulo. XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, 2008. v. 1. p. 195.
12. MACHADO, C. F., COOK, Z. S. P., MARTINS, V. R. Cellular Prion Protein Mutations Impair Cell Migration Mediated by Laminin In: XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2007, Salvador - BA. XXXVI Annual Meeting Program 2007. , 2007. v.1. p.118.
11. LANDEMBERGER, M. C., MACHADO, C. F., MARTINS, V. R. Cellular Prion Protein Protects Against Seizure in vivo In: XXXVI Annual Meeting of Brazilian Society for Biochemistry and Molecular biology (SBBq), 2007, Salvador-BA. XXXVI Annual Meeting Program 2007. , 2007. v.1. p.51.
10. COOK, Z. S. P., MACHADO, C. F., MARTINS, V. R. Functional study of cellular prion protein mutants localized in or next to the laminin interaction site In: XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2007, Salvador - BA. XXXVI Annual Meeting Program 2007. , 2007. v.1. p.116.
9. LANDEMBERGER, M. C., MACHADO, C. F., MALLUCCI, G., CHESEBRO, B., WALZ, R., MARTINS, V. R. Cellular prion protein protects against seizure in vivo. In: IV Simpósio Internacional sobre Matriz extracelular - SIMEC, 2006, Buzios. IV Simpósio Internacional sobre Matriz extracelular. , 2006. v.1.
8. LANDEMBERGER, M. C., MACHADO, C. F., MALLUCCI, G., CHESEBRO, B., WALZ, R., MARTINS, V. R. Cellular Prion Protein Levels are Associated with Seizure threshold in Null Mice and Transgenic Strains In: 26th International Epilepsy Congress, 2005, Paris. The Journal of the International League Against Epilepsy. Paris: Blackwell Publishing, 2005. v.46. p.211.
7. LANDEMBERGER, M. C., MACHADO, C. F., MALLUCCI, G., CHESEBRO, B., WALZ, R., MARTINS, V. R. Cellular Prion Protein Levels are Associated with Seizure threshold in Null Mice and Transgenic Strains In: Fourth INMED/TINS CONFERENCE, 2005, La Ciotat. Nature and nurture in brain development and neurological disorders, 2005. v.1.
6. LANDEMBERGER, M. C., MACHADO, C. F., MALLUCCI, G., WALZ, R., MARTINS, V. R. Cellular prion protein levels are associated with seizure threshold in null mice and transgenic strains. In: Keystone Symposia, 2005, Snowbird, Utah. Molecular Mechanisms of Transmissible Spongiform Encephalopathies (Prion Diseases). , 2005.
5. CAJAÍBA MM, CUNHA IW, CASTRO RMRPS, MACHADO, C. F., RIBEIRO KB, Soares FA, MARTINS, V. R. Correlação entre a expressão imuno-histoquímica da proteína de estresse STI1 e a proliferação celular em glioblastoma multiforme In: XXV Congresso Brasileiro de Patologia, 2005, Natal. J Bras Patol Med Lab. , 2005. v.41. p.107.
4. COUTO, C. G. C., MACHADO, C. F., MARTINS, V. R. Prion protein expression and its role in protection against doxorubicin toxicity. In: IV São Paulo Research Conference Cancer today from Molecular Biology to treatment., 2005, São Paulo. IV São Paulo Research Conference Cancer today from Molecular Biology to treatment.. , 2005. v.1. p.94.
3. COUTO, C. G. C., MACHADO, C. F., MARTINS, V. R. Prion protein expression and its role against oxidative stress in cardiac cells after doxorubicin treatment In: III international symposium on extracellular matrix and VIII simpósio brasileiro sobre matriz extracelular, 2004, Angra dos Reis. SIMEC 2004. , 2004. v.1. p.128.
2. MACHADO, C. F., SALLES, N. A., CABRAL, A. L. B. Chagas: Panorama brasileiro e prevalência em doadores de sangue em São Paulo In: I Congresso Internacional de Iniciação Científica/ SEMESP, 2003, São Paulo. SEMESP. , 2003. v.1. p.243.
1. MACHADO, C. F., RANZANI-PAIVA, M. J. T. Análise Parasitológica em Brânquias de cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* LINNAEUS, 1766 (TELEOSTEI, SILURIFORMES, PIMELODIDAE), em tanques de cultivo, no estado de São Paulo, Brasil. In: XII Congresso Ibérico de Parasitologia, 2001, Cidade do Porto. Acta Parasitológica Portuguesa. , 2001. v.08. p.84.

Endocytosis of Prion Protein Is Required for ERK1/2 Signaling Induced by Stress-Inducible Protein 1

Fabiana A. Caetano,^{1*} Marilene H. Lopes,^{4*} Gláucia N. M. Hajj,^{4*} Cleiton F. Machado,⁴ Camila Pinto Arantes,^{4,5} Ana C. Magalhães,¹ Mônica De Paoli B. Vieira,¹ Tatiana A. Américo,⁶ Andre R. Massensini,² Suzette A. Priola,⁷ Ina Vorberg,⁸ Marcus V. Gomez,¹ Rafael Linden,⁶ Vania F. Prado,³ Vilma R. Martins,⁴ and Marco A. M. Prado¹

¹Programa de Farmacologia Bioquímica e Molecular, Departamento de Farmacologia, ²Departamento de Fisiologia e Biofísica and ³Departamento de Bioquímica-Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, MG 30270-910, Belo Horizonte, Brazil, ⁴Ludwig Institute for Cancer Research–Hospital Alemão Oswaldo Cruz, SP 01323-903, São Paulo, Brazil, ⁵Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 05508-900, São Paulo, Brazil, ⁶Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21949-900, Rio de Janeiro, Brazil, ⁷Laboratory of Persistent Viral Diseases, National Institutes of Health, National Institute of Allergy and Infectious Diseases Rocky Mountain Laboratories, Hamilton, Montana 59840, and ⁸Institute of Virology, Technical University of Munich, 81675 Munich, Germany

The secreted chaperone STI1 triggers activation of protein kinase A (PKA) and ERK1/2 signaling by interacting with the cellular prion (PrP^C) at the cell surface, resulting in neuroprotection and increased neurogenesis. Here, we investigated whether STI1 triggers PrP^C trafficking and tested whether this process controls PrP^C-dependent signaling. We found that STI1, but not a STI1 mutant unable to bind PrP^C, induced PrP^C endocytosis. STI1-induced signaling did not occur in cells devoid of endogenous PrP^C; however, heterologous expression of PrP^C reconstituted both PKA and ERK1/2 activation. In contrast, a PrP^C mutant lacking endocytic activity was unable to promote ERK1/2 activation induced by STI1, whereas it reconstituted PKA activity in the same condition, suggesting a key role of endocytosis in the former process. The activation of ERK1/2 by STI1 was transient and appeared to depend on the interaction of the two proteins at the cell surface or shortly after internalization. Moreover, inhibition of dynamin activity by expression of a dominant-negative mutant caused the accumulation and colocalization of these proteins at the plasma membrane, suggesting that both proteins use a dynamin-dependent internalization pathway. These results show that PrP^C endocytosis is a necessary step to modulate STI1-dependent ERK1/2 signaling involved in neurogenesis.

Key words: neurodegeneration; endocytosis; clathrin; raft; prion diseases; flotillin; ERK

Introduction

Prions are believed to be the causal agent of transmissible spongiform encephalopathies that affect humans and other species. These neurological disorders have in common the corruption of a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored host protein known as the prion protein (PrP^C). It is widely accepted that a misfolded conformer of PrP^C, PrP^{Sc} (here to denote infectious, β sheet-enriched prion), is the major component of the infectious

particle (Prusiner, 1998; Weissmann, 1999). PrP^{Sc} interacts with PrP^C at the cell surface or along the endocytic pathway (Caughey and Raymond, 1991; Caughey and Baron, 2006), but how this interaction imprints novel information to cause disease in the host is a matter of debate. The proposal that PrP^{Sc} represents a gain-of-function, toxic conformer has received much attention, whereas the possibility that alterations in physiological functions of PrP^C contribute to the disease has only recently started to be addressed (Samaia and Brentani, 1998; Martins et al., 2002; Linden et al., 2008).

One of the major difficulties has been to attribute defined physiological roles for PrP^C. Nonetheless, studies in yeast, mammalian cells, and mice models support the hypothesis that PrP^C plays a major role in neuroprotection (for review, see Westergaard et al., 2007). Recent data pointed at specific domains of the molecule that are essential for PrP^C-mediated protection. Mice expressing a PrP^C mutant without amino acids 105–125 (hydrophobic domain) in a PrP^C-null background spontaneously developed severe neurodegenerative illness that was lethal within 1 week after birth (Li et al., 2007). Additionally, the presence of a PrP^C variant lacking residues 94–134 induced a rapidly progressive lethal phenotype with extensive central and peripheral myelin degeneration (Baumann et al., 2007).

Received Oct. 22, 2007; accepted May 7, 2008.

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais—Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX)—MG, Millennium Institute (MCI/Brazil), Financiadora de Estudos e Projetos, and National Institutes of Health—Fogarty International Center Grants R03 TW007025-01 and R21 TW007800-01 (M.A.M.P., V.F.P., M.V.G.). R.L. and T.A.A. were supported by CNPq, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, and PRONEX-RJ. V.R.M. is an International Scholar of the Howard Hughes Medical Institute and received support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

*F.A.C., M.H.L., and G.N.M.H. contributed equally to this work.

Correspondence should be addressed to either of the following: Vilma R. Martins, Ludwig Institute for Cancer Research, Rua Joao Julião 245 1A, SP 01323-903, São Paulo, Brazil, E-mail: vmartins@ludwig.org.br; or Marco A. M. Prado, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antonio Carlos 6627, MG 30270-910, Belo Horizonte, Brazil, E-mail: mprado@icb.ufmg.br.

Ana C. Magalhães, Vania F. Prado's, and Marco A. M. Prado's present address: Robarts Research Institute, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada N6A 5K8.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.1701-08.2008

Copyright © 2008 Society for Neuroscience 0270-6474/08/286691-12\$15.00/0

We have demonstrated that the PrP^C domain, which includes amino acids 113–128, is the binding site for the cochaperone stress-inducible phosphoprotein 1 (STI1). PrP^C engagement with STI1 rescued retinal and hippocampal neurons from programmed cell death through activation of protein kinase A (PKA) (Chiarini et al., 2002; Zanata et al., 2002; Lopes et al., 2005). Additionally, PrP^C–STI1 binding also induced the differentiation of hippocampal neurons by ERK1/2 activation (Lopes et al., 2005). Understanding the fate of both STI1 and PrP^C after their association at the cell surface may help clarify the mechanisms associated with the neurotrophic roles of PrP^C, and its possible bearing on loss-of-function components of prion diseases.

To address these questions, we initially tested whether STI1 alters PrP^C trafficking. Indeed, we found that interaction of these proteins at the cell surface triggered PrP^C endocytosis. Remarkably, the transient ERK1/2 activity induced by PrP^C interaction with either recombinant STI1 or endogenous STI1 secreted by astrocytes depended on PrP^C endocytosis, whereas activation of PKA was not affected when PrP^C trafficking was impaired. STI1 localized in PrP^C-positive organelles only in the initial periods of internalization, suggesting that signaling is triggered by the interaction of these two proteins at the cell surface or shortly after. These data show for the first time that ligand-induced endocytosis of PrP^C is important for cellular signaling.

Materials and Methods

Animals

The *Principles of Laboratory Animal Care* (National Institutes of Health publication number 85-23, 1996) was strictly followed in all experiments. Zrch1 *Prnp*^{0/0} mice were provided by Dr. C. Weissmann (Scripps Florida, Jupiter, FL) (Bueler et al., 1992), and the wild-type control mice (Zrch1 *Prnp*^{+/+}) were generated by crossing F1 descendants from 129/SV and C57BL/6J mating.

Cell culture

SN56 cells are derived from mouse septum neurons (Hammond et al., 1990) and were cultured as described previously (Santos et al., 2001). CF-10, a PrP^C-null neuronal cell line derived from 129/Ola *Prnp*^{0/0} mice (Manson et al., 1994) and positive for the neuroectodermal stem cell marker nestin (I. Vorberg and S. A. Priola, unpublished observation), was used for reconstitution of PrP^C signaling. CF-10 cells were cultured in OptiMEM (Invitrogen) containing glutamine (2 mM; Invitrogen), penicillin (100 IU), and streptomycin (100 µg/ml; Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum.

Primary hippocampal cultures were obtained from embryonic day 17 brains of either wild-type (*Prnp*^{+/+}) or *Prnp*^{0/0} mice (Bueler et al., 1992). The hippocampus was aseptically dissected in HBSS (Invitrogen) and treated with trypsin (0.06%) in HBSS for 20 min at 37°C. The protease was inactivated with 10% FCS in Neurobasal medium (Invitrogen) for 5 min. After three washes with HBSS, cells were mechanically dissociated in Neurobasal medium containing B-27 supplement (Invitrogen), glutamine (2 mM; Invitrogen), penicillin (100 IU), and streptomycin (100 µg/ml; Invitrogen). Cells (0.5 × 10⁶ cells) were plated onto coverslips (22 mm) coated with 5 µg/ml poly-L-lysine (Sigma).

Plasmids

The GFP-PrP^C vector, GFP-Rab5, dynamin I, the dominant-negative dynamin I K44A, and GFP-Rab7 mutant plasmids have been described previously (Lee et al., 2001; Santos et al., 2001; Barbosa et al., 2002; Magalhães et al., 2002, 2005; Ribeiro et al., 2005). Flotillin1–green fluorescent protein (GFP) and caveolin-1–GFP were kindly provided by Dr. B. J. Nichols (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK). The 3F4-tagged plasmids, PrP3F4, and the N-PrP3F4 (N-terminally mutated, altered from ²³KKRPKP²⁸ to ²³KQHSP²⁸) (Sunyach et al., 2003) were kindly provided by R. Morris (Wolfson Centre for Age Related Diseases, Guy's Hospital Campus, King's College, London, UK). It is important to note that in the N-PrP3F4 mutant, a serine is present at the

position 27 and not histidine as published previously (Sunyach et al., 2003) (R. Morris, personal communication).

Transfection of cell lines and isolation of PrP^C-expressing cells

SN56 cells were plated on coverslips for 2 d and transfected using the liposome-mediated method (Effectene; Qiagen) according to the manufacturer's instruction using a 1:10 ratio of DNA to Effectene. After 6 h of transfection, cells were differentiated in serum-free medium supplemented with 1 mM dibutyryl-cAMP (Sigma) for 2 or 3 d with medium changes every day. In cotransfection experiments, a total of 3–5 µg of DNA was used with a plasmid ratio of 1:4 of clathrin–GFP, flotillin1–GFP, and caveolin-1–GFP and a ratio of 1:2 for GFP-PrP^C and dynamin I or dynamin I K44A.

CF-10 cells were transfected with either 3F4-tagged PrP^C (PrP3F4) or the mutant PrP^C N-PrP3F4 (Sunyach et al., 2003) using a liposome-mediated method (Lipofectamine 2000; Invitrogen) according to the manufacturer's instructions using a 1:3 ratio of DNA to lipofectamine. After transfection, the cells were selected with G418 (2 mg/ml; Invitrogen) for 15 d, and resistant cells (10⁷) were incubated with mouse anti-PrP^C serum (Zanata et al., 2002) at a 1:100 dilution for 1 h at 4°C. As a negative control, the cells were incubated with preimmune serum. After three washes with PBS, cells were incubated with anti-mouse IgG R-phycoerythrin conjugated at a 1:200 dilution for 1 h at 4°C. Cell sorting was performed using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). Fluorescence was measured using a 488 nm argon laser and FL2-H channel (red fluorescence, 585/42 nm), and data acquisition from 10,000 events was analyzed using CellQuest software (BD Biosciences). Sorting was accomplished using logical gating of the cells in the forward scatter (FSC) versus side scatter and the FSC versus FL2 dot plots. Only events that entered a gate consisting of both cell regions were sorted.

Alexa Fluor 594, 568, or 488 protein labeling

Recombinant STI1 [wild type or deleted in residues 230–245 (STI1_{Δ230–245})] was expressed and purified as described previously (Zanata et al., 2002). STI1 labeling was performed using an Alexa Fluor 594 (AF594), Alexa Fluor 568 (AF568), or Alexa Fluor 488 (AF488) labeling kit (Invitrogen). Briefly, STI1 (2 mg/ml) diluted in PBS containing 100 mM sodium bicarbonate was labeled with the reactive dye for 1 h at room temperature, and free dye was separated from the labeled protein by size exclusion chromatography using a PD-10 column (GE Healthcare). Protein concentration was determined with Bradford reagent (Bio-Rad).

Protein detection

Fluorescent-labeled proteins (STI1 and STI1_{Δ230–245}; 2 µg) were submitted to 10% SDS-PAGE. To visualize labeled proteins, the gel was irradiated with ultraviolet light, and images were acquired using a UV transilluminator MultiDoc-It-Digital Imaging System (Bioimaging Systems). Alternatively, proteins resolved in 10% SDS-PAGE were subjected to immunoblotting with polyclonal antibody anti-STI1 (1:10,000) (Zanata et al., 2002). Rabbit nonimmune-purified IgG was used as the immunoblotting negative control. For detection of PrP^C, cell extracts were prepared by homogenizing the cell pellet in lysis buffer (100 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, and 1% acid deoxycholic) and a protease inhibitor mixture (complete protease inhibitor tablets; Roche Diagnostics) or a protease inhibitor mixture (Sigma) at twice the concentration suggested by the manufacturers. Proteins from cells were resolved in SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose or Immobilon-P transfer membranes (Millipore), and incubated with mouse anti-PrP^C antibody (Zanata et al., 2002). Staining was revealed by enhanced chemiluminescence (ECL Plus; GE Healthcare) or Super Signal Chemiluminescent Substrate (Pierce).

Fluorescence imaging

Confocal microscopy was performed using a Bio-Rad MRC 1024 laser-scanning confocal system running the Lasersharp 3.0 software coupled to a Zeiss microscope (Axiovert 100) with a 100 × 1.4 numerical aperture (NA) or 63 × 1.3 NA oil-immersion lens (Zeiss), a Bio-Rad Radiance 2100 laser-scanning confocal system coupled to a Nikon microscope (TE2000-U), and a Leica SP5 laser-scanning confocal microscope using a

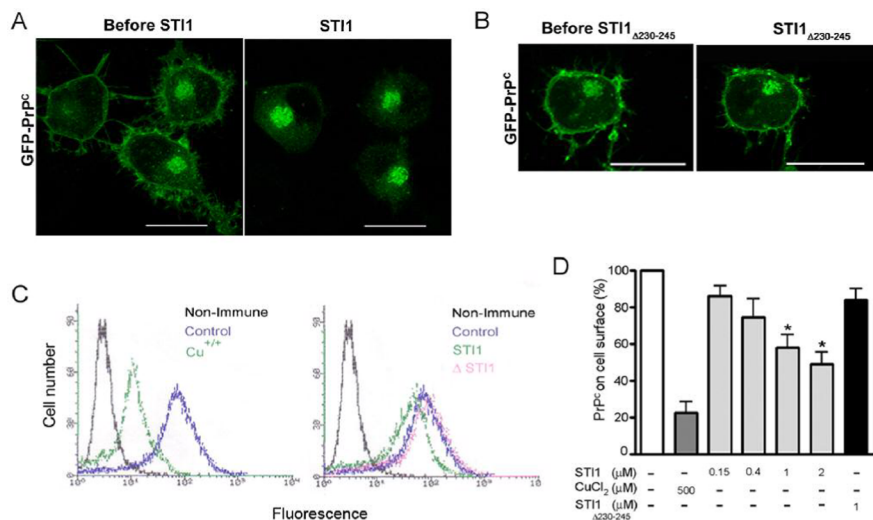


Figure 1. *A, B*, STI1 induces PrP^C internalization. SN56 cells expressing GFP-PrP^C were treated with 1 μM STI1 (*A*) or STI1_{Δ230–245} (*B*) for 45 min at 37°C. The left and right panels show the green fluorescence from GFP-PrP^C before and after the incubation with STI1 or STI1_{Δ230–245}, respectively. *A* and *B* represent Z projections acquired before and after the perfusion. Images are representative of nine and five independent experiments with multiple culture plates in which 40 and 12 cells were analyzed. Scale bars, 20 μm. *C*, Flow cytometry assay from SN56 cells treated with 500 μM Cu²⁺, 1 μM wild-type STI1, or 1 μM STI1_{Δ230–245} for 40 min. Cells were incubated with nonimmune or anti-PrP^C mouse serum followed by R-phycoerythrin-labeled anti-mouse IgG. *D*, The fluorescence for cell-surface PrP^C in untreated cells as described in *C* was set up to 100%, and the levels of PrP^C cell-surface expression after treatment with the indicated concentrations of Cu²⁺, STI1, or STI1_{Δ230–245} were normalized to untreated cells. The results shown are the mean values of six independent experiments. Error bars represent SEM. ANOVA followed by Tukey's HSD test was used for comparisons. **p* < 0.05.

63 × 1.2 NA water-immersion or a 63 × 1.4 oil-immersion lens (Leica). Cells on coverslips were washed and maintained in serum-free medium or Krebs–Ringer–HEPES (KRH) buffer (124 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 25 mM HEPES, 10 mM glucose, and 1 mM CaCl₂) during image acquisition. In live cell experiments, a FCS2 chamber and objective heater system (Biopatch) were used to maintain cells at 37°C. Image analysis and processing were performed with Lasersharp (Bio-Rad), Confocal Assistant, Adobe Photoshop, Metamorph, Leica Application Suite Advanced Fluorescent Lite, and ImageJ (version 1.24) software.

Internalization of STI1 and PrP^C

SN56 cells were incubated with 1 μM fluorescent STI1 for different periods at 37°C in 5% CO₂, washed three times with serum-free medium, and visualized by confocal microscopy. For competition assays, cells were incubated with 10 μM STI1 or albumin in DMEM for 1 h at 4°C, followed by 1 μM fluorescent STI1. The coverslips were washed with serum-free medium and visualized by confocal microscopy.

Cells expressing GFP-PrP^C or coexpressing GFP-PrP^C and dynamin I K44A were maintained in a FCS2 chamber at 37°C and perfused with KRH to obtain the first image. After that, cells were perfused with 1 μM fluorescent STI1 or STI1_{Δ230–245}, and additional optical sections were acquired each minute for 50 min.

For cell-surface labeling, CF-10 PrP3F4 or N-PrP3F4 cells were treated with STI1 or STI1_{Δ230–245}, as described in the figure legends, for 20 min, washed in PBS three times, and fixed in 3.5% paraformaldehyde without any detergent for 20 min. Cells were incubated simultaneously with monoclonal 3F4 antibodies (1:100; Dako), and after washing with PBS, cells were incubated goat anti-mouse AF488 secondary antibodies (Invitrogen), mounted in coverslips with Hydromount (National Diagnostics), and imaged with the SP5 confocal microscope. In these experiments, nuclei were stained with Syto60Red (Invitrogen).

Biotinylation of cell-surface proteins was performed as described previously (Ribeiro et al., 2005; Lee et al., 2007). Briefly, cells were incubated with STI1 or 500 μM Cu²⁺ for 5 or 10 min, respectively, transferred to ice, washed, and incubated on ice in PBS/CM (PBS supplemented with 1.0 mM MgCl₂ and 0.1 mM CaCl₂). Cell-surface proteins were biotinylated with 1 mg/ml sulfo-NHS-SS-biotin (Pierce) for 1 h on ice. To

quench the biotinylation reaction, cells were washed and incubated for 30 min with cold 100 mM glycine in PBS/CM, followed by three washes with cold PBS/CM, and proteins were extracted using 10 mM Tris, pH 7.8, 0.1 M NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, and 0.5% acid deoxycholic. Biotinylated proteins were separated from nonbiotinylated proteins by Neutravidin bead pull-down from equivalent amounts of total cellular protein (800 μg) from each sample. The biotinylated proteins were subjected to SDS-PAGE, followed by electroblotting onto polyvinylidene fluoride membranes, and revealed using a mouse anti-PrP^C antibody (Zanata et al., 2002). For quantification, the major glycosylated band of PrP^C in nonsaturated blots was analyzed using ImageQuant TL and normalized by the expression of PrP^C in the lysates.

