

**INTERAÇÕES PROTEÍNA PRÍON E SEUS
LIGANTES STI1 E LAMININA: POSSÍVEIS
IMPLICAÇÕES NA DOENÇA DE ALZHEIMER**

BIANCA LUISE TEIXEIRA

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Vilma Regina Martins

Co-Orientadora: Dra. Glaucia N.M. Hajj

São Paulo

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Teixeira, Bianca

Interações proteína príon e seus ligantes STI1 e laminina: possíveis implicações na doença de Alzheimer / Bianca Teixeira – São Paulo, 2015.

104p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Vilma Regina Martins

Descritores: 1. DOENÇA DE ALZHEIMER/genética. 2. PROTEÍNAS PRP^C. 3. PEPTÍDEOS BETA-AMILOIDES. 4. LAMININA.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Vilma Regina Martins, pela oportunidade de integrar seu grupo de pesquisa, e por toda atenção dispensada.

À minha co-orientadora Dra. Glaucia Hajj, por todos os ensinamentos.

Aos meus colegas do laboratório de Biologia Celular e Molecular, incluindo alunos, pesquisadores, técnicos e bioteristas, por todo apoio e suporte.

A todos os colegas que participaram direta ou indiretamente deste trabalho.

A todos meus amigos que estiveram do meu lado física ou mentalmente, nos momentos mais difíceis, me incentivando e não deixando que eu desistisse.

Aos funcionários da Pós-Graduação do A.C. Camargo Cancer Center, por toda atenção e paciência.

À bibliotecária Suely, pela colaboração durante a formatação da tese.

À minha família, meus pais e irmãos, por todo amor, dedicação e apoio. Se não fosse por vocês eu não teria chegado até aqui. Agradeço muito à Deus por ter vocês na minha vida.

Ao Juan, por ser tão paciente, e por todo incentivo, compreensão e encorajamento.

Ao apoio da FAPESP pela bolsa de Doutorado.

RESUMO

Teixeira B. **Interações proteína príon e seus ligantes STI1 e laminina: possíveis implicações na doença de Alzheimer.** São Paulo; 2015. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

A Doença de Alzheimer (DA) é uma demência progressiva que tem como principais características a disfunção sináptica e a neurodegeneração em áreas específicas do cérebro, que levam a um quadro grave de perda de memória e outras habilidades cognitivas. Uma das principais características neuropatológicas é a deposição de placas amiloides extracelulares, que contêm principalmente o peptídeo beta-amiloide ($A\beta$), que é formado por um processamento alterado da proteína precursora amiloide (APP). Os oligômeros formados por $A\beta$ ($A\beta O$) são considerados os elementos tóxicos mais importantes deste processo, esses se ligam às sinapses e estão estreitamente relacionados com a patogênese da DA. Recentemente, foi descrito que a proteína príon celular (PrP^C) é um receptor para $A\beta O$, porém, os mecanismos envolvidos nesta interação e de que forma esta pode estar relacionada à DA ainda não foram elucidados. PrP^C é uma glicoproteína ancorada à membrana plasmática que interage com diversos ligantes, como a proteína de matriz extracelular laminina e a co-chaperona STI1 (*Stress Inducible Protein 1*). Estas interações induzem neuroproteção, neuritogênese e modulam a formação de memória. Deste modo, torna-se interessante verificar um possível efeito neuroprotetor dos ligantes de PrP^C contra a toxicidade produzida pelos $A\beta O$. Utilizando culturas neuronais, observamos que os tratamentos com $A\beta O$ levam uma diminuição nos níveis da proteína sináptica sinaptofisina (Syp), devido a um aumento da degradação de Syp pelo proteassomo. Já o tratamento com STI1 recombinante, por si só, é capaz de aumentar as concentrações de Syp e impedir a diminuição de Syp pelo tratamento com $A\beta O$. Nem o tratamento com $A\beta O$, nem o tratamento com STI1 alteram as concentrações de Syp em neurônios de animais