Labeling of organelles

Labeling of endosomes was performed by incubating cells with 40 μg/ml AF488-labeled transferrin (Invitrogen) at 37°C in 5% CO₂ for 40 min. After incubation, cells were washed three times with PBS and fixed with 3% paraformaldehyde in PBS for 20 min for posterior imaging. Labeling of late endosomes/lysosomes was done by incubating cells with 1 μM Lysosensor Green DND-189 (Invitrogen) at 37°C in 5% CO₂ for 1 h, and cells were washed as described above and imaged.

Quantification of fluorescence

The effect of dynamin K44A expression on STI1 internalization was evaluated using the ImageJ software or MetaMorph. The total fluorescence inside cells after a 40 min incubation with STI1-AF568 was quantified. Images were thresholded, and the total fluorescence was detected automatically and independently by the software. The results were expressed as the mean of total fluorescence per cell. For colocalization indices, cells were analyzed using MetaMorph, by independently counting fluorescent objects (vesicles) and analyzing the percentage of colocalization independently by the software.

Conditioned medium from astrocytes

Primary mouse astrocyte cultures were obtained as described previously (Lima et al., 2007). After reaching confluence, cells were maintained in DMEM without serum for 48 h. The conditioned medium (CM) was collected, centrifuged for 10 min to remove cellular debris, and filtered in 0.2 μm membranes. CM (total volume of 30 ml) was concentrated to a final volume of 150 μl (200×) in Minicon Static concentrator B12 (Millipore). A total of 30 μl of the 200× concentrated CM was used to measure STI1 concentration. Alternatively, 50 μl of the 200× concentrated CM was immunodepleted of STI1 using a rabbit anti-STI1 antibody (IgG, 4 μg/ml) overnight at 4°C (Lima et al., 2007), mixed with protein A-Sepharose for 2 h at 4°C, and centrifuged. The pellets (washed three times) and supernatants were analyzed for the presence of STI1.

Kinase assays

P44/42 extracellular signal-regulated kinase phosphorylation. Phosphorylation assays were performed using the PhosphoPlus p44–42 extracellular signal-regulated kinase (ERK) (Thr202/Tyr204) antibody kit (Cell Signaling Technology) according to the manufacturer's instructions. Briefly, CF-10 cell lines (5 × 10⁴ cells, serum starved for 48 h with medium change every 24 h) and hippocampal primary culture (10⁶ cells) were stimulated or not with recombinant STI1 (0.5 μM) or 50 μl of the 200× concentrated CM to a final volume of 1 ml (5 nM STI1), rinsed once with ice-cold PBS, and lysed in Laemmli buffer. Cell extracts were subject to SDS-PAGE, followed by immunoblotting with anti-phospho-ERK1/2 and anti-ERK1/2 antibodies (Cell Signaling Technology). The bands obtained after x-ray film exposure to the membranes were analyzed by densitometric scanning and quantified using the Scion Image software.

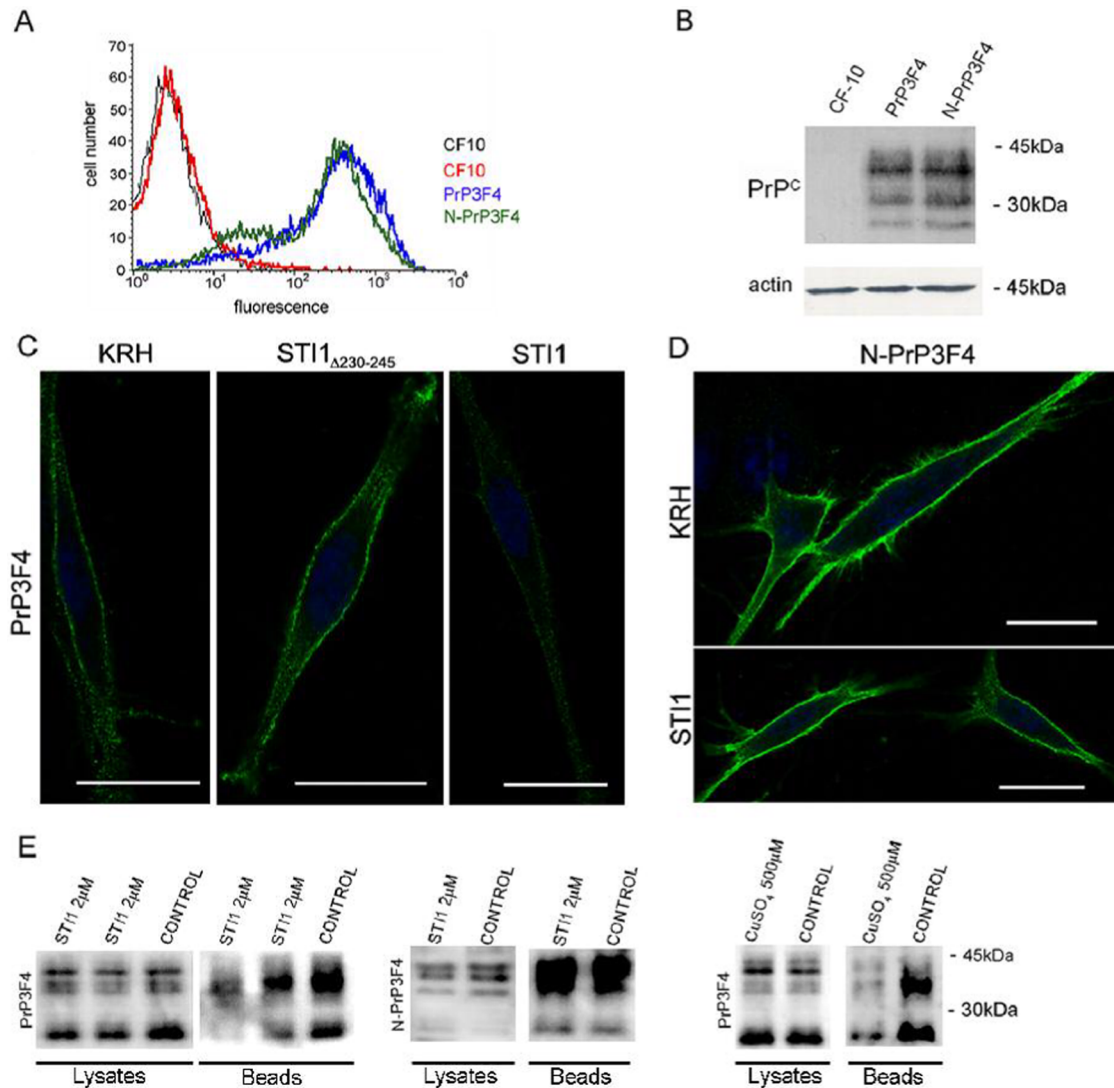


Figure 2. Internalization of PrP^C is dependent of the N-terminal basic motif. The PrP^C-null cell line CF-10 was transfected with an expression vector encoding wild-type PrP^C (PrP3F4) or a mutated PrP^C (N-PrP3F4) protein, the internalization of which is impaired, and stably transfected cells were sorted. **A**, Flow cytometry of nonpermeabilized cells detected using anti-PrP^C antibodies (except in CF-10 cells, black lines that were incubated only with secondary antibodies). **B**, Western blot assays using anti-PrP^C antibodies show similar expression of ectopic proteins. **C**, PrP3F4 cells were kept in KRH or treated with 2 μ M STI1 $_{\Delta 230-245}$ (second column) or STI1 (third column) for 20 min at 37°C. After treatment, cells were fixed and immunostained for cell-surface PrP^C using the 3F4 antibody. **D**, As in **C**, the N-PrP3F4 mutant cells were treated with 2 μ M STI1 for 20 min at 37°C. Scale bars, 20 μ m. **E**, PrP3F4- or N-PrP3F4-expressing cells were treated with STI1 or KRH for 5 min and ice-d. Cell-surface PrP^C after these treatments was detected by biotinylation of cell-surface proteins. Biotinylated proteins were isolated using Neutravidin beads, subjected to SDS-PAGE, and immunoblotted using a mouse anti-PrP^C antibody. The lysates represent the expression of PrP3F4 or N-PrP3F4 proteins, and beads represent biotinylated cell-surface PrP^C after treatment with STI1 or KRH (control). Note that STI1 decreased the amount of PrP3F4 in the membrane in the two lanes (duplicates) labeled STI1 compared with control, whereas N-PrP3F4 was not decreased. Treatment with 500 μ M CuSO₄ for 10 min was used to test for efficient detection PrP^C cell-surface sequestration. The blots are representative of six or seven experiments, respectively.

PKA activation. Primary hippocampal neurons (10⁶ cells), the SN56 cell line (10⁶ cells, medium starved 24 h), or the CF-10 cell line (10⁵ cells, serum starved for 48 h with medium change every 24 h) were preincubated with 100 μ M IBMX (Sigma) for 1 h at 37°C and 5% CO₂ and treated with STI1 (1 μ M) or forskolin (10 μ M) for 20 min at 37°C. The cells were washed with PBS and homogenized with ice-cold extraction buffer (150 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, and 25 mM Tris-HCl, pH 7.4) plus Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Cellular debris was removed by centrifugation at 6000 \times g for 10 min. The PKA activity was determined by γ [P³²]-ATP incorporation to a PKA-specific substrate provided by the PKA assay system kit (Millipore). The reaction was performed according to the manufacturer's instructions.

Flow cytometry assay

SN56 cells were preincubated with blocking solution (0.5% BSA in PBS) in the absence or presence of STI1 or copper sulfate for

20 or 40 min at 37°C. Cells were washed and incubated with an anti-PrP^C antibody (1:100) (Zanata et al., 2002), followed by anti-mouse IgG conjugated to R-phycoerythrin (1:200; Dako), both for 1 h at 4°C. Analyses were performed using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences), and data acquisition from 10,000 events was analyzed using CellQuest software (BD Biosciences).

Statistical analysis

The mean values of at least three independent datasets are shown in the figures; the error bars represent SEM. ANOVA followed by Tukey's honestly significant difference (HSD) test or Kruskal–Wallis one-way ANOVA followed by a Dunn's *post hoc* test were used for multiple comparisons. For all tests, results were considered statistically significant when *p* was <0.05.

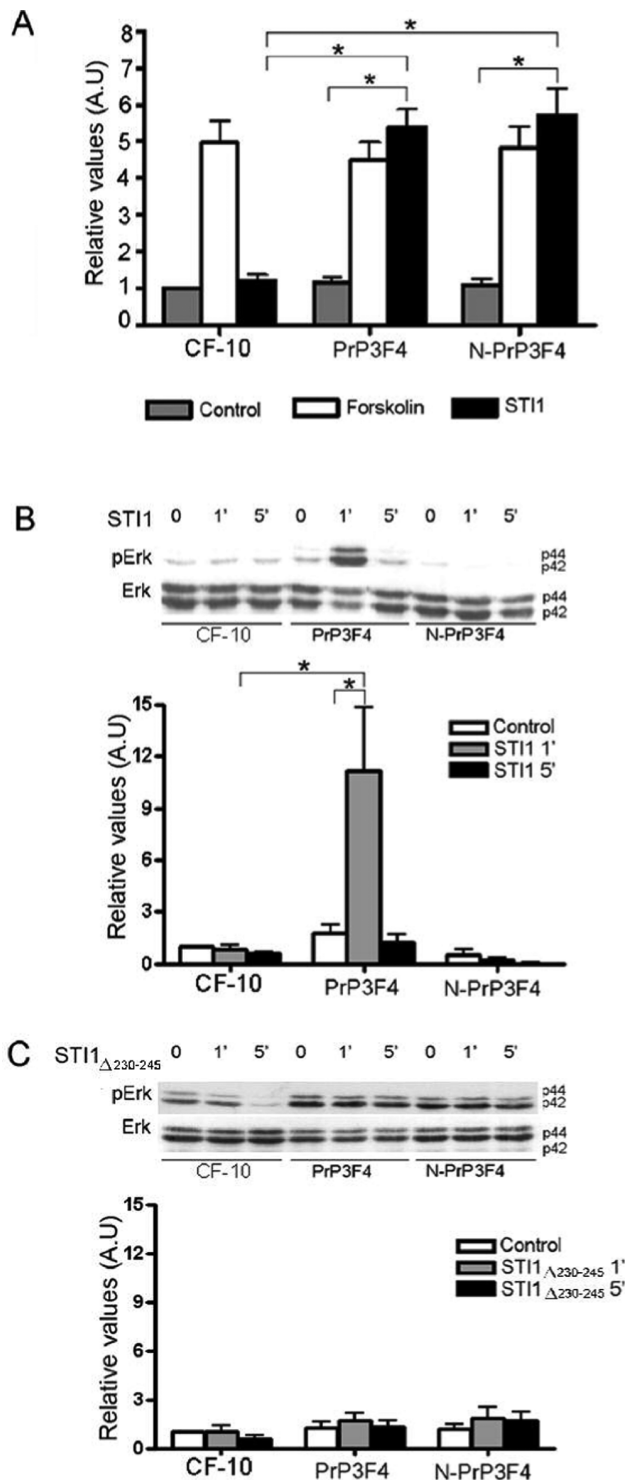


Figure 3. PrP^C endocytic trafficking is necessary for STI1-PrP^C-dependent ERK1/2 but not for PKA activation. **A**, Cells were treated with forskolin or 1 μ M of STI1, and the PKA activity was evaluated. **B**, Cells were treated with 0.5 μ M STI1 for 1 or 5 min, and ERK1/2 activity (pErk) was analyzed. **C**, Cells were treated with 0.5 μ M STI1_{Δ230–245} for 1 or 5 min, and ERK1/2 activity was analyzed. The basal activity of CF-10 cells without treatment was normalized to 1, and the other values are relative to it. The results show the mean values of five (**A**) or four (**B**, **C**) independent datasets. Error bars represent SEM. ANOVA followed by Tukey's HSD test was used for comparisons. * $p < 0.05$. A.U., Arbitrary units.

Results

STI1 induces PrP^C internalization

To test whether interaction with STI1 causes any consequence for PrP^C localization in living cells, we expressed GFP-PrP^C ectopi-

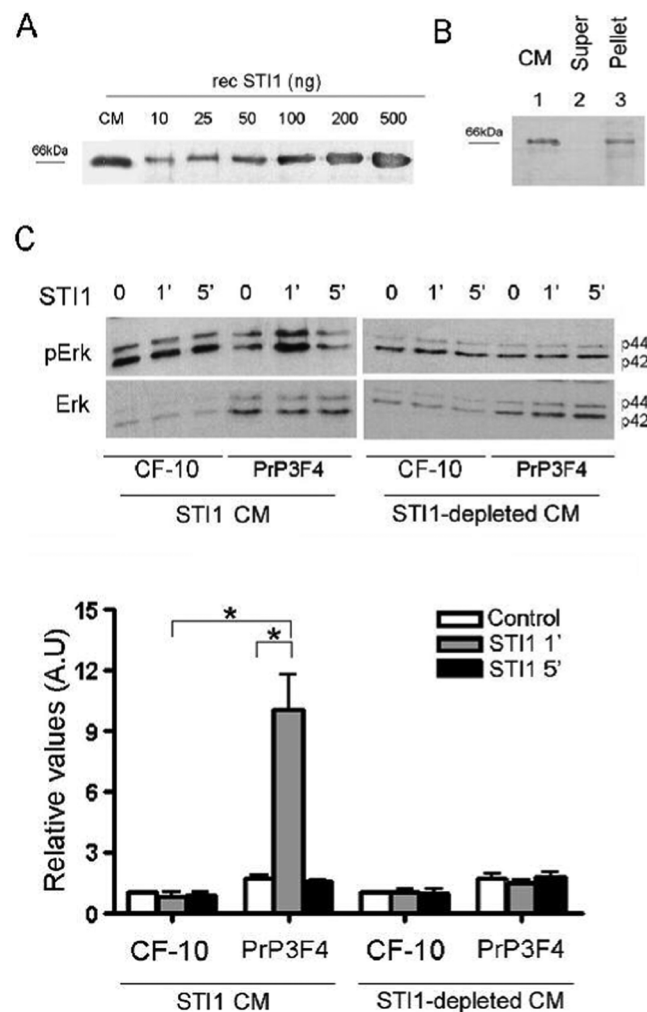


Figure 4. STI1 secreted by astrocytes induces ERK1/2 activation. **A**, Increasing amounts of recombinant STI1 (from 10 to 500 ng) and 30 μ l of 200 \times concentrated CM was loaded onto SDS-PAGE. Immunoblotting was developed with anti-STI1 antibodies. **B**, STI1 was immunoprecipitated from 150 μ l of concentrated CM. The supernatant and the pellet were resolved by SDS-PAGE and detected with anti-STI1 antibodies: lane 1, 30 μ l of concentrated CM; lane 2, 30 μ l of immunodepleted concentrated CM; lane 3, 30 μ l pellet from immunoprecipitation. **C**, CF-10 or CF-10-expressing PrP3F4 were treated with 50 μ l of concentrated CM (STI1 final concentration of 5 nM) or immunodepleted concentrated CM for 1 or 5 min, and ERK1/2 activity was analyzed. The basal activity of CF-10 cells without treatment was normalized to 1, and the other values are relative to it. The results show the mean values of three independent datasets. Error bars represent SEM. ANOVA followed by Tukey's HSD test was used for comparisons. * $p < 0.05$. A.U., Arbitrary units.

cally. This fluorescent protein has been previously shown to respond to Cu²⁺ and to present identical localization as endogenous PrP^C. For these experiments, we used SN56 cells, in which the cellular trafficking of fluorescent PrP^C and PrP^{res} was studied and which have also been shown to be infected by PrP^{res} (Lee et al., 2001; Magalhães et al., 2005). Maximum projection images obtained from confocal stacks (data not shown) demonstrated that, as described previously (Lee et al., 2001), GFP-PrP^C is present at the cell surface and in the perinuclear region that represents the Golgi apparatus and endosomes (Magalhães et al., 2002). In control experiments, we reproduced the observation that Cu²⁺ evokes internalization of GFP-PrP^C (data not shown) (Lee et al., 2001; Magalhães et al., 2002). We then evaluated GFP-PrP^C distribution in SN56 cells after treatment with STI1 or a deletion mutant unable to bind PrP^C, STI1_{Δ230–245} (Lopes et al.,

2005). We noted that a significant fraction of the green fluorescence representing PrP^C disappeared from the cell surface and accumulated inside cells after STI1 addition (Fig. 1A). Conversely, GFP-PrP^C was not internalized in cells similarly treated with STI1 $_{\Delta 230-245}$ (Fig. 1B), indicating the need of STI1–PrP^C interaction for PrP^C endocytosis.

To test whether endogenous PrP^C was also internalized in cells in response to STI1 and to quantify this effect, flow cytometry assays were performed. SN56 cells express PrP^C (Lee et al., 2001; Magalhães et al., 2005; Baron et al., 2006), and treatment with 500 μ M Cu²⁺ evoked sequestration of cell-surface PrP^C (Fig. 1C). STI1 also induced internalization of endogenous PrP^C in a dose-dependent manner (Fig. 1D), whereas STI1 $_{\Delta 230-245}$ was unable to promote endocytosis of PrP^C (Fig. 1D). The present results show that interaction of STI1 and PrP^C at the cell surface triggers internalization of PrP^C, albeit at lower levels than copper. Control experiments showed that STI1 interaction with PrP^C does not shed the latter from the cell surface, because cultures treated with STI1 showed no increase in PrP^C in CM (data not shown).

Endocytic trafficking of PrP^C is required for STI–PrP^C-dependent ERK1/2 but not for activation of PKA

The endocytic trafficking of membrane receptors is important for attenuating ligand-induced signaling, but it can also be critical to trigger and modulate specific signaling pathways as shown, for example, for epidermal growth factor receptors (Vieira et al., 1996). Our previous data showed that PrP^C–STI1 interaction triggers both PKA and ERK1/2 activation promoting neuronal survival and differentiation, respectively (Chiarini et al., 2002; Lopes et al., 2005). To test for a role of STI1-induced PrP^C endocytic trafficking on these signaling pathways, we expressed either a mutant PrP^C, the internalization of which is impaired (N-PrP3F4), or its wild-type control (PrP3F4) (Sunyach et al., 2003) in PrP^C-null CF-10 neuronal cells. Transfected cells were selected for similar expression of either wild-type PrP3F4 or N-PrP3F4 mutated PrP^C, as verified by flow cytometry (Fig. 2A) and Western blot assays (Fig. 2B). As expected, no endogenous PrP^C expression was present in untransfected CF-10 cells (note that black and red lines represent CF-10 cells incubated without or with PrP^C antibodies, respectively) (Fig. 2A, B).

We initially tested whether in these cells STI1 would also induce endocytosis. Immunofluorescence analysis of cell-surface PrP3F4 indicates that STI1, but not STI1 $_{\Delta 230-245}$, decreased cell-surface immunolabeling for PrP^C (Fig. 2C). In contrast, in N-PrP3F4-expressing cells, treatment with STI1 did not change cell-surface immunolabeling (Fig. 2D). To complement these experiments and quantify the effect of STI1, we used biotinylation of cell-surface PrP^C (Fig. 2E). In these experiments, we measured the amount of PrP3F4 remaining at the cell surface after the cells were treated with STI1 (Ribeiro et al., 2005; Lee et al., 2007). In control experiments, cells exposed to Cu²⁺ showed a decrease in cell-surface PrP^C ($63 \pm 10\%$ of decrease; mean \pm SEM for seven experiments). Treatment of cells with STI1 for 5 min caused sequestration of PrP3F4 with consequent decrease in cell-surface PrP^C (Fig. 2E) ($34 \pm 7\%$; mean \pm SEM for six experiments). In contrast, N-PrP3F4 cells treated with STI1 showed no sign of internalization (Fig. 2E) ($2 \pm 2\%$; mean \pm SEM of four experiments). Thus, the combination of live cell, flow cytometry, immunofluorescence, and biotinylation experiments showed that STI1 was able to induce PrP^C endocytosis in two distinct neuronal cell lines.

Incubation of PrP-null CF-10 cells with STI1 induced neither

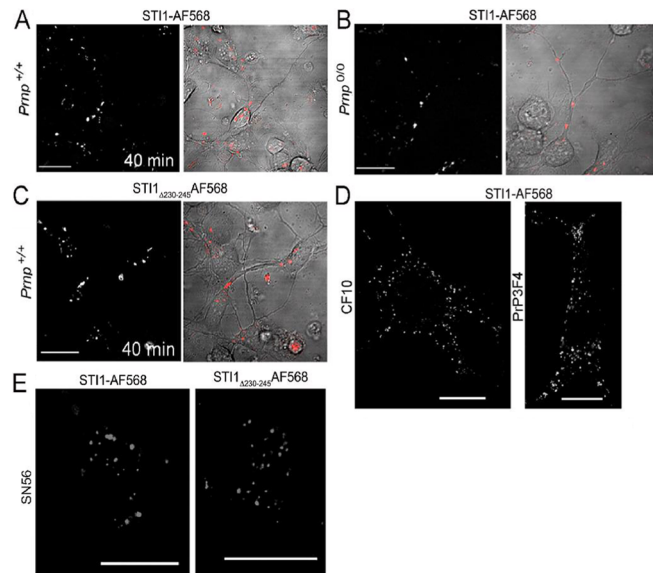


Figure 5. STI1 is internalized independently of PrP^C. **A–E**, Wild-type *Pmp*^{+/+} (**A**, **C**); PrP^C-null, *Pmp*^{0/0} primary hippocampal neurons (**B**), CF-10 and CF-10 PrP3F4 cells (**D**); or SN56 cells (**E**) were incubated with 1 μ M STI1–AF568 or STI1 $_{\Delta 230-245}$ –AF568, as indicated, for 40 min at 37°C. Optical sections of representative cells from at least three independent experiments done in multiple cultures are shown. Scale bars, 20 μ m.

PKA nor ERK1/2 activation, consistent with dependence on PrP^C for STI1-dependent signaling, although the cells responded to forskolin (Fig. 3A). The expression of either the wild type (PrP3F4) or the internalization defective PrP^C (N-PrP3F4) reconstituted STI1-induced PKA activation (Fig. 3A). In contrast, transient activation of ERK1/2 by STI1 was rescued in CF-10 by wild-type PrP^C, but not by the mutated PrP^C, which lacks internalization signals (Fig. 3B). The STI1 deletion mutant defective for the PrP^C binding site, STI1 $_{\Delta 230-245}$, is unable to activate either PKA or ERK1/2 signaling in hippocampal neurons (Lopes et al., 2005). In agreement with those observations, CF-10 cells expressing PrP3F4 or N-PrP3F4 presented no activation of ERK1/2 when treated with STI1 $_{\Delta 230-245}$ (Fig. 3C).

Our recent data demonstrated that, similar to chaperones such as Hsp70, STI1 is secreted by astrocytes and presents neurotrophic activity (Lima et al., 2007). To test whether recombinant STI1 may mimic physiologically secreted STI1, we first estimated the amount of STI1 present in CM from astrocytes. Comparison of STI1 in CM with standards containing several concentrations of recombinant STI1 indicates that the amount of STI1 therein is equivalent to ~ 200 ng of protein (Fig. 4A), a STI1 final concentration of 33 ng/ml or 0.5 nM (see Materials and Methods for details). As shown previously (Lima et al., 2007), STI1 from the CM of astrocytes (Fig. 4B, lane 1) can be immunoprecipitated with specific antibodies (Fig. 4B, lane 3) resulting in a fraction of CM depleted of this protein (Fig. 4B, lane 2). The CM containing STI1 at a final concentration of 5 nM was able to induce ERK1/2 activation in PrP3F4-expressing cells, but not in the PrP-null parent CF-10 cells (Fig. 4C, left). Conversely, STI1-depleted CM did not activate ERK1/2 in any of the cell lines (Fig. 4C, right), suggesting that recombinant STI1 reproduces the effects of secreted protein found in CM derived from astrocytes. It should be noted that 100 times more recombinant STI1 (0.5 μ M) (Fig. 3B) than astrocyte-secreted STI1 (5 nM) (Fig. 4C) is necessary to activate ERK1/2. This indicates either that some of the recombinant protein may not be properly folded or that posttranslational

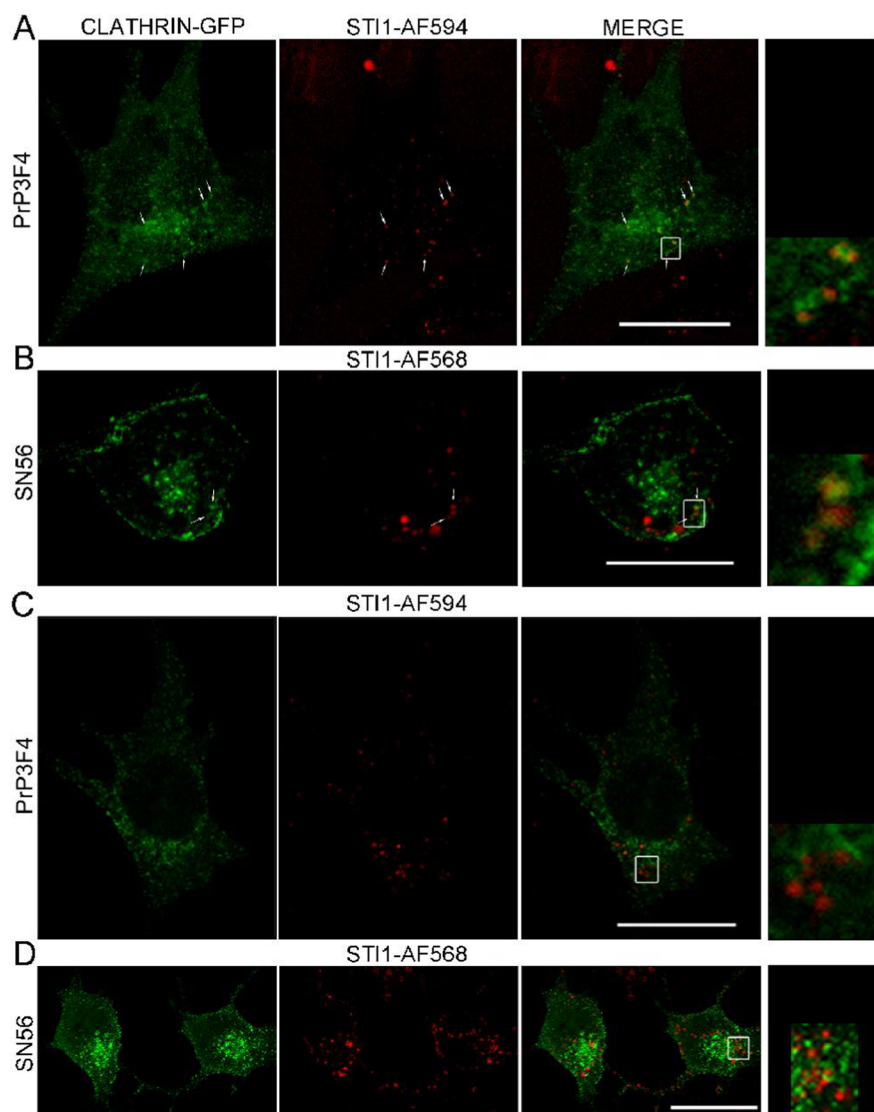


Figure 6. A fraction of internalized STI1 colocalizes with clathrin. PrP3F4 or SN56 cells, as indicated, were transfected with clathrin-GFP and incubated with 1 μ M STI1-AF594 or STI1-AF568 for various periods of time. **A, B**, Representative images for the first minutes after incubation with STI1. Arrows point to some vesicles where clathrin-GFP and fluorescent STI1 are found. **C, D**, Representative images of transfected cells 20 min after incubation with STI1. Right panels present a magnified view of the region indicated in the merged images. Arrows indicate some of the colocalization spots. Images are representative of at least 30 cells from several culture dishes on 3 different days. Scale bars, 20 μ m.

modifications in secreted STI1 as well as the presence of coactivators in the CM may contribute for this higher activity compared with the recombinant protein.

STI1 binds to cells in a specific manner and is internalized

To evaluate STI1 interaction with the cell membrane and its possible dependency on expression of PrP^C at the cell surface, recombinant STI1 or the deletion mutant unable to bind PrP^C, STI1 $_{\Delta 230-245}$ (Lopes et al., 2005), were labeled using AF488, AF568, or AF594. Control experiments showed that labeling STI1 as well as STI1 $_{\Delta 230-245}$ did not produce any degradation (supplemental Fig. 1A, B, available at www.jneurosci.org as supplemental material) and labeled proteins are able to evoke PKA activity in cultured hippocampal neurons (supplemental Fig. 1C, available at www.jneurosci.org as supplemental material) and are therefore functional. Interestingly, STI1-AF568 bound to hippocampal neurons from both wild-type (*Prnp*^{+/+}) (Fig. 5A) and PrP^C-

null (*Prnp*^{0/0}) (Fig. 5B) mice was internalized. In agreement with these observations, STI1 $_{\Delta 230-245}$ -AF568 was also effectively internalized by wild-type neurons (Fig. 5C). These observations were confirmed in PrP-null CF-10 cells and CF-10 cells expressing PrP3F4 treated with STI1-AF488 (Fig. 5D) and also in SN56 cells exposed to STI1-AF568 or STI1 $_{\Delta 230-245}$ -AF568 (Fig. 5E). Therefore, these data suggest that STI1 binds to neuronal cells and is internalized by a PrP^C-independent pathway.

Intracellular localization of internalized STI1

Although the interaction of STI1 with cells appears to be independent of the presence of PrP^C, signaling is strictly dependent on PrP^C expression, and ERK1/2 activation depends on PrP^C internalization. Hence, it is possible that engagement of these proteins occurs at the cell surface and continues in intracellular organelles to activate ERK1/2. We investigated this possibility by examining the localization of fluorescent STI1. Confocal images of CF-10 PrP3F4 cells or SN56 cells showed that we could clearly detect internalized fluorescent STI1 after 10 min of incubation, and additional exposure to medium containing the fluorescent protein lead to increased intracellular accumulation in vesicles (supplemental Fig. 2A, B, available at www.jneurosci.org as supplemental material). The interaction of STI1-AF568 with cells and its sequestration in intracellular organelles showed specificity, because no internalization of STI1-Alexa Fluor was detected in experiments done at 4°C (data not shown). Moreover, intracellular labeling with fluorescent STI1 was blocked when CF-10 PrP3F4 or SN56 cells (supplemental Fig. 2C, D, available at www.jneurosci.org as supplemental material) were incubated with a 10-fold excess of nonfluorescent protein (STI1) for 1 h, followed by incubation with fluorescent STI1.

To test whether fluorescent STI1 is present in the same organelles as PrP^C, we did a series of double-labeling experiments in living cells using GFP-tagged markers of internalization pathways. We chose to study trafficking in living cells to avoid possible fixation artifacts, because GPI-anchored proteins such as PrP^C may change location after fixation, and we noted that fixed STI1-AF568-labeled cells showed a distinct pattern of localization compared with live cells (data not shown). Cells were transfected with clathrin light chain-GFP, which labels both coated pits and clathrin-coated vesicles (Gaidarov et al., 1999). These experiments indicated that STI1 (AF568 or AF594) internalized in cells in the initial period (<15 min) after incubation showed some colocalization with GFP-clathrin-labeled vesicles both in CF-10 PrP3F4 cells (Fig. 6A) and in SN56 cells (Fig. 6B). In contrast, incubation of STI1-AF568 for 20 or 40 min (data not shown) with CF-10 PrP3F4 cells (Fig. 6C) or SN56 cells (Fig. 6D) showed

no colocalization of internalized STI1 (red) with clathrin-coated vesicles (green). Quantification of these colocalization experiments indicated that $41 \pm 8\%$ of STI1-positive vesicles also show clathrin labeling in the initial periods of incubation, but this colocalization decreased to $9 \pm 1\%$ after cells were exposed to fluorescent STI1 for >20 min.

We also investigated a role of raft-derived organelles in the trafficking of STI1, by using either caveolin-GFP (Fig. 7A) or flotillin-GFP (Fig. 7B) in CF-10 PrP3F4 cells and in SN56 cells (Fig. 7C,D). Strikingly, STI1-AF568 (red) partly colocalized with caveolin-1-GFP (green; $36 \pm 8\%$ of colocalization in CF-10 PrP3F4 cells in the initial periods of incubation), but quantification of colocalization after additional periods of incubation in CF-10 PrP3F4 cells showed decreased colocalization ($15 \pm 2\%$ after 20 min incubation). In contrast, STI1-AF568 or STI1-AF594 (red) showed extensive colocalization with flotillin1-GFP (green)-labeled vesicles in all time periods examined ($61 \pm 5\%$ in the initial 15 min incubation and $68 \pm 2\%$ after the 20 min incubation). In SN56 cells, fluorescent STI1 appeared to colocalize extensively with both caveolin- and flotillin-labeled vesicles.

These experiments suggest that internalized STI1 is found predominantly in flotillin organelles at steady state, but a fraction of the protein appears to use clathrin-coated vesicles for internalization, a pathway that also serves as the port of entry for PrP^C (Shyng et al., 1994, 1995; Sunyach et al., 2003; Taylor et al., 2005). To further understand the subcellular localization of STI1, we focused our experiments in SN56 cells, a cell line in which we have previously examined the trafficking of PrP^C and PrP^{res} (Lee et al., 2001; Magalhães et al., 2002, 2005). In agreement with an important role for a raft-derived organelle in the steady-state localization of STI1, we detected almost no colocalization between STI1-AF568 (red) incubated for 20 min (data not shown) or 40 min with AF488-labeled transferrin (green) (Fig. 8A) or GFP-Rab5 (green) (Fig. 8B), which are markers of classical early endosomes derived from clathrin-coated vesicles.

The above experiments suggest that STI1 may enter cells by two pathways: a smaller fraction of the fluorescent protein seems to use clathrin-mediated endocytosis, but a larger fraction uses a raft-mediated pathway (flotillin and perhaps caveolae in cells that endogenously express caveolin) for internalization. Proteins that are internalized by raft-mediated pathways are able to accumulate in acidic-late endosomal organelles, and flotillin1 (also known as reggie-2) itself is found also in acidic organelles (Sturmer et al., 2004; Pimpinelli et al., 2005). We tested the possibility that STI1 may be located in late endosomes by labeling STI1-AF568-treated cells (1 h) with lysosensor green, a marker of acidic vesicles. Figure 8C shows abundant colocalization between STI1-

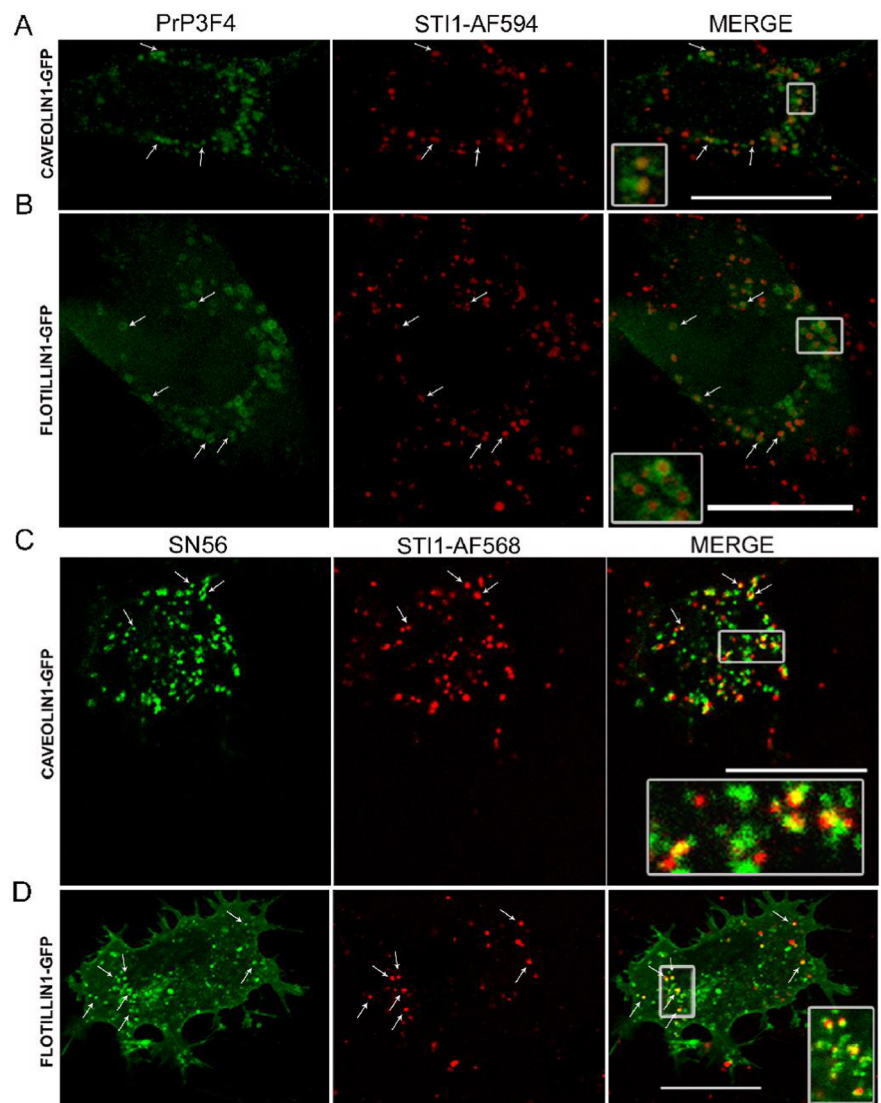


Figure 7. STI1 is also found in raft-derived vesicles. **A, B**, PrP3F4 cells were transfected with caveolin-1-GFP (**A**) or flotillin1-GFP (**B**), and living cells were perfused with STI1-AF594 for 30 min at 37°C. These images are representative examples of colocalization patterns in the first 15 min of incubation with STI1. **C, D**, SN56 cells were transfected with caveolin-1-GFP (**C**) or flotillin1-GFP (**D**) and incubated with STI1-AF568 for 40 min at 37°C. Insets show a magnified view of the designated box. Colocalization between STI1 and the two markers is seen in yellow in the superimposed images, and arrows show some of the colocalization spots. Images are representative of at least 40 cells from several dishes analyzed on 5 different days for each condition. Scale bars, 20 μ m.

AF568 (red) and lysosensor green (green) in SN56 cells. We confirmed that STI1-AF568 was present in late endosomes/lysosomes by expressing GFP-RAB7Q67L, a constitutively active mutant that is preferentially located in these organelles (Bucci et al., 2000; Magalhães et al., 2005). STI1-AF568 (Fig. 8D, red) also colocalized with vesicles labeled with GFP-RAB7Q67L (green). Together, these observations suggest that a larger fraction of fluorescent STI1 accumulates in late endosomes.

STI1 interacts with PrP^C predominantly at the cell surface and in early endocytic intermediates

The above experiments suggest only a small fraction of fluorescent STI1 locates to organelles where PrP^C has been previously found in neurons and neuronal cells (i.e., clathrin-coated vesicles) (Sunyach et al., 2003). To also test in living cells whether both STI and PrP^C can be found in the same organelles, we used STI1-AF568 and GFP-PrP^C. Figure 9A (top) indicates that dur-

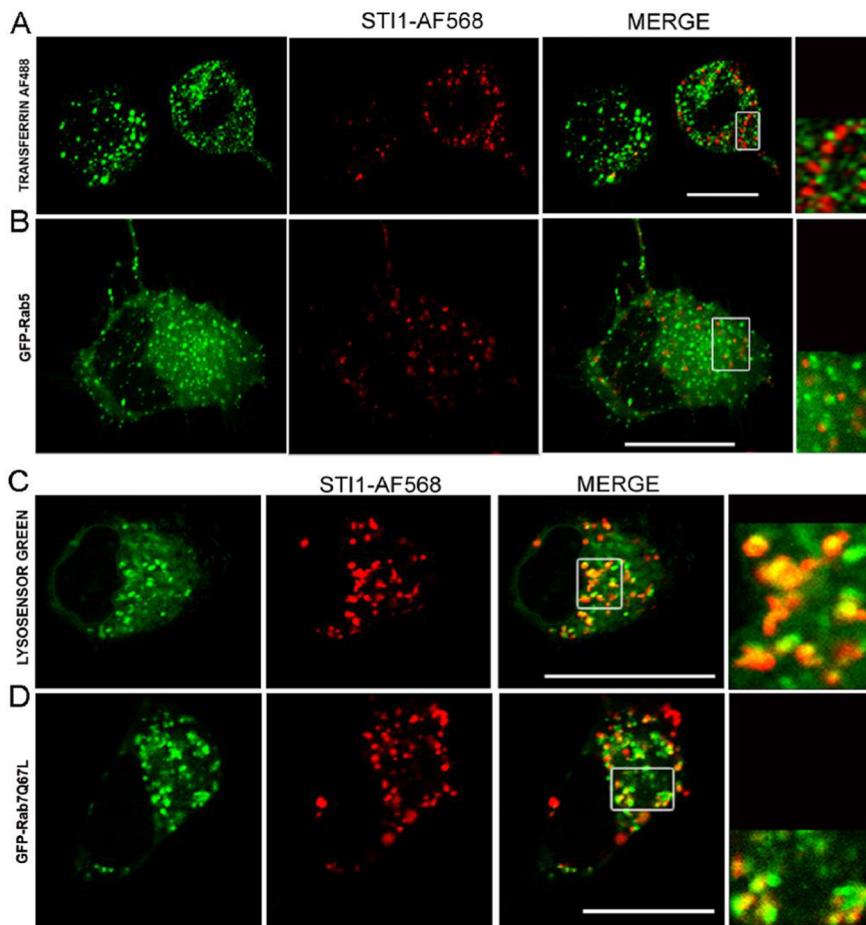


Figure 8. Subcellular localization of STI1. **A**, SN56 cells were double labeled with STI1–AF568 and transferrin–AF488 for 40 min at 37°C. **B**, Cells expressing GFP–Rab5 were incubated with STI1–AF568 for 40 min at 37°C. Right panels present a magnified view of the region indicated in the merged images. **C**, SN56 cells were double labeled with STI1–AF568 and the acidotropic probe LysoSensor Green (first panel) for 60 min. **D**, Cells expressing constitutive active mutant GFP–Rab7Q67L were incubated with STI1–AF568 for 40 min at 37°C (second panel). The merged image shows colocalizations in yellow. The images are representative of three experiments with multiple dishes. At least 30 cells were analyzed in each condition. Scale bars, 20 μ m.

ing the initial periods of incubation (14 min), a small fraction of STI1 and GFP–PrP^C can be found in similar organelles. Further incubation shows much less colocalization between these two fluorescent proteins (Fig. 9A, bottom).

We have previously demonstrated that GFP–PrP^C localization is affected by a dominant-negative mutant of dynamin I, dynamin K44A (Magalhães et al., 2002). We thus tested whether STI1 internalization would also be altered by dynamin I K44A. In this condition, but not in cells transfected with wild-type dynamin I, STI1–AF568 accumulated at the cell surface in spots (Fig. 9B). Quantification of internalized STI1–AF568 fluorescence suggests that cells transfected with the mutant, but not with wild-type dynamin I, sequestered <5% of the normal fluorescence found in nontransfected cells, whereas dynamin I had no significant effect in the internalization (Fig. 9C). In addition, we found that cells transfected with GFP–PrP^C and treated with STI1–AF568 showed almost no internalization of PrP^C when they were cotransfected with dynamin I K44A (Fig. 9D). Additionally, the decrease in endocytosis by this manipulation caused accumulation of STI1–AF568 at the cell surface in areas where GFP–PrP^C was also concentrated (Fig. 9D, merge). These results suggest that both proteins use a dynamin-dependent pathway for internaliza-

tion and that block of endocytosis causes STI1 to remain bound to PrP^C at the cell surface.

Discussion

The present experiments allowed for the first time the direct visualization of the consequences of engagement between STI1 and PrP^C in living neuronal cells. We revealed that STI1, a PrP^C ligand that causes cellular signaling with consequences for neuronal survival and differentiation, triggers PrP^C sequestration and that this is critical for the activation of ERK1/2 but not PKA. We also noted that STI1 is internalized by cells independently of PrP^C and that although part of STI1 may be internalized together with PrP^C, the two proteins follow distinct downstream intracellular pathways. Finally, signaling by ERK1/2 induced by STI1 is fast and depends on endocytosis of PrP^C, but the interaction of the latter two proteins is likely to be transient once they are both internalized. These results have broad implications for understanding physiological functions of STI1–PrP^C interaction and provide information on how PrP^C trafficking can be affected by stimuli that promote PrP^C-dependent cell signaling.

Induction of heat shock proteins (HSPs) was initially described as an adaptive response that enhances the survival of cells exposed to environmental insults (Parsell and Lindquist, 1993). The evolutionarily conserved STI1, including its human homolog HSP70/HSP90 organizing protein (Hop), interacts with both HSP70 and HSP90 to facilitate the transfer of substrates, thus playing an important role in proper protein folding and maturation (Hernandez et al., 2002). The HSPs are abundantly expressed in both the cytoplasm and the nucleus (Honore et al., 1992; Lassel et al., 1997); however, growing evidence suggest that some HSPs, in particular HSP90 and HSP70, can be secreted by distinct cells (Eustace and Jay, 2004; Evdonin et al., 2006), including astrocytes (Guzhova et al., 2001; Robinson et al., 2005). Secreted HSP70 has been related to prevention of axotomy-induced death of spinal sensory and motor neurons (Houenou et al., 1996; Tidwell et al., 2004), as well as protection against light damage of photoreceptors (Yu et al., 2001) and enhancement of motoneuron survival *in vivo* during the period of naturally occurring programmed cell death (Robinson et al., 2005). Thus, HSP70 may function as a neurotrophic factor.