knockout para PrP^C, indicando que esses efeitos dependem da presença de PrP^C. Além disso, nossos dados apontam que o receptor nicotínico α -7 de acetilcolina é componente desta via de sinalização, uma vez que sua inibição bloqueia os efeitos protetores do complexo PrP^C-STI1. Uma vez que a STI1 é secretada por astrócitos na superfície de vesículas extracelulares, e pode mediar neuroproteção, avaliamos se o tratamento de neurônios com vesículas de astrócitos era capaz de alterar os níveis de Syp dessas células, assim como a STI1 recombinante. Infelizmente não observamos proteção neuronal quando tratamos os neurônios com vesículas extracelulares de astrócitos tipo selvagem ou ainda com aquelas derivadas de astrócitos que superexpressam STI1 (TgA). No entanto, demonstramos que os astrócitos de animais TgA têm uma alteração na secreção de VEs, e um aumento em proteínas da via autofágica. Investigamos também o efeito protetor do peptídeo de laminina que corresponde ao sítio de ligação em PrP^C (peptídeo γ 1) sobre a toxicidade induzida por A β O, em sinaptossomos. Observamos que os efeitos tóxicos dos A β O, medidos pelas concentrações neuronais de sinaptofisina, são revertidos quando os sinaptossomos são tratados com γ 1. Neste caso, o mecanismo envolve os receptores metabotrópicos de glutamato tipo 5 (mGluR5). Deste modo, nossos resultados descrevem um papel neuroprotetor dos ligantes de PrP^C, STI1 e γ 1, contra a atividade tóxica dos A β O e apontam para a relevância de sua exploração como futuras ferramentas terapêuticas na DA.

SUMMARY

Teixeira B. **[Interactions of the prion protein and its ligands STI1 and laminin: possible implications for Alzheimer's disease]**. São Paulo; 2015. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Alzheimer's disease (AD) is a progressive dementia mainly characterized by synaptic dysfunction and neurodegeneration in specific areas of the brain, leading to severe memory loss, and others cognitive inabilities. One of the main neuropathological characteristics is the formation of extracellular amyloid plaques, which mainly contain beta-amyloid peptide ($A\beta$). This peptide is formed by an alteration in the processing of the amyloid precursor protein (APP). The $A\beta$ oligomers ($A\beta O$) are considered the major toxic components within this process where they bind to synapses and are closely related to the pathogenesis of the AD. Recently, it was reported that PrP^C is a receptor for $A\beta O$, however, the mechanisms involved in this interaction and how this may be related to AD have not yet been elucidated. The cellular prion protein (PrP^C) is a glycoprotein anchored to the plasma membrane that interacts with several ligands such as the co-chaperone STI1 (Stress inducible protein 1) and the extracellular matrix protein laminin. These interactions induce neuroprotection, neuritogenesis, and modulate memory formation. Therefore, it becomes interesting to verify a possible neuroprotective effect of PrP^C ligands against the toxicity induced by $A\beta O$. We observed that the treatment of neuronal cultures with $A\beta O$ lead to a decrease in the levels of synaptic protein synaptophysin (Syp) due to an increase of Syp degradation by the proteasome. Moreover, the treatment with recombinant STI1 increased the concentrations of Syp in wild-type neurons, and protected them from the toxic effects of $A\beta O$. Neither $A\beta O$ treatment nor STI1 treatment altered Syp concentrations in neurons from PrP^C knockout animals, indicating that these effects were dependent on the presence of PrP^C . Furthermore, our results indicate that the alfa7 nicotinic

acetylcholine receptor is a component of this signaling pathway while its inhibition impairs neuroprotection mediated by the PrP^C-STI1 complex. Since STI1 is secreted by astrocytes at the surface of extracellular vesicles and modulates neuroprotection, we tested whether these vesicles interfere with Syp levels in neurons, as well as recombinant STI1. Unfortunately, our results do not show any neuroprotection either when vesicles derived from wild-type astrocytes or those derived from astrocytes that overexpress STI1 (TgA). Nevertheless, these results showed that TgA astrocytes present an increased expression of proteins involved with autophagy. We also investigated the effect of laminin peptide corresponding to the PrP^C binding site (peptide γ 1) upon the toxicity induced by A β O. We observed that the treatment with γ 1 is capable to prevent the decrease in Syp concentrations after treatment with A β O, and in this case the effect was mediated by type 5-metabotropic glutamate receptor (mGluR5). Thus, our results suggest a neuroprotective role of the PrP^C ligands STI1 and γ 1 against the neurotoxic activity of A β O and indicate its possible exploitation as future therapeutic tools in AD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Oligômeros A β diminuem os níveis de Syp mas não alteram os níveis de fosforilação de eIF2 α	32
Figura 2	Efeito dos oligômeros A β sobre a degradação de proteínas.....	33
Figura 3	Efeito dos oligômeros A β sobre a síntese de proteínas.....	34
Figura 4	Efeito do ligante de PrP ^C STI1 sobre a expressão de Syp.....	36
Figura 5	STI1 aumenta os níveis de Syp e protege contra os danos neurotóxicos causados pelos A β O.....	37
Figura 6	STI1 não produz efeito na expressão de Syp quando adicionado junto ou depois dos oligômeros A β	38
Figura 7	Efeitos do STI1 sobre a expressão de Syp são dependentes de α 7AChR.....	40
Figura 8	Caracterização das VEs isoladas de culturas primárias de astrócitos.....	41
Figura 9	Efeito do tratamento com meio condicionado e VEs de astrócitos nos níveis de Syp de neurônios hipocampais.....	42
Figura 10	Caracterização das VEs secretadas por astrócitos que superexpressam STI1.....	43
Figura 11	Efeito do tratamento com VEs de astrócitos TgA nos níveis de Syp de neurônios hipocampais.....	44

Figura 12	Expressão das proteínas envolvidas na via de secreção de VEs....	45
Figura 13	Análise da localização de LBPA em astrócitos WT e TgA na presença ou ausência de SFB.....	47
Figura 14	Esquema do <i>crossstalk</i> entre a secreção de exossomos e autofagia na manutenção da homeostase celular.....	48
Figura 15	Análise da expressão de proteínas envolvidas na via de autofagia.....	49
Figura 16	Pureza da preparação de sinaptossomos.....	50
Figura 17	O ligante de PrP ^C γ 1 protege contra a perda de sinaptofisina causada pelos A β O.....	51
Figura 18	O efeito de γ 1 na expressão sinaptofisina após tratamento com A β O depende mGluR5.....	52
Figura 19	Presença de A β 42 humano em homogenato de cérebro de animal APP/PS1.....	53
Figura 20	Imunohistoquímica para peptídeo β amiloide e coloração com Fluoro-Jade em cortes de cérebro de camundongos transgênicos APP/PS1.....	54
Figura 21	Análise das memórias de curta (STM) e longa duração (LTM) em camundongos adultos tipo-selvagem e transgênicos APP/PS1 na tarefa de reconhecimento de objetos.....	56
Figura 22	Avaliação de memória contextual de curto e longo prazo em camundongos APP/PS1.....	57
Figura 23	Imagens representativas de construção de ninho.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

α7nAChR	Receptor nicotínico α -7 de acetilcolina
α-Bgt	α -bungarotoxina
Aβ	β -amiloide
AβO	Oligômeros de A β
ANOVA	Análise de Variância
APP	Proteína precursora amiloide
BSA	Albumina de soro bovino
Ca²⁺	Cálcio
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
Chx	Cicloheximida
DA	Doença de Alzheimer
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EP	Erro padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimática
ERK1/2	Cinases 1 e 2 reguladas por sinais extracelulares
GPI	Glicosil-fosfatidil-inositol
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	Ácido N-(2-hidroxi-etil)piperazina-N'-2-etanossulfônico
NaCl	Cloreto de sódio
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
HRP	Peroxidase do rábano silvestre
IgG	Imunoglobulina G
KCl	Cloreto de potássio
Ln	Laminina
LTM	Memória de longa duração
LTP	Potenciação de longa duração
mAb	Anticorpo monoclonal
mGluRs	Receptores metabotrópicos de glutamato