STI1 binds tightly to HSP70 and might be secreted similarly to the latter, although mechanisms of secretion for both proteins are poorly understood. STI1 is secreted from fibrosarcoma cells (Eustace and Jay, 2004), and we have recently found that the protein is also secreted from primary astrocyte cultures and engages PrP^C-dependent neuronal survival (Lima et al., 2007). Moreover, unbiased proteomic analysis of proteins secreted from cells has detected STI1 and HSPs, which are likely secreted by nonconventional pathways (Keller et al., 2008). Indeed, the recombinant

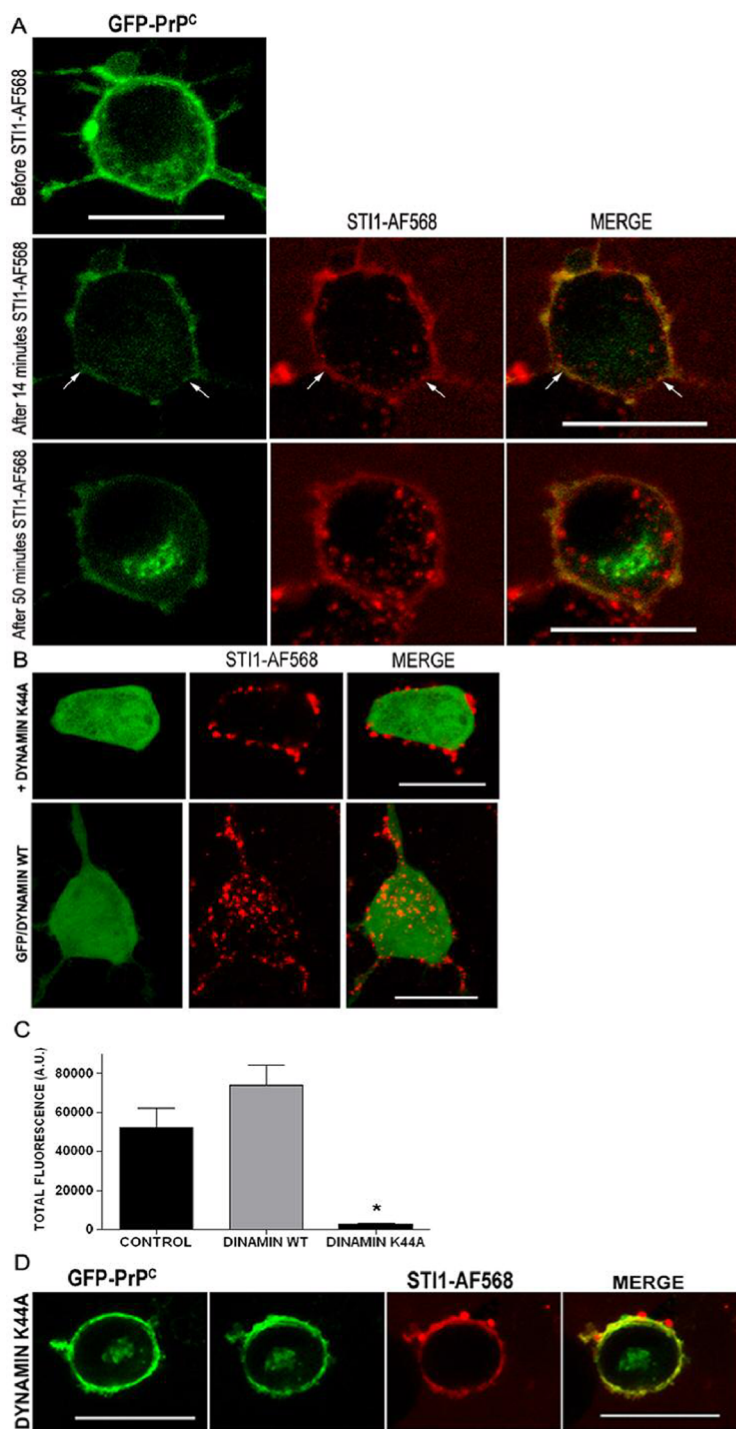


Figure 9. STI1 interacts with PrP^C predominantly at the cell surface. **A**, SN56 cells expressing GFP-PrP^C (green) were treated with 1 μ M STI1-AF568 (red) for distinct periods of time at 37°C. Images are representative five independent experiments with multiple dishes in which 40 and 12 cells were analyzed. Arrows indicate colocalization spots between GFP-PrP^C (green) and STI1 (red) in forming vesicles. **B**, SN56 cells were cotransfected with the constructs GFP and dynamin I K44A (top row) or wild-type (WT) dynamin I (bottom row), and living cells were incubated with 1 μ M STI1-AF568 for 40 min at 37°C. **C**, Quantitative analysis of the STI1-AF568 internalization in the presence of dynamin I K44A. Quantification was done using ImageJ software (control, $n = 27$ cells; dynamin I, $n = 67$ cells; dynamin I K44A, $n = 85$ cells) by scoring every cell for the total values of fluorescence internalized. The results are the mean values of fluorescence per cell from multiple dishes examined on 3 different days. Error bars represent SEM. For these experiments, a Kruskal-Wallis one-way ANOVA was used ($H = 120$; $p < 0.001$) followed by a Dunn's *post hoc* test ($*p < 0.05$). A.U., Arbitrary units. **D**, SN56 cells coexpressing GFP-PrP^C and dynamin I K44A were treated with 1 μ M STI1-AF568 at 37°C. Z-series were acquired before (GFP-PrP^C) and 40 min after (second to fourth panels) treatment with STI1. Images are representative of four independent experiments in which 15 cells were analyzed. Scale bars, 20 μ m.

STI1 used in the current experiments mimics the extracellular secreted STI1 and induced PrP^C-mediated signal transduction, as expected, for a neurotrophic factor.

It is well known that the association between neurotrophic factors and cell-surface receptors induces diverse cellular signals. Some are triggered as the ligand binds to its cognate receptor at the cell surface, and others depend on the internalization of the receptor–ligand complex, a process known as endosomal signal transduction (Gonzalez-Gaitan, 2003). Indeed, evaluation of STI1 intracellular trafficking as well as its role on PrP^C internalization is of particular interest to understand cell signaling associated with the neurotrophic functions mediated by PrP^C–STI1 interaction. Previously, endocytosis of PrP^C had been linked to a pro-apoptotic activity mediated by p53 (Sunyach and Checler, 2005), but agonists that activate this process are unknown. Recently, it has been shown that signaling derived from STI1–PrP^C interactions and associated with proliferation of glioblastoma cells depends on general cellular endocytic activity (Americo et al., 2007; Erlich et al., 2007). The present study identifies a mechanism by which PrP^C is internalized and revealed that the endocytosis of PrP^C is a determinant of STI1-induced cellular signaling. These observations raise the possibility that other events of PrP^C-mediated signaling, such as those elicited by interaction with neural cell adhesion molecule (Santuccione et al., 2005) or antibody cross-linking of PrP^C (Mouillet-Richard et al., 2000; Stuermer et al., 2004), may also depend on the endocytosis of PrP^C. Recent observations have determined that hemin also interacts with PrP^C to induce endocytosis (Lee et al., 2007).

In addition to the downregulation of cell signaling (Drake et al., 2006), endocytosis of cell-surface receptors provides for the activity of signaling endosomes (Luttrell et al., 1999; Lefkowitz and Whalen, 2004). Similar to the dichotomous nature of signal transduction by β 2-adrenergic receptors (Daaka et al., 1998), activation of PKA appears to be independent of the endocytosis of PrP^C, whereas ERK1/2 appears to be highly dependent on PrP^C internalization. ERK1/2 activation mediated by PrP^C–STI1 interaction is known to promote neuronal differentiation (Lopes et al., 2005) and synaptic plasticity (Lopes et al., 2005; Coitinho et al., 2007). Further details on the mechanism of activation of the ERK pathway by STI1 should help clarify this biologically relevant neurotrophic role of PrP^C.

Our data revealed that extracellular STI1 is also internalized by endocytosis. The site that STI1 binds for its entry in cells has not been identified, but the experiments with the mutant STI1_{Δ230–245} and with *Prnp*^{0/0} neurons conclusively discarded the need of PrP^C for STI1 entry in cells. Colocalization experiments implicate lipid raft-derived organelles in the intracellular trafficking of STI1. Although we found that a small fraction of fluorescent STI1 colocalizes with clathrin-coated vesicles, STI1 was not found in classical early endosomes in living cells. In contrast, a significant portion of the protein was found in flotillin-derived vesicles. Flotillin1-positive vesicles were proposed to differ from caveolae-derived vesicles (Glebov et al., 2006), but both likely originate from lipid raft-derived regions of the membrane (Harder and Simons, 1997). In agreement with these results, fluorescent STI1 also accumulates in acidic organelles that recruit GFP-Rab7, a marker of late endosomes/lysosomes. In this aspect, internalized STI1 presents a remarkable similarity to fluorescent PrP^{res}, which was recently shown to be sequestered in SN56 cells in Rab7-positive acidic organelles (Magalhães et al., 2005).

Intracellular trafficking of GPI-anchored proteins is complex, and these proteins can follow distinct pathways depending on the cell type (Fivaz et al., 2002). Despite reports suggesting internalization of PrP^C via caveolae (Peters et al., 2003), overwhelming evidence favors a model of endocytosis of PrP^C via clathrin-coated vesicles (Shyng et al., 1994; Sunyach et al., 2003; Taylor et al., 2005). Recently, an essential role in the endocytosis of PrP^C has been ascribed to the low-density lipoprotein receptor-like protein (LRP1) (Morris et al., 2006; Taylor and Hooper, 2006; Parkyn et al., 2008), by allowing PrP^C to enter clathrin-coated vesicles. In addition, LRP1 appears to have a role in the surface trafficking of PrP^C (Parkyn et al., 2008). Dynamin I dominant-negative mutant K44A blocks both clathrin-mediated endocytosis and caveolae-mediated endocytosis (Henley et al., 1998; Nichols and Lippincott Schwartz, 2001; Conner and Schmid, 2003). We found that dynamin I K44A suppressed the endocytosis of both STI1 and PrP^C. Furthermore, the use of dynamin I K44A revealed that interaction of STI1 and PrP^C at the cell surface has a transient nature, but inhibition of endocytosis allowed the identification of an intermediate step in which the two proteins appear to remain together.

A likely scenario to explain these results is that STI1 binds to PrP^C at the cell surface and this triggers the interaction of the complex with unknown plasma membrane components that may mediate signaling by PKA. Simultaneously, PrP^C endocytosis is triggered, and that may lead to a new set of interactions, perhaps involving LRP1 or other proteins that can help PrP^C to piggyback to clathrin-coated vesicles, which may be important to cause ERK1/2 activation. Indeed, LRP1 has been shown to link cellular activation to ERK signaling (Orr et al., 2003) and is therefore a likely candidate to participate in this process for STI1–PrP^C. Thereafter, STI1 and PrP^C appear to follow parallel pathways downstream into the cells.

The physiological roles for STI1–PrP^C signaling *in vivo* remain to be established (see (Linden et al., 2008)). However, it is of remarkable interest that expression of truncated forms of PrP^C in a PrP-null background has been consistently shown to cause neurodegeneration in transgenic mice (Shmerling et al., 1998; Baumann et al., 2007; Li et al., 2007). This intriguing phenotype resembles some of the alterations in prion disorders and can be mitigated by expression of wild-type PrP^C in transgenic mice (Shmerling et al., 1998; Baumann et al., 2007; Li et al., 2007). The binding site of STI1 onto PrP^C (amino acids 113–128) (Zanata et al., 2002) is lacking in all truncated proteins that produce this

phenotype (Shmerling et al., 1998; Baumann et al., 2007), including a recently described mouse line with a deletion in amino acids 105–125 of PrP^C (Li et al., 2007). Future experiments should unravel whether the mechanisms described here for STI1-mediated PrP^C signaling contribute to such phenotypes.

References

- Americo TA, Chiarini LB, Linden R (2007) Signaling induced by hop/STI-1 depends on endocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* 358:620–625.
- Barbosa Jr J, Ferreira LT, Martins-Silva C, Santos MS, Torres GE, Caron MG, Gomez MV, Ferguson SS, Prado MA, Prado VF (2002) Trafficking of the vesicular acetylcholine transporter in SN56 cells: a dynamin-sensitive step and interaction with the AP-2 adaptor complex. *J Neurochem* 82:1221–1228.
- Baron GS, Magalhães AC, Prado MAM, Caughey B (2006) Mouse-adapted scrapie infection of SN56 cells: greater efficiency with microsome-associated versus purified PrP-res. *J Virol* 80:2106–2117.
- Baumann F, Tolnay M, Brabeck C, Pahnke J, Kloz U, Niemann HH, Heikenwalder M, Rulicke T, Burkle A, Aguzzi A (2007) Lethal recessive myelin toxicity of prion protein lacking its central domain. *EMBO J* 26:538–547.
- Bucci C, Thomsen P, Nicoziani P, McCarthy J, van Deurs B (2000) Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell* 11:467–480.
- Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356:577–582.
- Caughey B, Baron GS (2006) Prions and their partners in crime. *Nature* 443:803–810.
- Caughey B, Raymond GJ (1991) The Scrapie-associated form of Prp is made from a cell-surface precursor that is both protease-sensitive and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem* 266:18217–18223.
- Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R (2002) Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J* 21:3317–3326.
- Coitinho AS, Lopes MH, Hajj GN, Rossato JI, Freitas AR, Castro CC, Cammarota M, Brentani RR, Izquierdo I, Martins VR (2007) Short-term memory formation and long-term memory consolidation are enhanced by cellular prion association to stress-inducible protein 1. *Neurobiol Dis* 26:282–290.
- Conner SD, Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422:37–44.
- Daaka Y, Luttrell LM, Ahn S, la Rocca GJ, Ferguson SS, Caron MG, Lefkowitz RJ (1998) Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273:685–688.
- Drake MT, Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2006) Trafficking of G protein-coupled receptors. *Circ Res* 99:570–582.
- Erlich RB, Kahn SA, Lima FR, Muras AG, Martins RA, Linden R, Chiarini LB, Martins VR, Moura Neto V (2007) STI1 promotes glioma proliferation through MAPK and PI3K pathways. *Glia* 55:1690–1698.
- Eustace BK, Jay DG (2004) Extracellular roles for the molecular chaperone, hsp90. *Cell Cycle* 3:1098–1100.
- Evdonin AL, Martynova MG, Bystrova OA, Guzhova IV, Margulis BA, Medvedeva ND (2006) The release of Hsp70 from A431 carcinoma cells is mediated by secretory-like granules. *Eur J Cell Biol* 85:443–455.
- Fivaz M, Vilbois F, Thurnheer S, Pasquali C, Abrami L, Bickel PE, Parton RG, van der Goot FG (2002) Differential sorting and fate of endocytosed GPI-anchored proteins. *EMBO J* 21:3989–4000.
- Gaidarov I, Santini F, Warren RA, Keen JH (1999) Spatial control of coated-pit dynamics in living cells. *Nat Cell Biol* 1:1–7.
- Glebov OO, Bright NA, Nichols BJ (2006) Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 8:46–54.
- Gonzalez-Gaitan M (2003) Signal dispersal and transduction through the endocytic pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:213–224.
- Guzhova I, Kislyakova K, Moskaliyova O, Fridlanskaya I, Tytell M, Cheetham M, Margulis B (2001) In vitro studies show that Hsp70 can be released by glia and that exogenous Hsp70 can enhance neuronal stress tolerance. *Brain Res* 914:66–73.
- Hammond DN, Lee HJ, Tonsgard JH, Wainer BH (1990) Development and characterization of clonal cell lines derived from septal cholinergic neurons. *Brain Res* 512:190–200.

- Harder T, Simons K (1997) Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol* 9:534–542.
- Henley JR, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA (1998) Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol* 141:85–99.
- Hernandez MP, Sullivan WP, Toft DO (2002) The assembly and intermolecular properties of the hsp70-Hsp90 molecular chaperone complex. *J Biol Chem* 277:38294–38304.
- Honore B, Leffers H, Madsen P, Rasmussen HH, Vandekerckhove J, Celis JE (1992) Molecular cloning and expression of a transformation-sensitive human protein containing the TPR motif and sharing identity to the stress-inducible yeast protein STI1. *J Biol Chem* 267:8485–8491.
- Houenou LJ, Li L, Lei M, Kent CR, Tytell M (1996) Exogenous heat shock cognate protein Hsc 70 prevents axotomy-induced death of spinal sensory neurons. *Cell Stress Chaperones* 1:161–166.
- Keller M, Ruegg A, Werner S, Beer HD (2008) Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* 132:818–831.
- Lassle M, Blatch GL, Kundra V, Takatori T, Zetter BR (1997) Stress-inducible, murine protein mSTI1. Characterization of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different kinases. *J Biol Chem* 272:1876–1884.
- Lee KS, Magalhães AC, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Prado MAM (2001) Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. *J Neurochem* 79:79–87.
- Lee KS, Raymond LD, Schoen B, Raymond GJ, Kett L, Moore RA, Johnson LM, Taubner L, Speare JO, Onwubiko HA, Baron GS, Caughey WS, Caughey B (2007) Hemin interactions and alterations of the subcellular localization of prion protein. *J Biol Chem* 282:36525–36533.
- Lefkowitz RJ, Whalen EJ (2004) beta-arrestins: traffic cops of cell signaling. *Curr Opin Cell Biol* 16:162–168.
- Li A, Christensen HM, Stewart LR, Roth KA, Chiesa R, Harris DA (2007) Neonatal lethality in transgenic mice expressing prion protein with a deletion of residues 105–125. *EMBO J* 26:548–558.
- Lima FR, Arantes CP, Muras AG, Nomizo R, Brentani RR, Martins VR (2007) Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. *J Neurochem* 103:2164–2176.
- Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR (2008) Physiology of the prion protein. *Physiol Rev* 88:673–728.
- Lopes MH, Hajj GN, Muras AG, Mancini GL, Castro RM, Ribeiro KC, Brentani RR, Linden R, Martins VR (2005) Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neurogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *J Neurosci* 25:11330–11339.
- Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK, Caron MG, Lefkowitz RJ (1999) Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 283:655–661.
- Magalhães AC, Silva JA, Lee KS, Martins VR, Prado VF, Ferguson SSG, Gomez MV, Brentani RR, Prado MAM (2002) Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. *J Biol Chem* 277:33311–33318.
- Magalhães AC, Baron GS, Lee KS, Steele-Mortimer O, Dorward D, Prado MA, Caughey B (2005) Uptake and neuritic transport of scrapie prion protein coincident with infection of neuronal cells. *J Neurosci* 25:5207–5216.
- Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J (1994) 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol* 8:121–127.
- Martins VR, Linden R, Prado MAM, Walz R, Sakamoto AC, Izquierdo I, Brentani RR (2002) Cellular prion protein: on the road for functions. *FEBS Lett* 512:25–28.
- Morris RJ, Parkyn CJ, Jen A (2006) Traffic of prion protein between different compartments on the neuronal surface, and the propagation of prion disease. *FEBS Lett* 580:5565–5571.
- Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chébassier C, Laplanche JL, Lehmann S, Launay JM, Kellermann O (2000) Signal transduction through prion protein. *Science* 289:1925–1928.
- Nichols BJ, Lippincott-Schwartz J (2001) Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol* 11:406–412.
- Orr AW, Pedraza CE, Pallero MA, Elzie CA, Goicoechea S, Strickland DK, Murphy-Ullrich JE (2003) Low density lipoprotein receptor-related protein is a calreticulin coreceptor that signals focal adhesion disassembly. *J Cell Biol* 161:1179–1189.
- Parkyn CJ, Vermeulen EG, Mootoosamy RC, Sunyach C, Jacobsen C, Oxvig C, Moestrup S, Liu Q, Bu G, Jen A, Morris RJ (2008) LRP1 controls biosynthetic and endocytic trafficking of neuronal prion protein. *J Cell Sci* 121:773–783.
- Parsell DA, Lindquist S (1993) The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 27:437–496.
- Peters PJ, Mironov Jr A, Peretz D, van Donselaar E, Leclerc E, Erpel S, DeArmond SJ, Burton DR, Williamson RA, Vey M, Prusiner SB (2003) Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J Cell Biol* 162:703–717.
- Pimpinelli F, Lehmann S, Maridonneau-Parini I (2005) The scrapie prion protein is present in flotillin-1-positive vesicles in central- but not peripheral-derived neuronal cell lines. *Eur J Neurosci* 21:2063–2072.
- Prusiner SB (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13363–13383.
- Ribeiro FM, Black SA, Cregan SP, Prado VF, Prado MA, Rylett RJ, Ferguson SS (2005) Constitutive high-affinity choline transporter endocytosis is determined by a carboxyl-terminal tail dileucine motif. *J Neurochem* 94:86–96.
- Robinson MB, Tidwell JL, Gould T, Taylor AR, Newbern JM, Graves J, Tytell M, Milligan CE (2005) Extracellular heat shock protein 70: a critical component for motoneuron survival. *J Neurosci* 25:9735–9745.
- Samaia HB, Brentani RR (1998) Can loss-of-function prion-related diseases exist? *Mol Psychiatry* 3:196–197.
- Santos MS, Barbosa Jr J, Veloso GS, Ribeiro F, Kushmerick C, Gomez MV, Ferguson SS, Prado VF, Prado MA (2001) Trafficking of green fluorescent protein-tagged vesicular acetylcholine transporter to varicosities in a cholinergic cell line. *J Neurochem* 78:1104–1113.
- Santuccione A, Sytnyk V, Leshchynska I, Schachner M (2005) Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *J Cell Biol* 169:341–354.
- Shmerling D, Hegyi I, Fischer M, Blattler T, Brandner S, Gotz J, Rulicke T, Flechsig E, Cozzio A, von Mering C, Hangartner C, Aguzzi A, Weissmann C (1998) Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell* 93:203–214.
- Shyng SL, Heuser JE, Harris DA (1994) A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J Cell Biol* 125:1239–1250.
- Shyng SL, Moulder KL, Lesko A, Harris DA (1995) The N-terminal domain of a glycolipid-anchored prion protein is essential for its endocytosis via clathrin-coated pits. *J Biol Chem* 270:14793–14800.
- Stuermer CA, Langhorst MF, Wiechers MF, Legler DF, Von Hanwehr SH, Guse AH, Plattner H (2004) PrP capping in T cells promotes its association with the lipid raft proteins reggie-1 and reggie-2 and leads to signal transduction. *FASEB J* 18:1731–1733.
- Sunyach C, Checler F (2005) Combined pharmacological, mutational and cell biology approaches indicate that p53-dependent caspase 3 activation triggered by cellular prion is dependent on its endocytosis. *J Neurochem* 92:1399–1407.
- Sunyach C, Jen A, Deng J, Fitzgerald KT, Frobert Y, Grassi J, McCaffrey MW, Morris R (2003) The mechanism of internalization of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored prion protein. *EMBO J* 22:3591–3601.
- Taylor DR, Hooper NM (2006) The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) mediates the endocytosis of the cellular prion protein. *Biochem J* 402:17–23.
- Taylor DR, Watt NT, Perera WS, Hooper NM (2005) Assigning functions to distinct regions of the N-terminus of the prion protein that are involved in its copper-stimulated, clathrin-dependent endocytosis. *J Cell Sci* 118:5141–5153.
- Tidwell JL, Houenou LJ, Tytell M (2004) Administration of Hsp70 in vivo inhibits motor and sensory neuron degeneration. *Cell Stress Chaperones* 9:88–98.
- Vieira AV, Lamaze C, Schmid SL (1996) Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science* 274:2086–2089.
- Weissmann C (1999) Molecular genetics of transmissible spongiform encephalopathies. *J Biol Chem* 274:3–6.
- Westergaard L, Christensen HM, Harris DA (2007) The cellular prion protein (PrP^C): its physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta* 1772:629–644.
- Yu Q, Kent CR, Tytell M (2001) Retinal uptake of intravitreally injected Hsc/Hsp70 and its effect on susceptibility to light damage. *Mol Vis* 7:48–56.
- Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, Hajj GN, Chiarini LB, Nomizo R, Freitas AR, Cabral AL, Lee KS, Juliano MA, de Oliveira E, Jachieri SG, Burlingame A, Huang L, Linden R, Brentani RR, Martins VR (2002) Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J* 21:3307–3316.

Metabotropic glutamate receptors transduce signals for neurite outgrowth after binding of the prion protein to laminin γ 1 chain

Flavio H. Beraldo,^{*,||,1} Camila P. Arantes,^{*,†,1} Tiago G. Santos,^{*,‡}
Cleiton F. Machado,^{*,‡} Martin Roffe,[§] Gláucia N. Hajj,^{*} Kil S. Lee,^{*}
Ana C. Magalhães,^{||} Fabiana A. Caetano,^{||,#} Gabriel L. Mancini,^{*} Marilene H. Lopes,^{*}
Tatiana A. Américo,^{**} Margaret H. Magdesian,^{††} Stephen S. G. Ferguson,^{||}
Rafael Linden,^{**} Marco A. M. Prado,^{||,1,2} and Vilma R. Martins^{*,2}

^{*}Ludwig Institute for Cancer Research, Hospital Alemão Oswaldo Cruz, São Paulo, Brazil;

[†]Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil;

[‡]Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital A.C. Camargo, São Paulo, Brazil; [§]Departamento de Microbiologia, Imunologia, e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil;

^{||}J. Allyn Taylor Centre for Cell Biology, Molecular Brain Research Group, Robarts Research Institute, and Department of Physiology and Pharmacology, and ¹Department of Anatomy and Cell Biology, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada; [#]Program in Molecular Pharmacology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; and ^{**}Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho and ^{††}Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ABSTRACT The prion protein (PrP^C) is highly expressed in the nervous system, and its abnormal conformer is associated with prion diseases. PrP^C is anchored to cell membranes by glycosylphosphatidylinositol, and transmembrane proteins are likely required for PrP^C-mediated intracellular signaling. Binding of laminin (Ln) to PrP^C modulates neuronal plasticity and memory. We addressed signaling pathways triggered by PrP^C-Ln interaction in order to identify transmembrane proteins involved in the transduction of PrP^C-Ln signals. The Ln γ 1-chain peptide, which contains the Ln binding site for PrP^C, induced neuritogenesis through activation of phospholipase C (PLC), Ca²⁺ mobilization from intracellular stores, and protein kinase C and extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) activation in primary cultures of neurons from wild-type, but not PrP^C-null mice. Phage display, coimmunoprecipitation, and colocalization experiments showed that group I metabotropic glutamate receptors (mGluR1/5) associate with PrP^C. Expression of either mGluR1 or mGluR5 in HEK293 cells reconstituted the signaling pathways mediated by PrP^C-Ln γ 1 peptide interaction. Specific inhibitors of these receptors impaired PrP^C-Ln γ 1 peptide-induced signaling and neuritogenesis. These data show that group I mGluRs are involved in the transduction of cellular signals triggered by PrP^C-Ln, and they support the notion that PrP^C participates in the assembly of multiprotein complexes with physiological functions on neurons.—Beraldo, F. H., Arantes, C. P., Santos, T. G., Machado, C. F., Roffe, M., Hajj, G. N., Lee, K. S., Magalhães, A. C., Caetano, F. A., Mancini, G. L., Lopes, M. H., Américo, T. A., Magdesian, M. H., Ferguson, S. S. G., Linden, R., Prado, M. A. M., Martins, V. R. Metabotropic glutamate receptors trans-

duce signals for neurite outgrowth after binding of the prion protein to laminin γ 1 chain. *FASEB J.* 25, 265–279 (2011). www.fasebj.org

Key Words: GPI-anchored proteins • G-coupled protein receptors • signal transduction • multiprotein complexes • neurotrophic signals

THE PRION PROTEIN (PrP^C) is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein, an abnormal conformer of which is the major component of prions, infectious agents that cause neurodegenerative diseases known as transmissible spongiform encephalopathies (TSEs). These illnesses affect humans and other mammals and present as sporadic, genetic, or infectious forms (1).

A number of potential physiological functions of PrP^C have been described that are likely to be of importance for both neuronal function and neurodegenerative diseases (2). PrP^C has neuroprotective properties against oxidative insults and injury and is associated with neuronal differentiation (2). Recently, a role

¹ These authors contributed equally to this work.

² Correspondence: V.R.M., Ludwig Institute for Cancer Research, Rua João Julião 245 1A, São Paulo, SP 01323-903, Brazil. E-mail vmartins@ludwig.org.br; M.A.M.P., Robarts Research Institute, University of Western Ontario, P.O. Box 5015, 100 Perth Dr. London, ON N6A 5K8, Canada. E-mail mprado@robarts.ca.

doi: 10.1096/fj.10-161653

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.

for PrP^C in the production of amyloid β -peptide (A β) (3) and as a receptor for A β oligomers in neurotoxicity and synaptic plasticity were demonstrated (4, 5), thus implicating PrP^C in Alzheimer's disease (AD). However, the effects of A β peptides on synaptic plasticity are still a matter of controversy (6–8).

Certain functions of PrP^C are associated with its binding to specific proteins. We showed that PrP^C binds to stress inducible protein 1 (STI1) to mediate neuronal survival and differentiation, *via* the activation of cAMP-dependent protein kinase (PKA) and extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) signaling pathways, respectively (9–11). Neuronal differentiation is also induced by interaction of PrP^C with neuronal cell adhesion molecule (NCAM) (12).

PrP^C interacts with laminin (Ln), an extracellular matrix protein, with high affinity ($K_d=2\times 10^{-8}$ M) (13). The binding site for Ln maps to aa 1575–1584 (RNIAEIIKDI) in the Ln γ 1 chain (13), and to aa 170–178 in PrP^C (both sequences for the mouse molecules) (14). The Ln γ 1 peptide representing the PrP^C binding site, referred to here as the Ln γ 1 peptide, induces PrP^C-dependent neuritogenesis and reproduces the neuronal differentiation phenotype promoted by the binding of Ln to PrP^C (13). In agreement with the idea that PrP^C-Ln γ 1 peptide interaction induces physiological signals in the nervous system, it has been demonstrated that the interaction enhances memory consolidation (14). The Ln γ 1 chain is highly expressed in both neocortical and hippocampal rat neurons and participates in neuronal differentiation *in vitro* (15–17). Recent experiments have confirmed a role for the Ln γ 1 chain *in vivo*, as mice with targeted deletion of the Ln γ 1 chain in the cerebral cortex present defects in neuritogenesis and neuronal migration (18). Potential signaling pathways that are induced by Ln γ 1 *via* integrins have been previously explored (18), but those modulated *via* PrP^C have not yet been examined.

The fact that PrP^C is a GPI-anchored protein suggests that the transduction of PrP^C-mediated extracellular signals requires the interaction of PrP^C with integral transmembrane proteins. In the present work, primary hippocampal neurons were used to study signals induced by the interaction of PrP^C with the Ln γ 1 peptide. We report that the interaction of the Ln γ 1 peptide with PrP^C results in the activation of phospholipase C (PLC), leading to increases in intracellular Ca²⁺ concentrations, and the activation of protein kinase C (PKC). This observation suggests the potential participation of a G α_q -coupled G-protein-coupled receptor (GPCR) in Ln γ 1 peptide-induced PrP^C signaling. Indeed, our results show that PrP^C associates with group I metabotropic glutamate receptors (mGluR1 or mGluR5), which transduce cellular signals on Ln γ 1 peptide binding to PrP^C. These data uncover an unexpected role for mGluRs in PrP^C-dependent activation of neuronal differentiation.

MATERIALS AND METHODS

Peptides and chemicals

Ln γ 1 peptide (RNIAEIIKDI) linked to BSA, Ln γ 1 peptide where KDI domain was changed to GGG (RNIAEIIIGGG), and Ln γ 1 scrambled (SCR) peptide (IRADIEIKID) and caldendrina (RDIRRIIRDV) peptide were synthesized by GenScript Corp. (Piscataway, NJ, USA) and NeoMPS SA (Strasbourg, France). MAPK/extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase (MEK) inhibitor 1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis (2-aminophenylthio) butadiene (U0126) was obtained from Promega (Madison, WI, USA), PKA inhibitor KT5720, PKC inhibitors chelerythrine chloride (CHE) and bisindolylmaleimide I (BIM), PLC inhibitor U73122, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), and phosphodiesterase inhibitor 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) were obtained from Calbiochem (La Jolla, CA, USA). The PKA activator (forskolin) and the PKC activator (PMA) were purchased from LC Laboratories (Woburn, MA, USA). The L-type calcium channel blocker (nifedipine), InsP₃ receptor blocker 2-aminoethoxydiphenyl borate (2APB), Ca²⁺ ATPase inhibitor [thapsigargin (THG)], and bradykinin (BK) B2 receptor antagonist (HOE 140) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The Q-type Ca²⁺ channel blocker ω -conotoxin MCVII was from Latoxan (Valence, France). Store-operated channel (SOC) inhibitor (SKF 96365), the group I metabotropic agonist s(S)-3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG) or quisqualate (QUI), mGluR1 inhibitor (LY367385), and mGluR5 blocker 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP) were from Tocris Biociences (Ellisville, MO, USA). BK (H-Arg-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-OH) was from Bachem (Torrance, CA, USA).

Animals

The experiments were done using neurons derived from PrP^C-null mice (*Pmp*^{0/0}), descendants from the ZrchI line (19) provided by Dr. Charles Weissmann (Scripps Florida, Jupiter, FL, USA). Their wild-type controls (*Pmp*^{+/+}) were generated by crossing F1 descendants from 129/SV and C57BL/6J matings. The Ca²⁺ signaling experiments were also done with a second PrP^C-null mouse strain, *Pmp*^{-/-} (Npu) (20) provided by Drs. Bruce Chesebro and Richard Race (Rocky Mountain Laboratories, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Hamilton, MT, USA). These animals were backcrossed to C57BL/10 mice for at least 15 generations. Heterozygous animals were mated and homozygous F1 descendants from the same littermate crossed to generate PrP^C-null (*Pmp*^{-/-}) embryos and their respective wild-type controls (*Pmp*^{wt/wt}). All studies were conducted in accordance with U.S. National Institutes of Health (NIH) guidelines for the care and use of animals, and with animal protocols approved by the Institutional Animal Care and Use Committees of the A.C. Camargo Hospital and the University of Western Ontario.

Neuritogenesis assays

Primary cultures of hippocampal neurons from E17 wild-type (*Pmp*^{+/+}) or PrP^C-null mice (*Pmp*^{0/0}) were obtained as described previously (11). The cells (4×10^4) were plated onto coverslips (13 mm²) coated with 5 μ g/ml of poly-L-lysine or 37 μ M of BSA Ln γ 1 peptide, Ln γ 1 peptide GGG, Ln γ 1 SCR peptide, or caldendrin (CAL) peptide and incubated by 24 h at 37°C and 5% CO₂ atmosphere. Neuritogenesis mediated by Ln γ 1 peptide was also estimated on cell treatment with specific signaling pathway inhibitors: U0126 (10 μ M),

KT5720 (60 nM), BIM (0.5 μ M), CHE (100 μ M), or U73122 (1 μ M). The participation of metabotropic receptors in the neurogenesis mediated by Ln γ 1 peptide was tested in cells treated with the mGluR1/R5 agonist DHPG (100 μ M) and/or antagonists of mGluR1, LY367385 (100 μ M), and mGluR5, MPEP (10 μ M). Cells were preincubated with signaling pathway inhibitors or mGluR1/5 antagonists for 30 min before Ln γ 1 peptide treatment. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in 0.12 M sucrose in PBS for 20 min at room temperature, washed 3 times with PBS, and stained with hematoxylin.

Morphometric analysis was done using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA) and the Neuron J plug in. The analyzed parameters were percentage of cells with neurites, number of neurites/cell (total number of neurites/number of cells with neurites), and mean length of neurites. A total of ~200 cells were analyzed per sample.

Immunofluorescence

Pmp^{+/+} neurons were plated on glass coverslips, fixed with 4% paraformaldehyde and 0.12 M sucrose in PBS, and permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 5 min at room temperature (RT). After rinsing with PBS, cells were blocked with PBS plus 5% BSA and labeled with anti- β -tubulin antibodies (1:100; Chemicon/Millipore, Billerica, MA, USA) for 1 h. The reaction proceeded by incubation with a secondary antibody, anti-mouse Alexa Fluor 546 (1:1000; Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) followed by nuclear staining with 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI; 1:1000). Coverslips were mounted on slides using Fluorsave reagent (Calbiochem/Merck, Darmstadt, Germany). Immunolabeled cells were imaged with a Bio-Rad Radiance 2100 laser scanning confocal system running the software Laser Sharp 3.0 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), coupled to a Nikon TE2000-U microscope (Nikon, Melville, NY, USA). Green HeNe (543 nm) and blue diode (405 nm) lasers were used to excite the fluorophores.

PKC activity

Primary hippocampal (1×10^6 cells) neurons from *Pmp^{+/+}* or *Pmp^{0/0}* mice were cultured onto poly-L-lysine and incubated with Ln γ 1 peptide (37 μ M) at different time points (0.5 to 30 min). Control treatment with PMA (50 nM) was performed for 20 min at RT. Cells were also preincubated either with or without U0126 (10 μ M), KT5720 (60 nM), BIM (0.5 μ M), U73122 (1 μ M) for 30 min at 37°C, followed by Ln γ 1 peptide (37 μ M), Ln γ 1 peptide GGG, or Ln γ 1 SCR peptide for 1 min at RT. PKC activity in response to Ln γ 1 peptide treatment was also evaluated in cells incubated with antagonists of mGluR1, LY367385 (100 μ M), and mGluR5, MPEP (10 μ M). In control experiments, cells were treated with the mGluR1/5 agonist DHPG (100 μ M). Cells were washed with PBS and homogenized in ice-cold extraction buffer (150 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, and 25 mM Tris-HCl, pH 7.4) plus Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim, Germany). Cellular debris was removed by centrifugation at 6000 g for 10 min. The PKC activity was measured by incorporation of [³²P] γ -ATP to a PKC-specific substrate provided by the PKC assay system kit (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA). The reaction was done according to the manufacturer's instructions.

PKA activity

Primary hippocampal (1×10^6 cells) neurons from *Pmp^{+/+}* or *Pmp^{0/0}* mice were cultured onto poly-L-lysine and were pre-

incubated with 100 μ M IBMX for 1 h at 37°C, followed by either Ln γ 1 peptide (37 μ M), at different time points (0.5 to 10 min), or with forskolin (10 μ M) for 20 min at 37°C as a positive control. Cells were washed with cold PBS and homogenized in ice-cold extraction buffer (150 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, and 25 mM Tris-HCl, pH 7.4) plus Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Cellular debris was removed by centrifugation at 6000 g for 10 min. PKA activity was determined by [³²P] γ -ATP incorporation to a PKA-specific substrate provided by the PKA assay system kit (Upstate Biotechnology). The reaction was done according to the manufacturer's instructions.

ERK1/2 activity

Primary hippocampal (1×10^6 cells) neurons from *Pmp^{+/+}* or *Pmp^{0/0}* mice were plated on dishes pretreated with poly-L-lysine and stimulated with Ln γ 1-chain peptide (37 μ M) at various time points (0.5 to 30 min). Cells were also treated for 0.5 min with Ln γ 1 peptide (37 μ M) after a preincubation either with or without U0126 (10 μ M), KT5720 (60 nM), BIM (0.5 μ M), and U73122 (1 μ M) for 30 min. Cells were rinsed with ice-cold PBS and lysed in Laemmli buffer. Cell extracts were subjected to SDS-PAGE (10%), and proteins were transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were immersed in blocking solution (5% milk and 0.1% Tween 20 in TBS) for 1 h at RT and incubated with anti-phospho ERK1/2 (p44-p42) and anti-total-ERK1/2 antibodies (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) at 1:2000 dilution overnight at 4°C. Membranes were incubated with a peroxidase-coupled, goat anti-rabbit secondary antibody (1:2000; GE Healthcare, Little Chalfont, UK) in 5% milk/TBST for 1 h at RT, immersed in enhanced chemiluminescence (ECL) solution (GE Healthcare), and exposed to ECL-Hyperfilm (Amersham/GE Healthcare).

The bands obtained after X-ray film exposure to the membranes were analyzed by densitometric scanning and quantified using Scion Image software (Scion, Frederick, MD, USA). Values represent the ratio between phospho-ERK1/2 and total ERK1/2 for each sample.

Ca²⁺ signaling and data analysis

Hippocampal cell cultures (10^4 cells) from wild-type (*Pmp^{+/+}* and *Pmp^{wt/wt}*) or PrP^C-null mice (*Pmp^{0/0}* and *Pmp^{-/-}*) were plated onto poly-L-lysine (5 μ g/ml)-coated coverslips (35 mm) for 4 d. CF10, a PrP^C-null immortalized cell line, and its counterpart expressing 3F4-tagged mouse PrP^C (CF10-PrP3F4) were prepared as described previously (21). CF10 and CF10-PrP3F4 cells were plated onto coverslips and serum starved for 48 h before the experiments. Hippocampal neurons, CF10, and CF10-PrP3F4 cells were loaded with 10 μ M of the intracellular Ca²⁺ indicator Fluo-3 AM (Invitrogen) for 30 min at 37°C in the presence of neurobasal medium or Optimen (Invitrogen), respectively, supplemented with 2 mM CaCl₂. Cells were washed 3 times with HBSS (Invitrogen) and resuspended in Krebs buffer (124 mM NaCl, 4 mM KCl, 25 mM HEPES, 1.2 mM MgSO₄, and 10 mM glucose) supplemented with 2 mM CaCl₂. Ca²⁺-free experiments were performed in Krebs buffer without CaCl₂ plus 1 mM EGTA. Cells were preincubated in the presence or absence of SKF-96365 (25 μ M), of voltage-gated calcium channel (VGCC) inhibitors (1 μ M ω -conotoxin MCVII plus 50 μ M nifedipine), 2APB (50 μ M), U73122 (1 μ M), BK (1 μ M), HOE140 (1 μ M), DHPG (100 μ M), LY367385 (100 μ M), or MPEP (10 μ M) for 30 min. Hippocampal neurons were treated with 37 μ M Ln γ 1 peptide, Ln γ 1 peptide GGG, or Ln γ 1 SCR peptide, while CF10 and CF10-PrP^C cells received 120 μ M of these peptides.

In control experiments, cells were also treated with THG (1 μ M). All experiments were done at 37°C. Data acquisition was performed in a confocal Bio-Rad Radiance 2100/Nikon TE2000U microscope, with excitation at 488 nm (argon laser), and emission was collected with a 522- to 535-nm band-pass filter. The fluorescence was normalized as F_1/F_0 (F_1 , maximal fluorescence after drug addition; F_0 , basal fluorescence before drug addition). Software-based analysis (WCIF ImageJ, NIH) allowed fluorescence imaging in the selected cell as a function of time. Experiments were carried out with ≥ 3 distinct cell cultures, and 40–50 cells were monitored in each experiment. Traces represent a typical single cell response.

Transfection of HEK 293 cells with mGluR1 and mGluR5 and reconstitution of PrP^C-Ln γ 1 peptide signaling

Human embryonic kidney (HEK293) cells were maintained in MEM (Invitrogen) supplemented with 10% FBS, 100 IU penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cells were transfected using a modified calcium phosphate method with a plasmid expressing a mouse PrP^C (22) plus Flag-mGluR1a or Flag-mGluR5a cDNAs (23, 24). For Ca²⁺ experiments, HEK293 cells expressing PrP^C plus mGluR1a or mGluR5 were loaded with Fluo-3 AM (10 μ M) for 30 min at 37°C in MEM supplemented with 2 mM CaCl₂. Cells were then washed 3 times with HBSS and resuspended in Krebs buffer supplemented with 2 mM CaCl₂. Intracellular Ca²⁺ increases were analyzed using a Zeiss LSM-510 confocal microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) and defined as the relative change in cytoplasmic fluorescence intensity ratio F_1/F_0 , as described above. For PKC translocation experiments, HEK293 cells were transfected with PrP^C and GFP-PKC β II (24) alone or along with either mGluR1 or mGluR5 expression vectors and incubated in Krebs buffer supplemented with 2 mM CaCl₂. Cells were analyzed using Zeiss LSM 510 software as described previously (25). Briefly, a region of interest was delimited at the cell cytosol, and fluorescence intensity was evaluated over time. Translocation to the membrane was considered when there was a decrease in cytosolic fluorescence accompanied by an accumulation of fluorescence at the cell surface. As a positive control for PKC translocation (24, 25), at the end of each experiment, we used THG (1 μ M) for transfected cells with PrP^C alone and DHPG (100 μ M) or quisqualate (100 μ M) for mGluR1 and mGluR5, respectively (data not shown). A total of 36 cells from 4 independent transfections was analyzed for PrP^C, 33 cells for PrP^C, and mGluR1 and 18 cells for PrP^C and mGluR5.

Coimmunoprecipitation assay

HEK 293 cells were transfected with plasmids expressing a mouse PrP^C and Flag-mGluR1a or Flag-mGluR5a cDNAs as described above. At 2 d after transfection, 2–3 $\times 10^6$ cells were lysed in 250 μ l of 50 mM Tris HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5% Triton X-100, and protease inhibitors for 15 min on ice and two sonication pulses. Protein extracts (400 μ g) were precleared by incubating with 20 μ l of Protein-A Sepharose beads for 1 h at 4°C. Precleared extracts were incubated with 15 μ l of FLAG beads (Sigma-Aldrich) for 16 h at 4°C. Beads were washed 3 times with 50 mM Tris HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, and 1% Triton X-100, and proteins were eluted by incubating the beads with 15 μ g of FLAG peptide (Sigma-Aldrich) diluted in 100 μ l of 50 mM Tris HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, and 1.5 mM MgCl₂ for 10 min at room temperature. A fraction of

15% of the eluate was used on a 7% SDS-PAGE, followed by immunoblotting with anti-FLAG (Sigma-Aldrich). The remaining part of the eluate was used on a 12% SDS-PAGE, followed by immunoblotting with anti-PrP^C (9).

Colocalization with mGluRs

Primary hippocampal neurons were fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized with PBS plus 0.5% Triton X-100 for 5 min. Nonspecific epitopes were blocked by incubation with PBS plus 5% BSA for 1 h. Mouse anti-PrP^C (9), goat anti-PrP^C (Abcam, Cambridge, MA, USA), rabbit anti-mGluR5 (Millipore, Billerica, MA, USA), and mouse anti-mGluR1 (Millipore) were incubated for 16 h at room temperature in PBS plus 1% BSA. Anti-mouse Alexa 488 or 546, anti-rabbit Alexa 546, and anti-goat Alexa 546 were incubated for 1 h at room temperature in PBS with 1% BSA. Images were taken by confocal microscopy (Leica TCS SP5; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Statistical analysis

The statistical analyses were done using GraphPad Prism 4 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Results are represented as means \pm se, and the number of experiments performed for each test is stated in the respective figure legend. Data were compared by 1-way or 2-way ANOVA and Newman-Keuls *post hoc* test.