MPEP	2-metil-6-(2-feniletil)piridina
MVBs	Corpos multivesiculares
NCAM	Proteína neuronal de adesão celular
NGF	Fator de crescimento de nervo
NMDA	Receptor N-Metil-D-Aspartato
PBS	Tampão Fosfato Salina
PKA	Proteína cinase dependente de AMPc
PLC	Fosfolipase C
PrP^C	Proteína príon celular
PrP^{Sc}	Proteína príon scrapie
PS1	Proteína presenilina-1
PSD	Complexo de densidade pós-sináptica
RO	Reconhecimento de Objetos
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SPF	Livre de patógenos específicos
STI1	Stress Inducible Protein 1
STM	Memória de curta duração
Syg	Sinaptogirina
Syp	Sinaptofisina
TBS-T	Tampão Fosfato Salina contendo 0,05% de Tween 20
TFA	Ácido tri-fluoro acético
TREK-1	Canais de íons relacionados a Potássio
Tris	Trisaminometano
VEs	Vesículas extracelulares
VGCC	Receptores de cálcio dependentes de voltagem
WT	Tipo selvagem

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
1.1	Doença de Alzheimer	1
1.2	PrP ^C e suas funções fisiológicas	6
1.3	PrP ^C , Stress Inducible Protein 1 e laminina	7
1.4	Doença de Alzheimer e PrP ^C	10
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo geral	15
2.2	Objetivos específicos	15
3	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1	Descrição detalhada da espécie animal	17
3.2	Culturas primárias de neurônios hipocampais e astrócitos	18
3.3	Separação de frações de meio condicionado, sobrenadante e vesículas extracelulares de astrócitos	20
3.4	Preparação dos oligômeros	21
3.5	Tratamentos com STI1, STI1del, e com o peptídeo STI1 ₂₃₀₋₂₄₅	22
3.6	Imunocitoquímica	22
3.7	Quantificação da fluorescência	23
3.8	Purificação de sinaptossomos hipocampais	24
3.9	Análise das proteínas por <i>Western blot</i>	25
3.10	Avaliação neuropatológica e comportamental dos animais transgênicos APP/PS1	27
3.11	Análise Estatística	30
4	RESULTADOS	31
4.1	Mecanismos associados à regulação da expressão de sinaptofisina por A β O	31
4.2	Análise do efeito neuroprotetor de STI1 em culturas primárias de	

	neurônios hipocampais tratadas com A β	35
4.3	Papel da interação de α 7nAChR sobre os efeitos causados por STI1 na expressão de Syp	39
4.4	Papel de fatores secretados por astrócitos nos níveis de Syp de culturas primárias neuronais.....	40
4.5	Mecanismos associados com a alteração na secreção de vesículas em astrócitos derivados de animais que superexpressam STI1.....	45
4.6	Papel do ligante de PrP ^C o peptídeo γ 1 de laminina na proteção da neurotoxicidade mediada por A β O	49
4.7	Análise do perfil neuropatológico e comportamental dos animais transgênicos APP/PS1	52
5	DISCUSSÃO	59
5.1	O tratamento com A β O inibe os níveis celulares de sinaptofisina pela degradação via proteassomo	59
5.2	STI1 recombinante é capaz de proteger neurônios hipocampais dos efeitos tóxicos de A β O.....	63
5.3	Efeitos de STI1 no aumento de Syp em neurônios hipocampais são via interação com α 7nAChR.....	67
5.4	Tratamentos com vesículas extracelulares de astrócitos tipo selvagem e que superexpressam STI1 não foram capazes de mediar proteção contra toxicidade de A β O	70
5.5	Alteração na secreção de vesículas e aumento de autofagia em astrócitos derivados de animais que superexpressam STI1	73
5.6	O peptídeo γ 1 de laminina mediante interação com PrP ^C protege dos efeitos tóxicos de A β O via mGluR5.....	78
5.7	Animais transgênicos APP/PS1 com características patológicas de DA não apresentam alterações comportamentais nos testes de reconhecimento de objetos, esQUIVA INIBITÓRIA e nidificação	80
6	CONCLUSÕES	86