RESULTS

Signaling pathways involved in neuritogenesis are induced by Ln- γ 1 peptide interaction with PrP^C

We previously reported that PrP^C interacted with high affinity and specificity with Ln, leading to neuritogenesis. The Ln γ 1-chain peptide, RNIAEIIKDI, which contained the PrP^C binding site, fully reproduced this effect on interaction with PrP^C (13). The KDI domain of the γ 1-chain peptide was previously described to induce neuronal differentiation (17); therefore, we initially tested whether the KDI domain was the primary site of PrP^C interaction required for the promotion of neuritogenesis. Primary hippocampal cultures from either *Prnp*^{+/+} or *Prnp*^{0/0} mouse embryos (E17) were treated with 37 μ M Ln γ 1 peptide, a Ln γ 1 peptide where the tripeptide (KDI) was replaced with GGG, and a SCR Ln γ 1 peptide. Treatment of *Prnp*^{+/+} neurons with Ln γ 1 peptide induced an increase of up to 99 \pm 15% in the number of cells with neurites (neuronal growing process with >10 μ m) when compared to untreated neurons (plated over polylysine, PL, $P < 0.01$) (Fig. 1A, B and Supplemental Fig. S1A). Conversely, no effect of the peptide was observed in *Prnp*^{0/0} neurons (Fig. 1A), despite similar viability for cultures of the two genotypes (Supplemental Fig. S1A). The Ln γ 1 peptide with the KDI sequence replaced by GGG did not induce neuritogenesis, thus confirming the importance of this domain (17) and also demonstrating its participation in PrP^C-dependent differentiation. BLAST searches indicated that the Ln γ 1 peptide presents high homology to a domain found in CAL, a

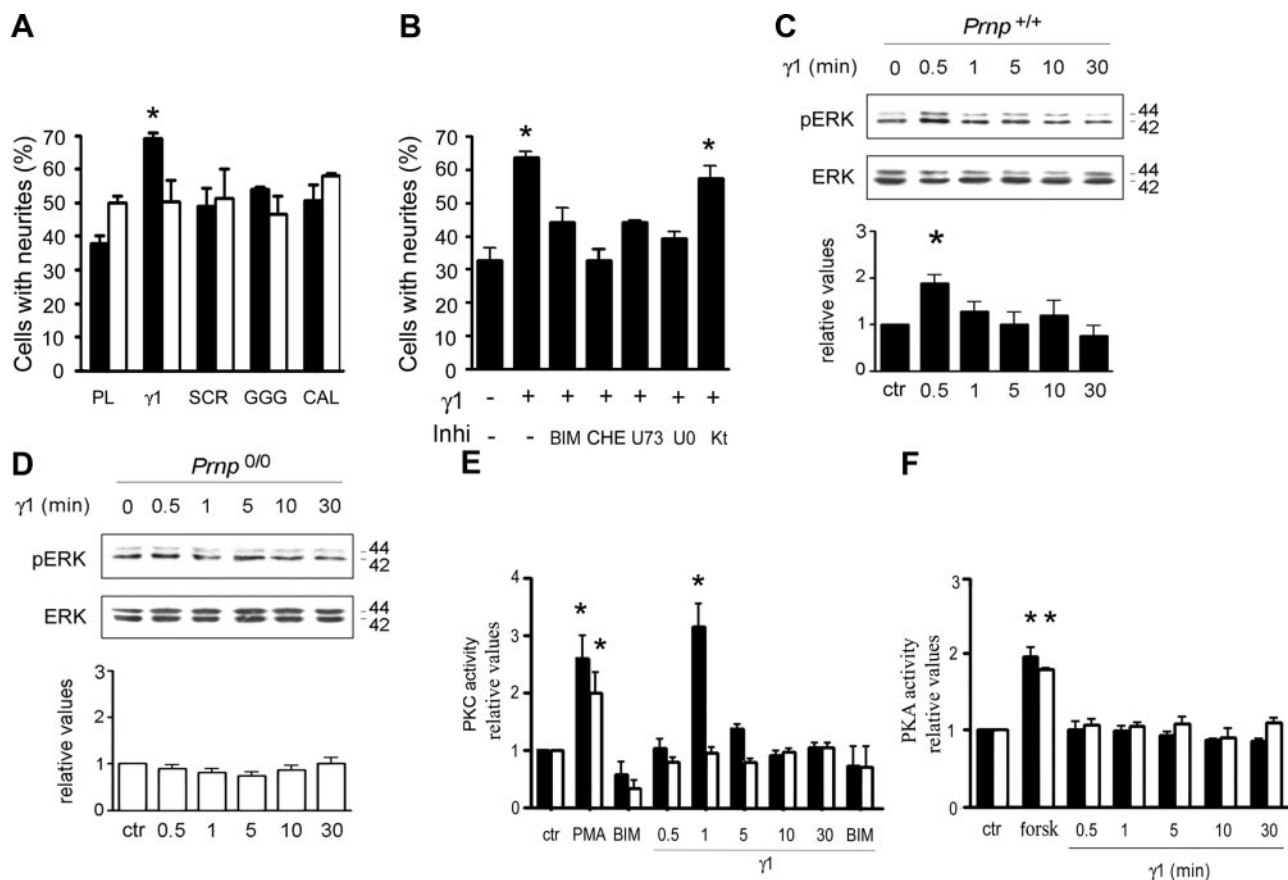


Figure 1. Ln $\gamma 1$ peptide interaction to the PrP^C-induced PLC, PKC, and ERK1/2-dependent neuritogenesis. *A*) Primary hippocampal neurons from *Pmp*^{+/+} (solid bars) or *Pmp*^{0/0} (open bars) mice were incubated with 37 μ M of either Ln $\gamma 1$ peptide ($\gamma 1$; $n=7$), SCR peptide ($n=3$), Ln $\gamma 1$ peptide where the KDI domain was modified (GGG; $n=4$) or a peptide from the CAL molecule ($n=3$). *B*) *Pmp*^{+/+} neurons were treated with Ln $\gamma 1$ peptide plus specific signaling inhibitors ($n=4$) for either PKC (0.5 μ M BIM and 100 μ M CHE), PLC (1 μ M U73), ERK1/2 (10 μ M UO) or PKA (60 nM Kt). *C, D*) Percentage of cells with neurites was quantified in each condition. ERK1/2 phosphorylation in *Pmp*^{+/+} ($n=4$; *C*) or in *Pmp*^{0/0} ($n=3$; *D*) neurons treated with Ln $\gamma 1$ peptide (37 μ M) at different time points (0.5 to 30 min) determined by immunoblotting with antibodies against ERK1/2 (ERK) or against the phosphorylated form of the enzyme (pERK). Relative levels of enzyme activity represent the ratio between phosphorylated ERK1/2 and total ERK, normalized to the untreated group (ctr). *E*) PKC activity in *Pmp*^{+/+} (solid bars) or *Pmp*^{0/0} neurons (open bars) treated or not (ctr) with Ln $\gamma 1$ peptide (37 μ M) at different time points (0.5 to 30 min; $n=4$). PMA was used as an internal control for PKC activation, and BIM is a specific PKC inhibitor ($n=4$). *F*) PKA activity in *Pmp*^{+/+} (solid bars) or *Pmp*^{0/0} neurons (open bars) treated with Ln $\gamma 1$ peptide at different time points (0.5 to 30 min; $n=3$). Forskolin (10 μ M Forsk) was used as an internal control of PKA activation ($n=3$). Results represent means \pm SE of independent experiments analyzed and compared by 2-way ANOVA and Newman-Keuls *post hoc* test (*A*) or 1-way ANOVA and Newman-Keuls *post hoc* test (*B, E, F*). *Statistical significance when compared to control cells without treatment, * $P < 0.01$ (*A*), * $P < 0.05$ (*B, C, E, F*) vs. control.

cytoplasmic calcium sensor protein highly expressed in neurons (26). However, the CAL homologue peptide had no effect on neuritogenesis (Fig. 1A). The SCR peptide, used as control, was also inactive on neuritogenesis (Fig. 1A). Thus, the effect of Ln $\gamma 1$ peptide was specific, mediated by PrP^C, and dependent on its KDI domain. We also evaluated other measures of neuritogenesis and found that PrP^C-Ln $\gamma 1$ peptide promoted an increase in the number of neurites per cell (total number of neurites/number of cells with neurites; Supplemental Fig. S1B, $P < 0.05$). However, the peptide did not affect the mean length of neurites (Supplemental Fig. S1C). These results were consistent with *in vivo* observations showing defects in neurite outgrowth and neuronal migration in mice deficient for $\gamma 1$ chain in neurons (18).

It was likely that interaction between the Ln $\gamma 1$ peptide and PrP^C triggered intracellular signal transduction cascades that promoted an increase in neuritogenesis. Therefore, an initial screen for the signaling pathway involved was conducted using a pharmacological approach. As illustrated in Fig. 1B, inhibition of either PLC (1 μ M U73122), PKC (0.5 μ M BIM or 100 μ M CHE), or ERK1/2 (10 μ M U0126) impaired the neurite outgrowth induced by Ln $\gamma 1$ peptide ($P < 0.05$), whereas the PKA inhibitor KT5720 (60 nM) had no effect on neuritogenesis. In addition, there was no effect on the percentage of cells with neurites and/or in the number of neurites per cell in cultures grown on polylysine and treated with the inhibitors alone (Supplemental Fig. S2A, B).

We next measured the activity of ERK1/2, PKC, and

PKA to test whether these pathways were activated in response to Ln γ 1 treatment. *Prnp*^{+/+} hippocampal neurons treated with 37 μ M Ln γ 1 peptide presented a rapid increase in ERK1/2 phosphorylation of both p42 and p44 forms ($P < 0.05$; Fig. 1C), whereas Ln γ 1 peptide treatment had no effect on *Prnp*^{0/0} neurons (Fig. 1D). Similarly, Ln γ 1 peptide promoted PKC activation only in neurons from *Prnp*^{+/+} mice ($P < 0.05$), an effect that was blocked by BIM (0.5 μ M; Fig. 1E). PMA (50 nM), a PKC activator, induced enzyme activity in both *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} neurons ($P < 0.05$; Fig. 1E). Conversely, the PKA pathway was not activated by Ln γ 1 peptide in neurons, while the PKA activator forskolin (10 μ M) promoted an increase on enzyme activity in both cell types ($P < 0.05$; Fig. 1F).

To define a sequence in which Ln γ 1 peptide treatment modulates ERK1/2 and PKC signaling, we examined both ERK1/2 and PKC activation in the presence of specific inhibitors. Treatment of neurons with the PLC inhibitor U73122 (1 μ M) blocked both phosphorylation (Fig. 2A) and PKC activity (Fig. 2B) induced by Ln γ 1 peptide ($P < 0.01$). In the presence of BIM (0.5 μ M), ERK1/2 phosphorylation was inhibited in *Prnp*^{+/+} neurons treated with Ln γ 1 peptide ($P < 0.01$; Fig. 2A). However, PKC activity in response to Ln γ 1 peptide treatment was unaffected when neurons were treated with the ERK1/2 inhibitor U0126 (10 μ M; Fig. 2B). Similar to the results obtained for the neuritogenesis studies (Fig. 1A), both the SCR and GGG peptides, as well as the PKA inhibitor KT5720, did not affect the activity of either ERK1/2 or PKC in neurons (Fig. 2A, B). Taken together, these results indicated that neuritogenesis induced by PrP^C interaction with Ln γ 1 peptide required sequential activation of PLC, followed by PKC and ERK1/2 activation.

Interaction of Ln γ -1 peptide with PrP^C increases intracellular Ca²⁺

The experiments above indicated that PrP^C-Ln γ 1 peptide interaction resulted in the activation of PLC, which is coupled to the release of intracellular Ca²⁺ stores (27). Therefore, we examined whether PrP^C-Ln

γ 1 peptide triggered the release of intracellular calcium in cultured neurons. Primary cultures of either *Prnp*^{+/+} or *Prnp*^{0/0} neurons were loaded with the intracellular Ca²⁺ dye Fluo 3 AM (10 μ M). The addition of Ln γ 1 peptide to *Prnp*^{+/+} neurons cultured in the presence of extracellular Ca²⁺ resulted in an increase in fluorescence of 320 \pm 12% above basal levels ($P < 0.05$; Fig. 3A, F). When Ca²⁺ was removed from culture medium, an increase in calcium response to the Ln γ 1 peptide was still detected (187 \pm 11% above basal levels, $P < 0.05$) but at significantly lower levels than in the presence of extracellular Ca²⁺ ($P < 0.05$; Fig. 3A, F). In contrast, no changes in intracellular Ca²⁺ concentrations were observed in *Prnp*^{0/0} hippocampal neurons treated with Ln γ 1 peptide (Fig. 3B, F). However, the treatment of the latter cells with THG (1 μ M), a blocker of the Ca²⁺-ATPase from endoplasmic reticulum, mobilized intracellular Ca²⁺ stores (Fig. 3B), indicating that these stores were available in *Prnp*^{0/0} neurons. The differing results in PrP^C-null as compared with its respective wild-type control were reproduced in a second mouse strain (20) with a distinct genetic background, supporting the increase in intracellular Ca²⁺ concentration were specifically associated with PrP^C-Ln γ 1 peptide interaction (Supplemental Fig. S3).

The effect of Ln γ 1 peptide on intracellular Ca²⁺ increase was completely blocked by PLC (U73122, 1 μ M) and InsP₃ receptor (2APB, 50 μ M) inhibitors ($P < 0.05$; Fig. 3C, F), whereas an inactive analog of U73122 (U73343, 1 μ M) had no effect on intracellular Ca²⁺ release (data not shown). These results indicated that PrP^C-Ln γ 1 peptide interaction mobilized Ca²⁺ from the ER by PLC-mediated activation of the InsP₃ receptor, and that the release of ER Ca²⁺ stores was required for the observed extracellular Ca²⁺ influx in response to treatment with the Ln γ 1 peptide (Fig. 3A, F).

Once mobilized from intracellular stores, calcium can activate SOCs in the plasma membrane, and the opening of these channels leads to Ca²⁺ influx from the extracellular medium by a mechanism called capacitative calcium entry (CCE) (28). To identify the type of plasma membrane channel involved in the PrP^C-Ln γ 1 peptide-evoked calcium influx, we incubated hip-

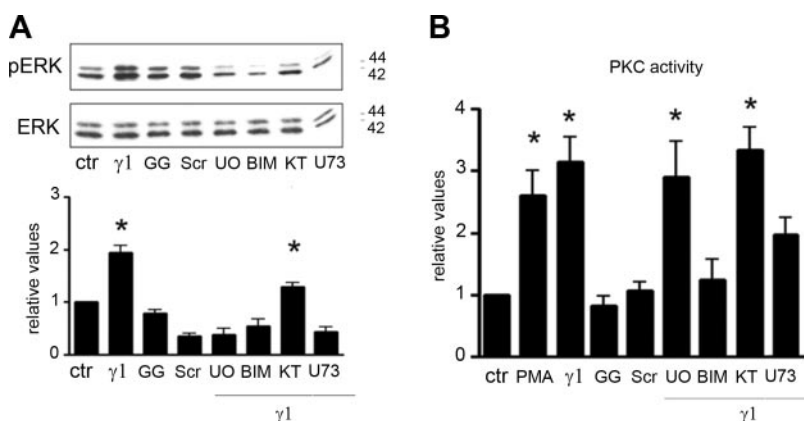


Figure 2. Ln γ 1 peptide binding to PrP^C induced sequential activation of PLC, PKC, and ERK1/2. Primary hippocampal neurons from *Prnp*^{+/+} mice were treated with Ln γ 1 peptide (37 μ M), either with or without (ctr) PKC (0.5 μ M BIM), PKA (60 nM Kt) ERK1/2 (10 μ M U0), or PLC (1 μ M U73) inhibitors. Cultures were also treated with either a peptide where the KDI domain of the Ln γ 1 peptide was substituted by 3 glycines (GGG, 37 μ M) or an SCR Ln γ 1 peptide (37 μ M). ERK1/2 (A) or PKC (B) activation was evaluated. A) Relative levels of ERK1/2 activity represent the ratio between phosphorylated ERK1/2 and total ERK, normalized to the untreated group (ctr). B) Relative levels of PKC represent the normalization of the phosphorylation in each condition and the phosphorylation in the untreated group (ctr). Results are means \pm SE of 4 independent experiments analyzed and compared by 1-way ANOVA and Newman-Keuls *post hoc* test. * $P < 0.01$ vs. control.

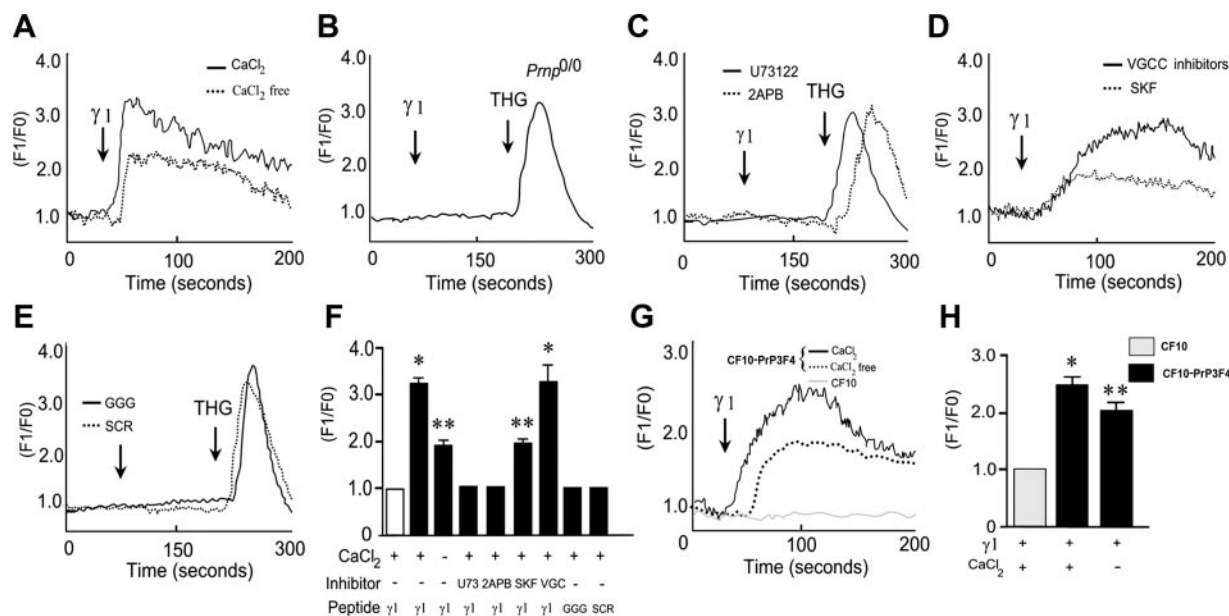


Figure 3. Ln $\gamma 1$ peptide interaction with PrP^C increased intracellular Ca²⁺. *A, B* *Prnp*^{+/+} (*n*=5; *A*) or *Prnp*^{0/0} (*n*=4; *B*) hippocampal neural cultures loaded with 10 μ M Fluo 3 AM were treated with Ln $\gamma 1$ peptide (37 μ M) in medium supplemented with (solid lines) or without (dotted line, *n*=3) CaCl₂. *Prnp*^{0/0} neurons were also treated with THG (1 μ M) and show normal levels of intracellular Ca²⁺ stocks. *C, D* *Prnp*^{+/+} neurons were preincubated with either PLC inhibitor (U73122, 1 μ M) or InsP₃ receptor blocker (2APB, 50 μ M; *n*=3) (*C*) or voltage-gated Ca²⁺ channel (VGCC, omega-conotoxin MCVII 1 μ M plus nifedipine, 50 μ M) or store-operated channel (SKF, 25 μ M) inhibitors (*D*) before Ln $\gamma 1$ peptide treatment (*n*=3). *E* *Prnp*^{+/+} neurons were treated with either the Ln $\gamma 1$ peptide where the KDI domain was changed by 3 glycines (GGG, 37 μ M) or SCR peptide (37 μ M; *n*=3). *F* Means \pm SE of relative intracellular Ca²⁺ levels in neurons *Prnp*^{+/+} (solid bars) and *Prnp*^{0/0} (open bar) treated with Ln $\gamma 1$ peptide and/or signaling pathway inhibitors. Independent experiments were compared by 1-way ANOVA and Newman-Keuls *post hoc* test. *G* CF10 PrP^C-null immortalized neuronal cell line (solid gray line) and a CF10 where the PrP^C that was reexpressed (CF10-PrP3F4) were treated with Ln $\gamma 1$ peptide (120 μ M) in medium supplemented with (solid black line, *n*=10) or without (dotted line, *n*=4) CaCl₂. *H* Means \pm SE of the relative intracellular Ca²⁺ levels in CF10 and CF10-PrP3F4 cells treated with Ln $\gamma 1$ peptide in the presence or absence of extracellular CaCl₂. Independent experiments were compared by 1-way ANOVA and Newman-Keuls *post hoc* test. **P* < 0.05 vs. control; ***P* < 0.05 vs. control and Ln $\gamma 1$ peptide treatment with CaCl₂.

pocampal neurons with either the specific inhibitor of SOCs (SKF-96365, 25 μ M; Fig. 3*D*, dotted line; *F*), or a mix of VGCC inhibitors (1 μ M ω -conotoxin MVIIC plus 50 μ M nifedipine; Fig. 3*D*, solid line; *F*). The increase in intracellular Ca²⁺ induced by the Ln $\gamma 1$ was 190 \pm 11% above basal levels after SKF-96365 treatment (Fig. 3*D*, dotted line; *F*), which was significantly lower than that observed by Ln $\gamma 1$ peptide alone (*P* < 0.05; Fig. 3*F*). No effect of Ln $\gamma 1$ peptide treatment on intracellular Ca²⁺ levels was observed in the presence of VGCC inhibitors (Fig. 3*D*, solid line; *F*). Control experiments demonstrated that KCl induced an increase of intracellular Ca²⁺ by VGCC activation, which was totally blocked by the VGCC inhibitor cocktail used here (data not shown). To test the specificity of Ln $\gamma 1$ peptide-PrP^C interactions in the release of intracellular Ca²⁺ stores, *Prnp*^{+/+} neurons were treated with either a Ln $\gamma 1$ peptide lacking the KDI domain (Fig. 3*E*, solid line) or an SCR Ln $\gamma 1$ peptide (Fig. 3*E*, dotted line). There was no effect of these control peptides on intracellular Ca²⁺ increase (Fig. 3*F*).

To further confirm the role of PrP^C in the response to Ln $\gamma 1$ peptide, we used CF10 cells, an immortalized neuronal cell line derived from a PrP^C-null mice and CF10-PrP3F4 cells, in which PrP^C was reintroduced (21). As expected, CF10 cells did not exhibit an in-

crease in intracellular Ca²⁺ concentrations following Ln $\gamma 1$ peptide (37 μ M) treatment (Fig. 3*G, H*). However, the reexpression of PrP^C (CF10-PrP3F4) rescued Ca²⁺ signaling in these cells (Fig. 3*G, H*). Similar to primary neuronal cultures (Fig. 3*A, F*), Ln $\gamma 1$ peptide treatment of CF10 cells reexpressing PrP^C resulted in a 246 \pm 10% increase in intracellular Ca²⁺ concentrations above the basal levels (*P* < 0.05). An increase of 200 \pm 4% above the basal levels in calcium response to Ln $\gamma 1$ peptide was detected when extracellular Ca²⁺ was removed (*P* < 0.05), but this increase was significantly lower than that observed in the presence of extracellular Ca²⁺ (*P* < 0.05; Fig. 3*G, H*). This confirms that PrP^C-Ln $\gamma 1$ peptide binding increases intracellular calcium levels by Ca²⁺ mobilization from intracellular stores and by extracellular Ca²⁺ influx (Fig. 3*G, H*). Control experiments demonstrated that the inactive peptides, GGG and SCR, did not increase intracellular Ca²⁺ levels in CF10 cells reconstituted with PrP^C. Notably, lack of either PrP^C or its reexpression did not affect the intracellular Ca²⁺ stores in these cells (Supplemental Fig. S4). Together, these data indicated that engagement of PrP^C with the Ln $\gamma 1$ peptide activated the PLC-dependent mobilization of Ca²⁺ from the ER,

followed by activation of SOCs on the plasma membrane.

PrP^C associates with mGluR1/5 to transduce signals triggered by the interaction of PrP^C with the Ln γ 1 peptide

The signaling pathways activated by PrP^C-Ln γ 1 peptide resembled those commonly activated by G_{q/11}-coupled receptors (GPCRs). To identify transmembrane receptors, and in particular, GPCRs, that may be involved with PrP^C signaling, we conducted a phage display screening using PrP^C as ligand (unpublished results). The finding of PrP^C-binding peptides with high homology with the group I mGluRs (mGluR1 and mGluR5; data not shown) was consistent with the signaling events described here for the Ln γ 1 peptide.

To test whether PrP^C interacted with group I mGluRs, as suggested by the phage display screen, we performed coimmunoprecipitation experiments. mGluR1a, mGluR1b, and mGluR5 expression vectors tagged with

FLAG were cotransfected with PrP^C into HEK293 cells. This approach allowed us to obtain high transfection efficiency, which was important because of a lack of very selective and effective antibodies for immunoprecipitation of mGluRs in neurons.

The immunoprecipitation of FLAG-tagged group I mGluRs resulted in the coimmunoprecipitation of PrP^C, which indicated that PrP^C could form a complex with group I mGluRs (Fig. 4A). The difference between the predicted molecular mass for mGluR5 and its immunoprecipitated form (top left panel) was caused by receptor dimerization (29).