7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
----------	---	-----------

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética no uso de Animais
da Fundação Antônio Prudente-CEUA/FAP

Anexo 2 Artigo publicado na J Neurosci 2013; 33(42):16552-64

Anexo 3 Artigo em preparação para submissão.

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE ALZHEIMER

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença que causa demência progressiva, e que tem como características a disfunção sináptica e a neurodegeneração em áreas específicas do cérebro, como o hipocampo e o córtex, que levam a um quadro grave de perda de memória, inabilidade de formação de novas memórias e ao dano de outras habilidades cognitivas, incluindo atenção e controle de resposta (Li et al. 2009; KIM et al. 2010; ROMBERG et al. 2013). As principais características neuropatológicas são a deposição de placas amiloides extracelulares, que contêm principalmente o peptídeo β -amiloide ($A\beta$), e emaranhados neurofibrilares intracelulares, formados pela proteína tau hiperfosforilada. Adicionalmente, a distrofia neurítica e a perda de sinapses, assim como a morte neuronal, também são características patológicas marcantes encontradas na DA (LI et al. 2009). A forma familiar da DA atinge menos de 1% dos casos e está ligada a mutações autossômicas dominantes ou a variantes patogênicas herdadas dos genes *APP* (do inglês *amyloid precursor protein*), que codifica para a proteína precursora amiloide, localizado no cromossomo 21, e *PSEN1*, que codifica para a proteína presenilina-1 (PS1), no cromossomo 14 (HARDY e HIGGINS 1992). Mais de 60 mutações já foram descritas para presenilina-1, afetando o processamento de APP. O início tardio da DA familiar está

associado a mutações na presenilina-2 e variante E4 do gene da apoE no cromossomo 19 (BERTRAM et al. 2010).

O peptídeo A β é formado pela clivagem proteolítica da APP por ação de α , β e γ secretases. A APP é uma proteína transmembrana e seu processamento pode ter como produtos peptídeos de tamanhos distintos, que variam entre 38 a 43 resíduos de aminoácidos. Os peptídeos formados mais comuns são os de 40 e 42 aminoácidos, sendo o de 40 resíduos o mais abundante, enquanto o de 42 (A β 42) é o mais amiloidogênico, isto é, mais favorável para a formação de oligômeros e agregados insolúveis (CHOW et al. 2010).

O enovelamento incorreto de proteínas e a subsequente auto-agregação descontrolada ou indesejada são considerados atualmente mecanismos potenciais para o desenvolvimento de diversas doenças neurodegenerativas (WALSH E SELKOE 2004). De fato, o depósito de proteínas mal enoveladas é considerado o cerne de várias patologias conhecidas como doenças conformacionais, como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de corpos de Lewy, amiloidose associada à hemodiálise, doença de Huntington, doença de Creutzfeld–Jakob, insônia familiar fatal e outras (UVERSKY 2010). Durante o processo de agregação, os monômeros se agrupam formando oligômeros, que por sua vez podem se agregar em fibrilas ou placas (SELKOE 2008). É crescente o reconhecimento de que oligômeros são as entidades responsáveis pela disfunção e degeneração neuronais, e são potencialmente mais citotóxicos que as fibras maduras (SHANKAR et al. 2008).

O peptídeo A β é capaz de formar oligômeros (A β O), que são ligantes patogênicos de sinapses, afetando processos relacionados com a plasticidade sináptica e a formação de memória (KLEIN et al. 2001; WALSH E SELKOE 2004; FUKUCHI et al. 2006, SELKOE 2008; FIGUEIREDO et al. 2013). Vários estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo* têm demonstrado que essas espécies solúveis de A β prejudicam a plasticidade sináptica e inibem a potenciação de longa duração (LTP, do inglês *long term potentiation*), importante processo eletrofisiológico correlacionado com formação de memória e aprendizado (SELKOE 2008; LAURÉN et al. 2009; GIMBEL et al. 2010). Trabalhos recentes mostram evidências de que os receptores de glutamato estão envolvidos centralmente nos mecanismos pelos quais os A β O interferem nas sinapses e as tornam não funcionais (Revisado por PAULA-LIMA et al. 2013).

Um marcador muito utilizado para monitorar plasticidade sináptica e para investigar a formação de sinapses durante o desenvolvimento é a sinaptofisina (Syp), uma glicoproteína integral de membrana de vesículas pré-sinápticas presente em células neuroendócrinas e também nos neurônios do encéfalo e da medula espinal. Essa proteína está envolvida na exocitose, formação sináptica, biogênese e endocitose de vesículas sinápticas (THIELE et al. 2000; DALY et al. 2000; VALTORTA et al. 2004; ARTHUR e STOWELL 2007; KWON e CHAPMAN 2011).

Estudos indicam que a Syp está intimamente relacionada ao remodelamento sináptico e aos processos cognitivos, além de exercer papel importante na plasticidade sináptica (JANZ et al. 1999; DAVIES et al. 2003;

SCHMITT et al. 2009). Surpreendentemente, camundongos *knockout* para Syp são viáveis e não possuem fenótipo alterado (EVANS e COUSIN 2005; MCMAHON et al. 1996). Isso é devido à expressão de proteínas com funções redundantes às de Syp, como sinaptogirina (Syt) ou sinaptoporina. No entanto, camundongos *knockout* duplo para Syp e Syt apresentam diminuição no potencial de longa duração (JANZ et al. 1999). Em modelos de DA, a perda progressiva de Syp é bem estabelecida e pode estar correlacionada com a piora do estado cognitivo dos pacientes (MUCKE et al. 2000; JANZ et al. 1999; DERKSEN et al. 2007). Estudos demonstraram perda prematura de imunorreatividade para Syp no hipocampo e, em menor quantidade, no neocórtex de pacientes com DA precoce (MASLIAH et al. 1994; MASLIAH et al. 2001).

Esforços concentram-se no desenvolvimento de terapias para a DA, entretanto ainda não existe um tratamento eficaz e definitivo. As drogas utilizadas atualmente podem atuar sobre a neurotransmissão, sobre o acúmulo de proteína agregada (A β O e tau), ou ainda restabelecendo a função mitocondrial ou o balanço de fatores de crescimento. A estratégia mais convencional é a prescrição de combinação de drogas, como o uso de inibidores de acetilcolinesterase juntamente com antagonistas de receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA) (GAUTHIER e MOLINUEVO 2013; PARSONS et al. 2013).

Uma abordagem terapêutica que tem recebido muita atenção na última década é a utilização de imunização contra A β . Os primeiros relatos em modelos animais de DA mostraram que este tratamento pode de fato

levar à redução dos níveis totais de amiloide no cérebro, bem como à remoção das placas senis. Além disso, mostraram um efeito significativo da imunoterapia na eliminação de déficits comportamentais em modelo animal (SCHENK et al. 1999; JANUS et al. 2000; MORGAN et al. 2000). Desde então, a imunoterapia contra A β tem sido o foco de uma série de ensaios clínicos revisado por LANNFELT et al. (2014). Em um trabalho recente foi levantada a possibilidade de imunoterapia com o uso de anticorpos naturais contra A β . Nesse trabalho foi demonstrado, em modelo animal transgênico, que o uso de anticorpos naturais contra A β é capaz de reverter a disfunção sináptica e a modulação da liberação de citocinas pró-inflamatórias, bem como reduzir a formação de oligômeros tóxicos, levando à melhora cognitiva (MENGEL et al. 2013).