To further evaluate whether the PrP^C-mGluR complex detected in HEK293 cells was functional, we treated transfected cells with 120 μ M Ln γ 1 peptide and measured cellular signaling. There was no increase in intracellular Ca²⁺ concentration in response to Ln γ 1 peptide when PrP^C was transfected alone (Fig. 4B, dotted line; D). However, the expression of PrP^C along with either mGluR1a or mGluR5 resulted in an increase in intracellular Ca²⁺ concentration in response to Ln

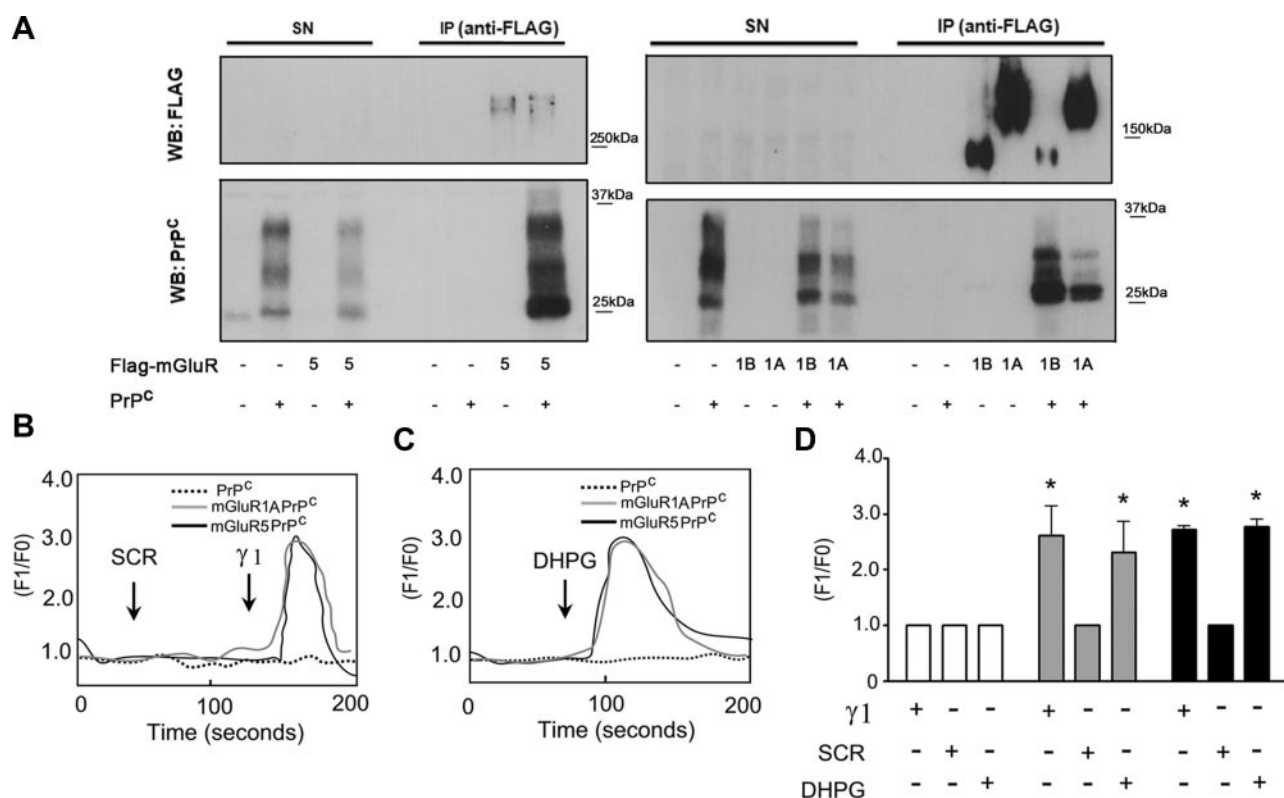


Figure 4. PrP^C is associated with mGluRs, and expression of mGluRs rescued intracellular Ca²⁺ increase promoted by PrP^C-Ln γ 1 peptide. **A)** HEK 293 cells were transfected with expression vectors encoding either PrP^C alone or along with FLAG-tagged mGluR1a, mGluR1b, or mGluR5. Cells were lysed, and immunoprecipitation was performed with anti-FLAG. Immunoprecipitated proteins (IP) and supernatants (SN) were immunoblotted against PrP^C and anti-FLAG. **B)** HEK293 cells were transfected with expression vectors encoding either PrP^C alone (dotted lines) or along with either mGluR1 (solid gray lines) or mGluR5 (solid black lines) and treated with SCR Ln γ 1 peptide followed by Ln γ 1 peptide (γ1), both at 75 μ M. **C)** Cells transfected as in **B** were treated with the mGluR agonist DHPG (100 μ M). **D)** HEK293 cells were transfected with the PrP^C expression vector alone (open bars) or with expression vectors encoding both PrP^C and either mGluR1 (shaded bars) or mGluR5 (solid bars) and treated with Ln γ 1 peptide (γ1, 75 μ M; *n*=4), SCR Ln γ 1 peptide (75 μ M; *n*=3), or DHPG (*n*=3). Intracellular Ca²⁺ levels for all treatments are shown as relative values to control conditions (HEK293 transfected with PrP^C and treated with Ln γ 1 peptide). Results are means \pm SE of relative intracellular Ca²⁺ levels, compared by 1-way ANOVA and Newman-Keuls *post hoc* test. **P* < 0.01 *vs.* control.

$\gamma 1$ peptide treatment ($P < 0.01$; Fig. 4B, solid line; D). No increase in intracellular Ca^{2+} concentration was observed when transfected cells were treated with 120 μM Ln $\gamma 1$ SCR peptide (Fig. 4B, D). Similar results were observed with the group I metabotropic agonist DHPG, where cells expressing PrP^C failed to respond to 100 μM DHPG, whereas Ca^{2+} release was observed in cells expressing either mGluR1a or mGluR5 in response to 100 μM DHPG treatment ($P < 0.01$; Fig. 4C, D).

In addition to intracellular Ca^{2+} signaling, we also measured PKC activation in transfected HEK 293 cells using a PKC translocation assay (24). GFP-PKC β II, which provides the most reliable translocation assay in living cells (30), was analyzed in HEK293 cells, either expressing PrP^C alone or along with either mGluR1a or mGluR5 (Fig. 5).

Under resting conditions, GFP-PKC β II was diffusely distributed within the cytoplasm of cells, and the treatment of cells with Ln $\gamma 1$ peptide (Fig. 5B, D, F), but not the SCR peptide (Fig. 5A, C, E), resulted in the redistribution of GFP-PKC β II to the plasma membrane in 54% of the cells expressing PrP^C along with mGluR1a

(Fig. 5D, $n = 33$ cells) and in 33% of the cells expressing PrP^C along with mGluR5 (Fig. 5F, $n = 18$). There was no GFP-PKC β II translocation in response to Ln $\gamma 1$ peptide in cells expressing PrP^C alone (Fig. 5B, $n = 36$ cells). These experiments together with the results obtained with neuronal cells suggest that signaling by Ln $\gamma 1$ peptide is dependent on PrP^C and group I metabotropic receptors.

We also used primary neuronal cultures to test whether group I mGluR antagonists, (100 μM LY367385 and 10 μM MPEP, respectively, for mGluR1 and mGluR5), which effectively block increases in intracellular Ca^{2+} concentrations mediated by the nonselective group I mGluR agonist DHPG ($P < 0.01$; Fig. 6B, C), would prevent Ln $\gamma 1$ peptide-stimulated increases in intracellular Ca^{2+} concentrations. When hippocampal neurons were treated with Ln $\gamma 1$ peptide in the presence of LY367385 or MPEP at concentrations that specifically block mGluR1 or mGluR5 (31, 32), no significant increase of Ca^{2+} above basal levels was observed (Fig. 6A, C). Antagonists of either mGluR1 or mGluR5 also attenuated Ln $\gamma 1$ peptide-mediated PKC activation ($P < 0.01$; Fig. 6D). As expected, these inhibitors were also able to block PKC activation mediated by DHPG ($P < 0.01$; Fig. 6D). The combination of both inhibitors did not have an additive effect on either Ln $\gamma 1$ peptide-mediated increase in Ca^{2+} levels or PKC activity (Fig. 6C, D).

As a control for the specificity of the mGluR-mediated response, we tested for a role of BK receptor, which also couples to G_q and the PLC- Ca^{2+} pathway. Treatment of hippocampal neurons from wild-type mice with a type 2 BK receptor antagonist (1 μM HOE-140) failed to block the Ln $\gamma 1$ peptide-induced increase of intracellular Ca^{2+} (Fig. 6E, dotted line), whereas HOE-140 completely blocked BK-stimulated increases in intracellular Ca^{2+} concentration (Fig. 6F, dotted line). Thus, type 2 BK receptors were not involved in the signaling promoted by PrP^C-Ln $\gamma 1$ peptide interaction.

Finally, the role of group I mGluRs in neuritogenesis mediated by the interaction of PrP^C with Ln $\gamma 1$ peptide was tested in primary neuronal cultures using a pharmacological approach. We found that the treatment of cells with mGluR1- and mGluR5-specific antagonists (100 μM LY367385 and 10 μM MPEP, respectively) abrogated neuritogenesis mediated by PrP^C-Ln $\gamma 1$ peptide engagement ($P < 0.01$; Fig. 7A, C, H). The activation of endogenous mGluRs with the group I metabotropic receptor agonist DHPG promoted neuritogenesis, which could also be blocked by the antagonists LY367385 and MPEP ($P < 0.01$; Fig. 7D, F, I). We were unable to test whether group I mGluRs colocalized with PrP^C in mouse neuronal cultures due to the unavailability of good antibodies against mouse mGluRs. However, in rat neuronal hippocampal cultures, which respond similarly to Ln $\gamma 1$ peptide (13), we found that both mGluR1 and mGluR5 are present and colocalize with PrP^C (Supplemental Fig. S5). Taken together, these results suggested that PrP^C and mGluRs associated in a complex that could be activated by engagement of PrP^C with the Ln $\gamma 1$ peptide, leading to mGluR-dependent signaling and ensuing neuritogenesis.

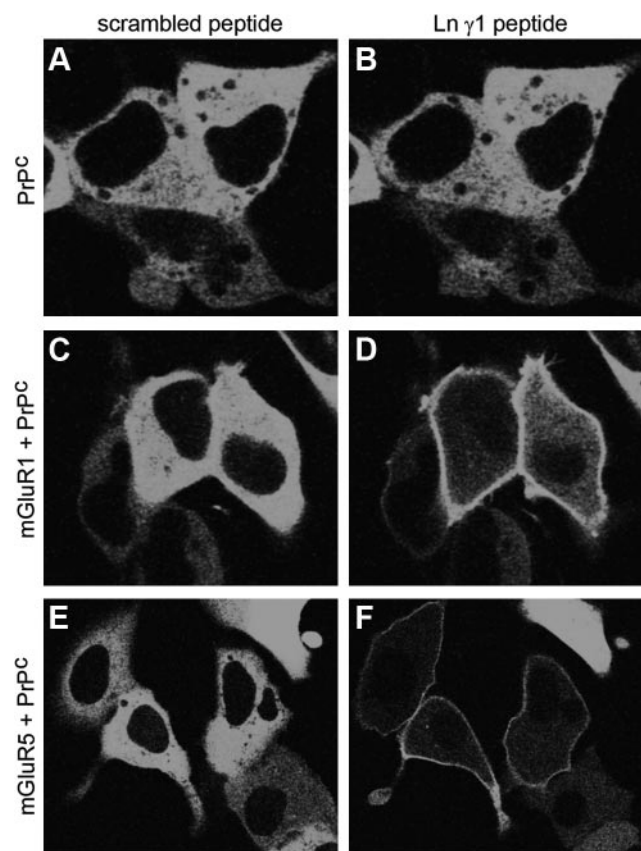


Figure 5. Expression of mGluR1 and mGluR5 rescued GFP-PKC β II translocation induced by PrP^C-Ln $\gamma 1$ peptide engagement. HEK 293 cells were transfected with expression vectors encoding PrP^C, either alone (A, B) or along with either mGluR1 (C, D) or mGluR5 (E, F), and were subsequently treated with SCR peptide (A, C, E) and Ln $\gamma 1$ peptide (B, D, F), both at 75 μM . GFP-PKC β II translocation to the membrane was evaluated in 4 independent experiments. Results are representative images of a total of 36 cells (A, B) 33 cells (C, D), and 18 cells (E, F) analyzed.

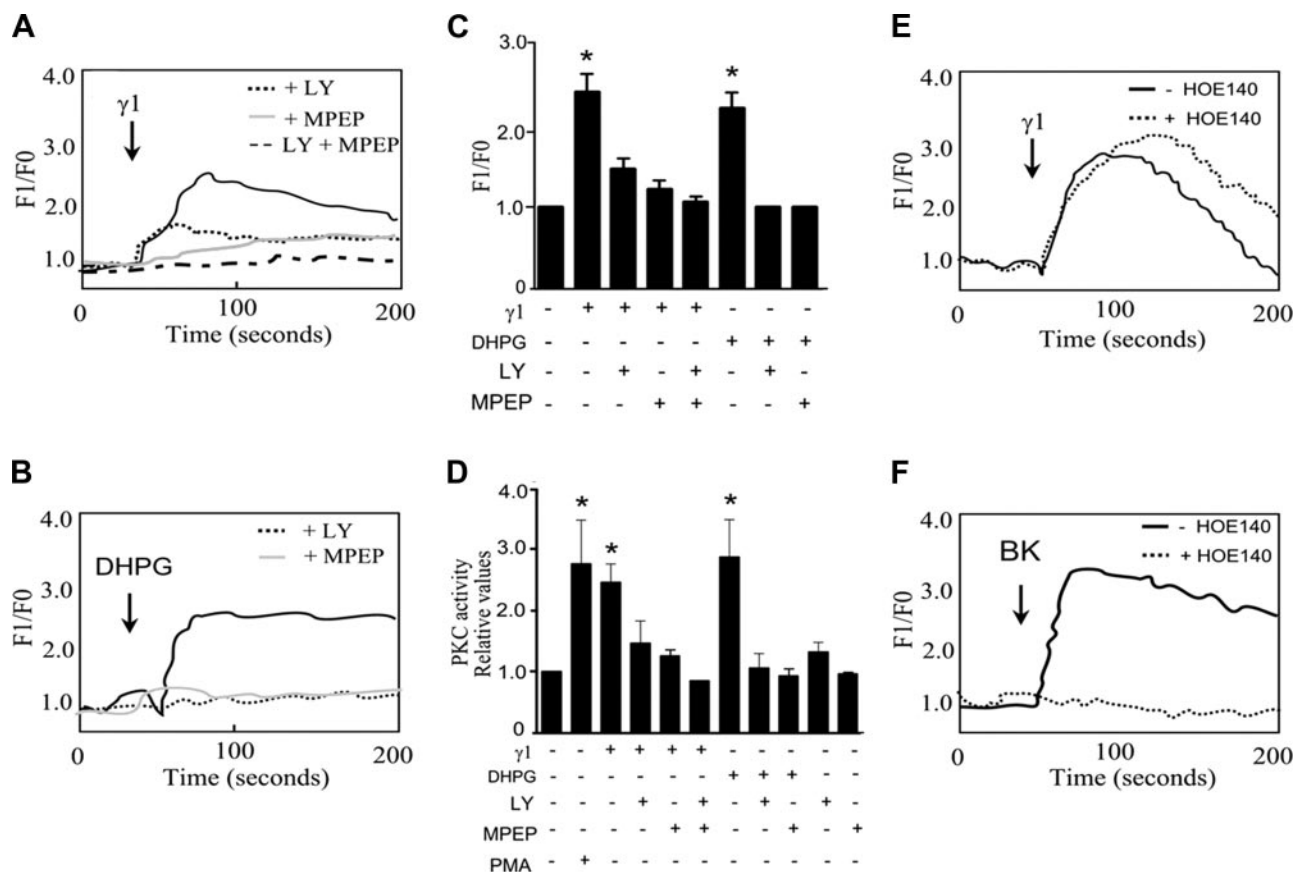


Figure 6. mGluR1 and mGluR5 mediated intracellular Ca²⁺ increase and PKC activation promoted by PrP^C-Ln γ 1 peptide interaction in neurons. *A, B*) *Prnp*^{+/+} hippocampal neurons loaded with Fluo 3 AM (10 μ M) were treated with either Ln γ 1 peptide (37 μ M; *A*) or the mGluR agonist DHPG (100 μ M; *B*) in the absence (solid black line) or presence of mGluR1 (LY367385, 100 μ M, dotted lines) or mGluR5 (MPEP, solid gray line) antagonists or in the presence of both (LY367385 and MPEP, dashed lines). *C*) Intracellular Ca²⁺ levels for all treatments in *A* and *B* are shown as relative values to that in control conditions (without treatment) ($n=4$). *D*) PKC activity was measured in primary neuronal cultures treated with either Ln γ 1 peptide (37 μ M) or DHPG (100 μ M) in the presence or absence of LY367385 (100 μ M) or MPEP (10 μ M) ($n=3$). Values are relative to the control condition without treatment. *C, D*) Results are means \pm SE of relative intracellular Ca²⁺ levels or PKC activity, analyzed and compared by 1-way ANOVA and Newman-Keuls *post hoc* test. *E, F*) *Prnp*^{+/+} neurons were also treated with γ 1 peptide (37 μ M; *E*) or BK (*F*) in the absence (solid lines, $n=3$) or presence (dotted lines, $n=3$) of the BK receptor inhibitor HOE 140 (1 μ M). * $P < 0.01$ vs. control.

DISCUSSION

The present study identified a novel mechanism by which PrP^C mediates the transduction of extracellular signals that lead to neurite outgrowth. Here, we show that interaction of PrP^C with the Ln γ 1 peptide leads to activation of PLC and the mobilization of Ca²⁺ from intracellular stores, followed by Ca²⁺ influx, PKC, and ERK1/2 activation. This PrP^C-mediated transmembrane signaling is dependent on group I mGluRs (mGluR1 and/or mGluR5), which are found to associate with PrP^C (Fig. 8). The data presented here provide evidence of a pathway through which a multiprotein complex organized by PrP^C (2, 33, 34) leads to intracellular signaling with consequences for neuronal plasticity.

Extracellular matrix (ECM) components, in particular Ln, are required for the survival and differentiation of neurons in the developing nervous system, as well as in the remodeling of both normal and diseased adult

brain (35). Ln is a heterotrimer composed of a diverse variety of α , β , and γ chains, of which α 2, β 1, and γ 1 are highly expressed in the hippocampus (36). The role of Ln in neurite outgrowth and axonal pathfinding has been largely explored *in vitro* (reviewed in ref. 37). *In vivo*, the deletion of the γ 1 chain of Ln is lethal at embryonic day 5.5 (38), while deletion of Ln γ 1 chain only in neurons of the cerebral cortex disrupted cortical layer structure, and the neurons grew shorter neurites (18). The later animals presented lower levels of phosphorylated focal adhesion kinase (pFAK) and paxilin, which were attributed to impairment of the binding to integrins (18), for which the carboxy-terminal domain of Ln γ 1 chain was important (39). Remarkably, besides binding to Ln γ 1 (13 and present data), PrP^C modulated the activity of pFAK and colocalizes with paxilin (40). Thus, events in mice lacking Ln γ 1 chain in cortical neurons could also be attributed, at least in part, to the absence of binding of the Ln γ 1 chain to PrP^C. In addition, we have demonstrated

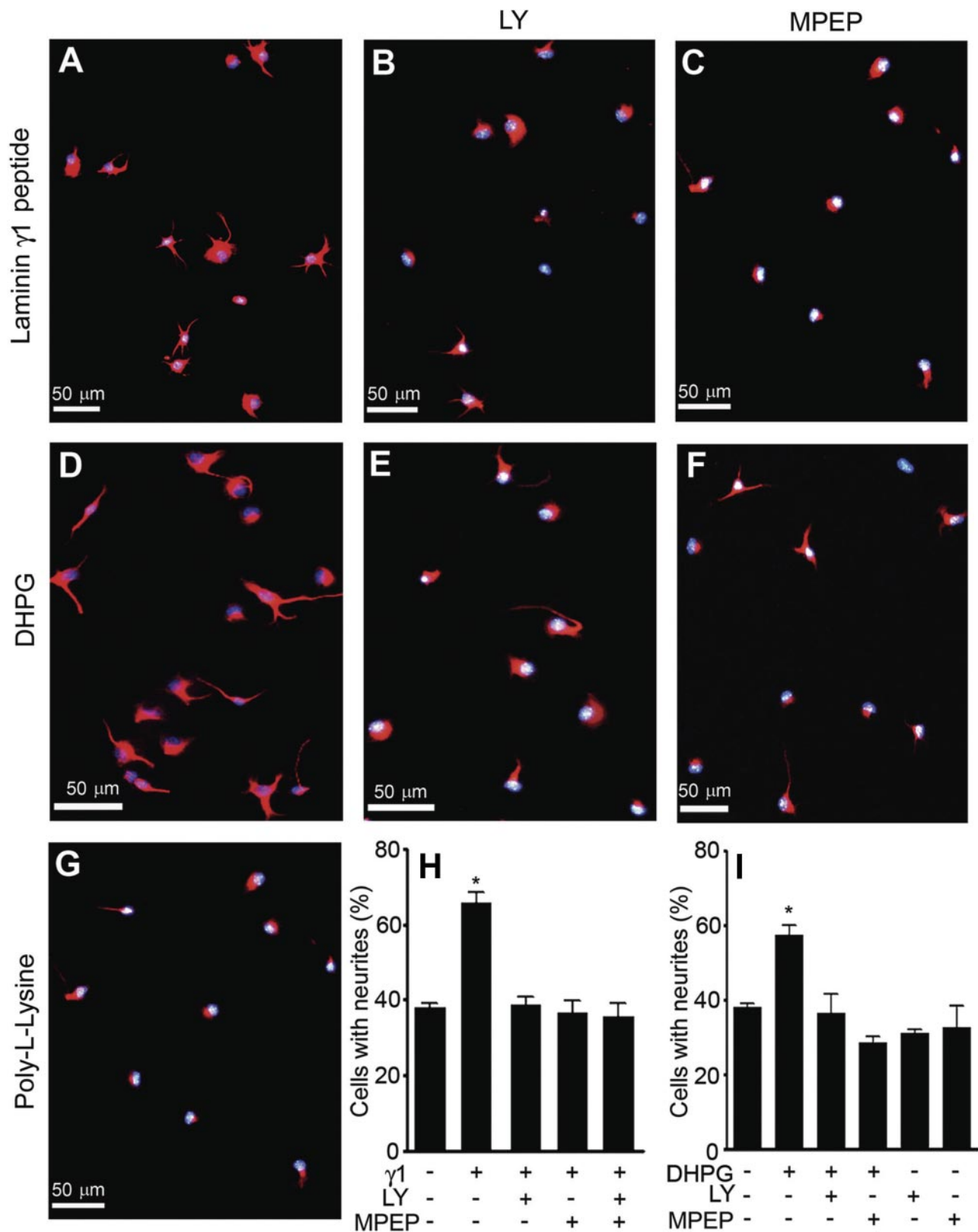


Figure 7. Neuritogenesis induced by PrP^C-Ln $\gamma 1$ peptide interaction was abolished by group I mGluR inhibitors. *A–C*) Representative images of *Prnp*^{+/+} primary hippocampus neurons treated with Ln $\gamma 1$ peptide (37 μ M; *A*) in the presence of either mGluR1 (LY367385, 100 μ M; *B*) or mGluR5 (MPEP, 10 μ M; *C*) inhibitors. *D–F*) Cells were also treated with DHPG (100 μ M; *D*) in the presence of either mGluR1 (LY367385, 100 μ M; *E*) or mGluR5 (MPEP, 10 μ M; *F*) inhibitors. *G*) Neurons plated over poly-L-lysine. *H, I*) Percentage of cells with neurites was evaluated on treatment with Ln $\gamma 1$ peptide (37 μ M; *H*) or with DHPG (100 μ M) in the presence or absence of either mGluR1 (LY367385, 100 μ M) or mGluR5 (MPEP, 10 μ M) inhibitors (*I*). Cells were labeled with anti- β III tubulin followed by anti-mouse Alexa Fluor 546 and DAPI. Values are means \pm SE of 3 independent experiments compared by 1-way ANOVA and Newman-Keuls *post hoc* test. **P* < 0.01 vs. control.

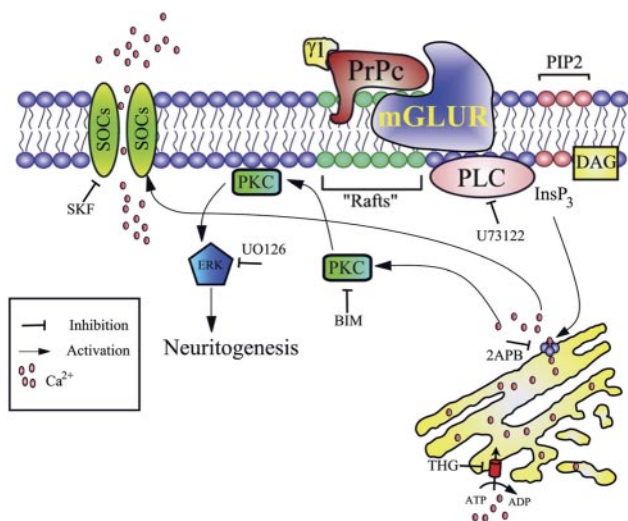


Figure 8. Schematic model of signaling events mediated by PrP^C-Ln γ 1 peptide interaction. PrP^C-Ln γ 1 peptide interaction activates mGluR1 and/or mGluR5 receptors, promoting activation of PLC, which generates InsP₃ that binds to InsP₃ receptors localized to the ER. The activation of InsP₃ receptors results in the release of intracellular Ca²⁺ from the ER and promotes the activation of PKC and its translocation to the membrane, followed by ERK1/2 activation, which mediates neuritogenesis. Ca²⁺ mobilization from ER also activates Ca²⁺ influx from extracellular space by SOCs.

that neurons derived from PrP^C-null mice presented higher integrin levels and activity, which may compensate for the absence of a gross phenotype in these mice (41).