Outra possibilidade terapêutica interessante e muito importante é a utilização de fatores neurotróficos. Neurônios colinérgicos dependem de fator de crescimento de nervo (NGF, do inglês *nerve growth factor*) para a sobrevivência e crescimento e, recentemente, vários achados sugerem a relação entre o desbalanço de NGF, a ativação da via amiloidogênica e a neurodegeneração na DA. Administrações locais de NGF em neurônios colinérgicos do mesencéfalo basal têm se mostrado eficientes na estimulação da função sináptica, na prevenção da morte celular e na promoção da melhora cognitiva em modelos animais (CATTANEO et al. 2008). Desta forma, a descoberta de novos fatores neurotróficos, ou de novas funções, tem grande importância para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da DA.

1.2 PrP^C E SUAS FUNÇÕES FISIOLÓGICAS

A proteína príon celular (PrP^C) é uma glicoproteína de aproximadamente 250 aminoácidos de 27kDa que se encontra ancorada na membrana plasmática celular através de uma âncora de glicosil-fosfatidilinositol (GPI), preferencialmente localizada em domínios de membrana ricos em colesterol, denominados “rafts” (PRUSINER 1991; LINDEN et al. 2008). PrP^C é constitutivamente expresso em diferentes tecidos de animais adultos e abundantemente expresso em células neurais (FORD et al. 2002).

Diversos modelos têm sido empregados no sentido de entender a função biológica de PrP^C, e nos últimos anos vários ligantes de PrP^C foram identificados. Por exemplo, foi demonstrado que PrP^C liga-se a proteínas de matriz extracelular como vitronectina e laminina, induzindo crescimento axonal, adesão neuronal e neuritogênese, respectivamente (GRANER et al. 2000a e b; HAJJ et al. 2007). PrP^C modula a atividade de receptores de matriz extracelular, como o receptor de integrina $\alpha v \beta 3$, controlando o crescimento axonal de gânglios da raiz dorsal (HAJJ et al. 2007). A proteína neuronal de adesão celular (NCAM) também interage com PrP^C, promovendo adesão e diferenciação neuronal (SANTUCCIONE et al. 2005). Receptores ligados à proteína G, como os receptores serotoninérgicos (MOUILLET-RICHARD et al. 2000; MOUILLET-RICHARD et al. 2005; MOUILLET-RICHARD et al. 2007) e receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) (BERALDO et al. 2011; SANTOS et al. 2012; UM et al. 2013), assim como os canais de íons relacionados a Potássio (TREK-1) (AZZALIN

et al. 2006), receptores de Cálcio dependentes de voltagem (VGCC) (WHATLEY et al. 1995; HERMS et al. 2000; FUHRMANN et al. 2006) e o receptor NMDA também são modulados por PrP^C (KHOSRAVANI et al. 2008; revisado por MARTINS et al. 2010).

1.3 PrP^C, STRESS INDUCIBLE PROTEIN 1 E LAMININA

Outro importante ligante de PrP^C é a co-chaperona STI1 (do inglês, *Stress Inducible Protein 1*). Essa proteína foi inicialmente identificada em leveduras, interagindo simultaneamente com as proteínas de choque térmico Hsp70 e Hsp90 (NICOLET e CRAIG 1989). Dados recentes do nosso grupo mostram que o camundongo *knockout* para STI1 morre no décimo dia de vida embrionária. Notavelmente, os níveis de diversas proteínas clientes de Hsp90/Hsp70/STI1 estão reduzidos nesses embriões, o que pode contribuir para letalidade embrionária (BERALDO et al. 2013). Assim, foi proposto que STI1 possui uma atividade única de co-chaperona durante o desenvolvimento, que não pode ser compensada por outras co-chaperonas (BERALDO et al. 2013).