Due to the complexity of the Ln molecule and its diverse receptors, the use of Ln fragments or peptides is a crucial strategy to establish the correlation between distinct domains and specific cellular functions (42). It is known that Ln can be degraded by proteases generating bioactive peptides (43). Remarkably, the carboxy-terminal peptide from Ln γ 1 chain (RNIAEIKDI) has been associated with neurite outgrowth (16, 17), neuronal migration (44), and axonal guidance (45), which is consistent with the localization of the Ln γ 1 chain on cellular bodies and proximal processes (36). Interestingly, the tripeptide KDI from Ln γ 1-chain peptide specifically modulates neurite outgrowth (17), neuronal protection against glutamate excitotoxicity mediated by GluRs (46), and defense against 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced neurotoxicity in a rat experimental model for Parkinson's disease (47). Herein, we confirmed our previous data showing that PrP^C is a cellular receptor for the Ln γ 1 peptide, the binding of which promotes neurite outgrowth (13). In addition, we have now mapped the KDI domain within the Ln γ 1 peptide as the functional binding site for PrP^C.

The present experiments allowed the mapping of a signaling pathway triggered by the interaction of PrP^C with the Ln γ 1 peptide that likely reflects the effect of Ln binding to PrP^C. This pathway involves activation of PLC, the generation of InsP₃, and mobilization of Ca²⁺ from the ER. In agreement with our data on PrP^C

modulating intracellular Ca²⁺ responses, this protein has also been shown to induce intracellular Ca²⁺ increases to regulate neuroprotective functions under oxidative stress (48). PrP^C expression in nonneuronal cells also induces Ca²⁺ influx, limits Ca²⁺ release from the ER, as well as uptake by mitochondria. These events may prevent the activation of cell death pathways (49). In contrast, calcium influx is reduced in neurons derived from PrP^C-null mice when compared with wild-type mice (50). Remarkably, prion infection modifies Ca²⁺ responses by altering plasma membrane composition and by a decrease in the production of InsP₃, consequently reducing Ca²⁺ mobilization from intracellular stores (51). Therefore, PrP^C is able to organize various cellular signals that control Ca²⁺ homeostasis, which may be changed and sometimes be compensated for during development in cells derived from PrP^C-null animals. It is nonetheless still unknown whether corruption of PrP^C-mediated signaling may have a role in prion infection.

Involvement of PrP^C in a variety of signaling pathways has been described on the basis of various experimental paradigms. However, only a limited number of transmembrane proteins have been identified that may transduce signals dependent on the GPI-anchored PrP^C (2). The identification of such transmembrane proteins is of major interest, because they may explain the connection of the proposed PrP^C-organized cell surface multiprotein complexes to signaling pathways responsible for both the diversity and for the cell-type specificity of PrP^C cellular functions (2).

Using pharmacological, biochemical, and signaling reconstitution assays in HEK293 cells, our present data indicate that PrP^C signaling in response to the Ln γ 1 peptide binding depends on group I mGluRs (mGluR1 and mGluR5), which are able to associate with PrP^C. These G $\alpha_{q/11}$ -coupled receptors stand among the most widely expressed GPCRs in the brain. They are transmembrane proteins that promote the release of intracellular Ca²⁺ and the activation of PKC (52). However, a combination of inhibitors of both mGluR1 and mGluR5 did not have additive effects on the impairment of cellular Ca²⁺ and PKC signaling. This may be due to saturation of the signaling cascade triggered by both receptors on PrP^C binding to Ln γ 1.

Preferential interaction of PrP^C with either mGluR1 or mGluR5 may depend on expression levels of each receptor in neurons of specific brain regions. Both receptors are expressed in hippocampus, striatum, and cortex, but mGluR1 is more prevalent in cerebral cortex and striatum and mGluR5 is more prevalent in striatum, whereas only mGluR1 is expressed in cerebellum (53, 54). The association between PrP^C and either mGluR1 or mGluR5 may also depend on the presence of these molecules in specific membrane domains. In neuronal cells PrP^C is found in lipid rafts (55) associated with caveolin 1 (56), and PrP^C traffic from lipid rafts to nonraft membrane domains promotes its internalization by LPR1 (low-density lipoprotein receptor-related protein 1) (57) and delivery to classical endo-

somes (58). The group I mGluRs are also located in lipid rafts, and the interaction with caveolin 1 modulates their internalization (59). Thus, it is possible that PrP^C and mGluR1/5 interact when they colocalize in the same raft domain, although this remains to be established. The Ln γ 1 peptide binding to PrP^C may change the conformation of PrP^C similarly to what is described on hop/STII binding to PrP^C (60). Future experiments aimed at understanding these mechanisms may clarify novel roles of PrP^C in glutamate signaling.

Group I mGluRs have been implicated in the targeting of thalamic axons to somatosensory cortical barrels (61) and are found to promote dendritic protein synthesis (62). The activation of mGluR1 decreases the proliferation and increases differentiation of early neuronal progenitors, whereas mGluR5 promotes the survival of neuronal-restricted precursors (63), indicating that group I mGluRs control neuronal differentiation and are important for brain development. Our data are in line with these observations, in that we showed that activation of either mGluR1 or mGluR5 increases neurogenesis. Moreover, the blockade of either mGluR1 or mGluR5 inhibits PrP^C-Ln γ 1 peptide-induced neurogenesis.

The characterization of group I mGluRs as transmembrane proteins connecting PrP^C-Ln engagement to neuronal plasticity, provide a cellular mechanism by which PrP^C can transduce extracellular signals. These results further support the existence of multiprotein complexes organized by PrP^C (2,34), which may have key functions in the neuronal physiology. They also suggest potential key roles of mGluRs in PrP^C-mediated cell signaling that may take place in distinct pathological states, such as Alzheimer's disease and prion diseases. Indeed, recent experiments indicated that mGluR5 can function as a receptor for A β peptides, and the latter changes mGluR5 lateral trafficking and signaling (64). Whether PrP^C and mGluR5 act together in Alzheimer's disease remains to be established. FJ

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 03-13189-2), Programa Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/MCT), and PrioNet-Canada. V.R.M. is an International Scholar of the Howard Hughes Medical Institute. Fellowships from FAPESP to F.H.B., C.P.A., M.R., T.G.S., C.F.M., K.S.L., G.N.H.; from CNPq to G.L.M.; and the Canada Department of Foreign Affairs and International Trade to F.H.B. are gratefully acknowledged. A.C.M. is supported by the Canadian Institute of Health Research (CIHR). R.L., T.A.A., and M.M. are supported by CNPq and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, and S.S.G.F. is funded by CIHR grant MA-15506. S.S.G.F. is a Canada Research Chair in Molecular Neurobiology and a Career Investigator of the Heart and Stroke Foundation of Ontario. The authors are also grateful to Dr. João Bosco Pesquero (Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil) for providing bradykinin for some experiments.

REFERENCES

- Weissmann, C. (2004) The state of the prion. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 861–871
- Linden, R., Martins, V. R., Prado, M. A., Cammarota, M., Izquierdo, I., and Brentani, R. R. (2008) Physiology of the prion protein. *Physiol. Rev.* **88**, 673–728
- Parkin, E. T., Watt, N. T., Hussain, I., Eckman, E. A., Eckman, C. B., Manson, J. C., Baybutt, H. N., Turner, A. J., and Hooper, N. M. (2007) Cellular prion protein regulates beta-secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 11062–11067
- Lauren, J., Gimbel, D. A., Nygaard, H. B., Gilbert, J. W., and Strittmatter, S. M. (2009) Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* **457**, 1128–1132
- Gimbel, D. A., Nygaard, H. B., Coffey, E. E., Gunther, E. C., Lauren, J., Gimbel, Z. A., and Strittmatter, S. M. (2010) Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein. *J. Neurosci.* **30**, 6367–6374
- Balducci, C., Beeg, M., Stravalaci, M., Bastone, A., Scip, A., Biasini, E., Tapella, L., Colombo, L., Manzoni, C., Borsello, T., Chiesa, R., Gobbi, M., Salmona, M., and Forloni, G. (2010) Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 2295–2300
- Calella, A. M., Farinelli, M., Nuvolone, M., Mirante, O., Moos, R., Falsig, J., Mansuy, I. M., and Aguzzi, A. (2010) Prion protein and Abeta-related synaptic toxicity impairment. *EMBO Mol. Med.* **2**, 306–314
- Kessels, H. W., Nguyen, L. N., Nabavi, S., and Malinow, R. (2010) The prion protein as a receptor for amyloid-beta. *Nature* **466**, E3–E4
- Zanata, S. M., Lopes, M. H., Mercadante, A. F., Hajj, G. N., Chiarini, L. B., Nomizo, R., Freitas, A. R., Cabral, A. L., Lee, K. S., Juliano, M. A., de Oliveira, E., Jachieri, S. G., Burlingame, A., Huang, L., Linden, R., Brentani, R. R., and Martins, V. R. (2002) Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J.* **21**, 3307–3316
- Chiarini, L. B., Freitas, A. R., Zanata, S. M., Brentani, R. R., Martins, V. R., and Linden, R. (2002) Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J.* **21**, 3317–3326
- Lopes, M. H., Hajj, G. N., Muras, A. G., Mancini, G. L., Castro, R. M., Ribeiro, K. C., Brentani, R. R., Linden, R., and Martins, V. R. (2005) Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neurogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *J. Neurosci.* **25**, 11330–11339
- Santuccione, A., Sytnyk, V., Leshchyn'ska, I., and Schachner, M. (2005) Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59^{fyn} and to enhance neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* **169**, 341–354
- Graner, E., Mercadante, A. F., Zanata, S. M., Forlenza, O. V., Cabral, A. L., Veiga, S. S., Juliano, M. A., Roesler, R., Walz, R., Minetti, A., Izquierdo, I., Martins, V. R., and Brentani, R. R. (2000) Cellular prion protein binds laminin and mediates neurogenesis. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **76**, 85–92
- Coitinho, A. S., Freitas, A. R., Lopes, M. H., Hajj, G. N., Roesler, R., Walz, R., Rossato, J. I., Cammarota, M., Izquierdo, I., Martins, V. R., and Brentani, R. R. (2006) The interaction between prion protein and laminin modulates memory consolidation. *Eur. J. Neurosci.* **24**, 3255–3264
- Hager, G., Pawelzik, H., Kreutzberg, G. W., and Zieglgansberger, W. (1998) A peptide derived from a neurite outgrowth-promoting domain on the gamma 1 chain of laminin modulates the electrical properties of neocortical neurons. *Neuroscience* **86**, 1145–1154
- Liesi, P., Narvanen, A., Soos, J., Sariola, H., and Snounou, G. (1989) Identification of a neurite outgrowth-promoting domain of laminin using synthetic peptides. *FEBS Lett.* **244**, 141–148
- Liesi, P., Laatikainen, T., and Wright, J. M. (2001) Biologically active sequence (KDI) mediates the neurite outgrowth function of the gamma-1 chain of laminin-1. *J. Neurosci. Res.* **66**, 1047–1053

18. Chen, Z. L., Haegeli, V., Yu, H., and Strickland, S. (2009) Cortical deficiency of laminin gamma1 impairs the AKT/GSK-3beta signaling pathway and leads to defects in neurite outgrowth and neuronal migration. *Dev. Biol.* **327**, 158–168
19. Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M., and Weissmann, C. (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356**, 577–582
20. Manson, J. C., Clarke, A. R., Hooper, M. L., Aitchison, L., McConnell, I., and Hope, J. (1994) 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol. Neurobiol.* **8**, 121–127
21. Caetano, F. A., Lopes, M. H., Hajj, G. N., Machado, C. F., Pinto, A. C., Magalhaes, A. C., Vieira, M. P., Americo, T. A., Massensini, A. R., Priola, S. A., Vorberg, I., Gomez, M. V., Linden, R., Prado, V. F., Martins, V. R., and Prado, M. A. (2008) Endocytosis of prion protein is required for ERK1/2 signaling induced by stress-inducible protein 1. *J. Neurosci.* **28**, 6691–6702
22. Sunyach, C., Jen, A., Deng, J., Fitzgerald, K. T., Frobert, Y., Grassi, J., McCaffrey, M. W., and Morris, R. (2003) The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *EMBO J.* **22**, 3591–3601
23. Anborgh, P. H., Godin, C., Pampillo, M., Dhimi, G. K., Dale, L. B., Cregan, S. P., Truant, R., and Ferguson, S. S. (2005) Inhibition of metabotropic glutamate receptor signaling by the huntingtin-binding protein optineurin. *J. Biol. Chem.* **280**, 34840–34848
24. Dale, L. B., Babwah, A. V., Bhattacharya, M., Kelvin, D. J., and Ferguson, S. S. (2001) Spatial-temporal patterning of metabotropic glutamate receptor-mediated inositol 1,4,5-triphosphate, calcium, and protein kinase C oscillations: protein kinase C-dependent receptor phosphorylation is not required. *J. Biol. Chem.* **276**, 35900–35908
25. Policha, A., Daneshmand, N., Chen, L., Dale, L. B., Altier, C., Khosravani, H., Thomas, W. G., Zamponi, G. W., and Ferguson, S. S. (2006) Role of angiotensin II type 1A receptor phosphorylation, phospholipase D, and extracellular calcium in isoform-specific protein kinase C membrane translocation responses. *J. Biol. Chem.* **281**, 26340–26349
26. Laube, G., Seidenbecher, C. I., Richter, K., Dieterich, D. C., Hoffmann, B., Landwehr, R., Smalla, K. H., Winter, C., Bockers, T. M., Wolf, G., Gundelfinger, E. D., and Kreutz, M. R. (2002) The neuron-specific Ca²⁺-binding protein caldendrin: gene structure, splice isoforms, and expression in the rat central nervous system. *Mol. Cell. Neurosci.* **19**, 459–475
27. Ferraguti, F., Crepaldi, L., and Nicoletti, F. (2008) Metabotropic glutamate 1 receptor: current concepts and perspectives. *Pharmacol. Rev.* **60**, 536–581
28. Putney, J. W., Jr., Broad, L. M., Braun, F. J., Lievreumont, J. P., and Bird, G. S. (2001) Mechanisms of capacitative calcium entry. *J. Cell Sci.* **114**, 2223–2229
29. Romano, C., Yang, W. L., and O'Malley, K. L. (1996) Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *J. Biol. Chem.* **271**, 28612–28616
30. Babwah, A. V., Dale, L. B., and Ferguson, S. S. (2003) Protein kinase C isoform-specific differences in the spatial-temporal regulation and decoding of metabotropic glutamate receptor 1-stimulated second messenger responses. *J. Biol. Chem.* **278**, 5419–5426
31. Kingston, A. E., Griffey, K., Johnson, M. P., Chamberlain, M. J., Kelly, G., Tomlinson, R., Wright, R. A., Johnson, B. G., Schoepp, D. D., Harris, J. R., Clark, B. P., Baker, R. S., and Tizzano, J. T. (2002) Inhibition of group I metabotropic glutamate receptor responses in vivo in rats by a new generation of carboxyphenylglycine-like amino acid antagonists. *Neurosci. Lett.* **330**, 127–130
32. Gasparini, F., Lingenhohl, K., Stoehr, N., Flor, P. J., Heinrich, M., Vranesic, I., Biollaz, M., Allgeier, H., Heckendorn, R., Urwyler, S., Varney, M. A., Johnson, E. C., Hess, S. D., Rao, S. P., Sacaan, A. I., Santori, E. M., Velicelebi, G., and Kuhn, R. (1999) 2-Methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP), a potent, selective and systemically active mGlu5 receptor antagonist. *Neuropharmacology* **38**, 1493–1503
33. Martins, V. R., Linden, R., Prado, M. A., Walz, R., Sakamoto, A. C., Izquierdo, I., and Brentani, R. R. (2002) Cellular prion protein: on the road for functions. *FEBS Lett.* **512**, 25–28
34. Martins, V. R., Beraldo, F. H., Hajj, G. N., Lopes, M. H., Lee, K. S., Prado, M. M., and Linden, R. (2009) Prion protein: orchestrating neurotrophic activities. *Curr. Issues Mol. Biol.* **12**, 63–86
35. Rauch, U. (2004) Extracellular matrix components associated with remodeling processes in brain. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 2031–2045
36. Hagg, T., Portera-Cailliau, C., Jucker, M., and Engvall, E. (1997) Laminins of the adult mammalian CNS; laminin-alpha2 (merosin-M) chain immunoreactivity is associated with neuronal processes. *Brain Res.* **764**, 17–27
37. Luckenbill-Edds, L. (1997) Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **23**, 1–27
38. Mitchell, K. J., Pinson, K. I., Kelly, O. G., Brennan, J., Zupicich, J., Scherz, P., Leighton, P. A., Goodrich, L. V., Lu, X., Avery, B. J., Tate, P., Dill, K., Pangilinan, E., Wakenight, P., Tessier-Lavigne, M., and Skarnes, W. C. (2001) Functional analysis of secreted and transmembrane proteins critical to mouse development. *Nat. Genet.* **28**, 241–249
39. Ido, H., Ito, S., Taniguchi, Y., Hayashi, M., Sato-Nishiuchi, R., Sanzen, N., Hayashi, Y., Futaki, S., and Sekiguchi, K. (2008) Laminin isoforms containing the gamma3 chain are unable to bind to integrins due to the absence of the glutamic acid residue conserved in the C-terminal regions of the gamma1 and gamma2 chains. *J. Biol. Chem.* **283**, 28149–28157
40. Schrock, Y., Solis, G. P., and Stuermer, C. A. (2009) Regulation of focal adhesion formation and filopodia extension by the cellular prion protein (PrPC). *FEBS Lett.* **583**, 389–393
41. Hajj, G. N., Lopes, M. H., Mercadante, A. F., Veiga, S. S., da Silveira, R. B., Santos, T. G., Ribeiro, K. C., Juliano, M. A., Jachieri, S. G., Zanata, S. M., and Martins, V. R. (2007) Cellular prion protein interaction with vitronectin supports axonal growth and is compensated by integrins. *J. Cell Sci.* **120**, 1915–1926
42. Yamada, Y., and Kleinman, H. K. (1992) Functional domains of cell adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 819–823
43. Malinda, K. M., Nomizu, M., Chung, M., Delgado, M., Kuratomi, Y., Yamada, Y., Kleinman, H. K., and Ponce, M. L. (1999) Identification of laminin alpha1 and beta1 chain peptides active for endothelial cell adhesion, tube formation, and aortic sprouting. *FASEB J.* **13**, 53–62
44. Liesi, P. (1985) Do neurons in the vertebrate CNS migrate on laminin? *EMBO J.* **4**, 1163–1170
45. Wiksten, M., Liebkind, R., Laatikainen, T., and Liesi, P. (2003) Gamma 1 laminin and its biologically active KDI-domain may guide axons in the floor plate of human embryonic spinal cord. *J. Neurosci. Res.* **71**, 338–352
46. Wiksten, M., Vaananen, A., Liebkind, R., Rauhala, P., and Liesi, P. (2004) Soluble KDI domain of gamma1 laminin protects adult hippocampus from excitotoxicity of kainic acid. *J. Neurosci. Res.* **78**, 411–419
47. Vaananen, A. J., Rauhala, P., Tuominen, R. K., and Liesi, P. (2006) KDI tripeptide of gamma1 laminin protects rat dopaminergic neurons from 6-OHDA induced toxicity. *J. Neurosci. Res.* **84**, 655–665
48. Krebs, B., Wiebelitz, A., Balitzki-Korte, B., Vassallo, N., Paluch, S., Mitteregger, G., Onodera, T., Kretschmar, H. A., and Herms, J. (2007) Cellular prion protein modulates the intracellular calcium response to hydrogen peroxide. *J. Neurochem.* **100**, 358–367
49. Brini, M., Miuazzo, M., Pierobon, N., Negro, A., and Sorgato, M. C. (2005) The prion protein and its paralogue Doppel affect calcium signaling in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Biol. Cell* **16**, 2799–2808
50. Fuhrmann, M., Bittner, T., Mitteregger, G., Haider, N., Moosmang, S., Kretschmar, H., and Herms, J. (2006) Loss of the cellular prion protein affects the Ca²⁺ homeostasis in hippocampal CA1 neurons. *J. Neurochem.* **98**, 1876–1885
51. Kristensson, K., Feuerstein, B., Taraboulos, A., Hyun, W. C., Prusiner, S. B., and DeArmond, S. J. (1993) Scrapie prions alter receptor-mediated calcium responses in cultured cells. *Neurology* **43**, 2335–2341

52. Bruno, V., Battaglia, G., Copani, A., D'Onofrio, M., Di Iorio, P., De Blasi, A., Melchiorri, D., Flor, P. J., and Nicoletti, F. (2001) Metabotropic glutamate receptor subtypes as targets for neuroprotective drugs. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **21**, 1013–1033
53. Maiese, K., Chong, Z. Z., and Li, F. (2005) Driving cellular plasticity and survival through the signal transduction pathways of metabotropic glutamate receptors. *Curr. Neurovasc. Res.* **2**, 425–446
54. Ribeiro, F. M., Ferreira, L. T., Paquet, M., Cregan, T., Ding, Q., Gros, R., and Ferguson, S. S. (2009) Phosphorylation-independent regulation of metabotropic glutamate receptor 5 desensitization and internalization by G protein-coupled receptor kinase 2 in neurons. *J. Biol. Chem.* **284**, 23444–23453
55. Brugger, B., Graham, C., Leibrecht, I., Mombelli, E., Jen, A., Wieland, F., and Morris, R. (2004) The membrane domains occupied by glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein and Thy-1 differ in lipid composition. *J. Biol. Chem.* **279**, 7530–7536
56. Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Chebassier, C., Laplanche, J. L., Lehmann, S., Launay, J. M., and Kellermann, O. (2000) Signal transduction through prion protein. *Science* **289**, 1925–1928
57. Jen, A., Parkyn, C. J., Mootoosamy, R. C., Ford, M. J., Warley, A., Liu, Q., Bu, G., Baskakov, I. V., Moestrup, S., McGuinness, L., Emptage, N., and Morris, R. J. (2010) Neuronal low-density lipoprotein receptor-related protein 1 binds and endocytoses prion fibrils via receptor cluster 4. *J. Cell Sci.* **123**, 246–255
58. Magalhaes, A. C., Silva, J. A., Lee, K. S., Martins, V. R., Prado, V. F., Ferguson, S. S., Gomez, M. V., Brentani, R. R., and Prado, M. A. (2002) Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. *J. Biol. Chem.* **277**, 33311–33318
59. Francesconi, A., Kumari, R., and Zukin, R. S. (2009) Regulation of group I metabotropic glutamate receptor trafficking and signaling by the caveolar/lipid raft pathway. *J. Neurosci.* **29**, 3590–3602
60. Romano, S. A., Cordeiro, Y., Lima, L. M., Lopes, M. H., Silva, J. L., Foguel, D., and Linden, R. (2009) Reciprocal remodeling upon binding of the prion protein to its signaling partner hop/STII. *FASEB J.* **23**, 4308–4316
61. Hannan, A. J., Blakemore, C., Katsnelson, A., Vitalis, T., Huber, K. M., Bear, M., Roder, J., Kim, D., Shin, H. S., and Kind, P. C. (2001) PLC-beta1, activated via mGluRs, mediates activity-dependent differentiation in cerebral cortex. *Nat. Neurosci.* **4**, 282–288
62. Huber, K. M., Roder, J. C., and Bear, M. F. (2001) Chemical induction of mGluR5- and protein synthesis-dependent long-term depression in hippocampal area CA1. *J. Neurophysiol.* **86**, 321–325
63. Castiglione, M., Calafiore, M., Costa, L., Sortino, M. A., Nicoletti, F., and Copani, A. (2008) Group I metabotropic glutamate receptors control proliferation, survival and differentiation of cultured neural progenitor cells isolated from the subventricular zone of adult mice. *Neuropharmacology* **55**, 560–567
64. Renner, M., Lacor, P. N., Velasco, P. T., Xu, J., Contractor, A., Klein, W. L., and Triller, A. (2010) Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5. *Neuron* **66**, 739–754

*Received for publication April 26, 2010.
Accepted for publication September 9, 2010.*