Os primeiros estudos sobre a funcionalidade da interação entre PrP^C e STI1 ocorreram logo após a identificação de STI1 como sendo um ligante/receptor de PrP^C responsável por mediar a internalização de PrP^C e inibir a toxicidade do peptídeo 106-126 de PrP^C (MARTINS et al. 1997). Esses estudos enfatizaram a importância da interação entre esses dois ligantes em células neuronais. A interação entre PrP^C e STI1 induz ativação

de PKA (proteína cinase dependente de AMPc) e de ERK1/2 (cinases 1 e 2 reguladas por sinais extracelulares), de forma que a primeira via está relacionada com neuroproteção e a última induz neuritogênese (CHIARINI et al. 2002; ZANATA et al. 2002; LOPES et al. 2005).

A distribuição intracelular de STI1 é predominantemente citoplasmática, entretanto, já foi descrita sua presença no núcleo, o que aponta para a existência de um processo de importação nuclear de STI1 (LÄSSLE et al. 1997; LONGSHAW et al. 2000). Foi também verificado que STI1, assim como PrP^C, é secretada por astrócitos na superfície de vesículas extracelulares (VEs), atuando como moléculas tróficas na neuritogênese e sobrevivência neuronal (LIMA et al. 2007; HAJJ et al. 2013). Segundo HAJJ et al. (2013) a associação de STI1 a VEs (semelhantes a exossomos) reforça seus efeitos sobre a ativação de ERK1/2 dependente de PrP^C em neurônios, de forma que são necessárias quantidades 3 vezes menores de STI1 associada a vesículas que a quantidade necessária da proteína solúvel para produzir o mesmo nível de ativação.

Além disso, a associação de STI1 a PrP^C *in vivo* modula tanto a formação de memória de curta duração (STM, do inglês, *short-term memory*) quanto à consolidação de memória de longa duração (LTM, do inglês *long-term memory*) (COITINHO et al. 2007). Estudos recentes demonstraram que a interação entre essas duas proteínas na membrana plasmática induz a endocitose de PrP^C, que é necessária para modular a sinalização de ERK1/2 envolvida na neuritogênese (CAETANO et al. 2008).

Um trabalho do nosso grupo mostrou que a ligação STI1-PrP^C aumenta o influxo de cálcio através de receptores nicotínicos α -7 de acetilcolina (α 7nAChR). Esse resultado demonstra um novo mecanismo de transdução de sinal extracelular mediado por PrP^C, com implicações na regulação da função sináptica e diferenciação neuronal (BERALDO et al. 2010). Também foi recentemente demonstrado o papel de STI1 na neuroproteção contra insultos isquêmicos. Em conformidade com este achado, este tipo de insulto leva ao aumento da secreção de STI1 por astrócitos e ativação de PrP^C (BERALDO et al. 2013).

PrP^C também interage com a proteína de matriz extracelular laminina (Ln) com alta afinidade. O sítio de ligação para Ln foi mapeado entre os aminoácidos 1575–1584 na cadeia γ 1 da Ln e entre 170-178 em PrP^C. A interação entre o peptídeo de γ 1 (que representa a o sítio de ligação entre Ln-PrP^C) e PrP^C induz neuritogênese e reproduz o fenótipo de diferenciação neuronal promovida pela ligação entre Ln e PrP^C (GRANER et al. 2000a e b), além de promover axonogênese em neurônios de gânglio de raiz dorsal, atuando sinergicamente com STI1 (SANTOS et al. 2012). *In vivo*, a interação Ln-PrP^C participa da consolidação da memória de longa e curta duração (COITINHO et al. 2006). Essa interação leva a ativação de fosfolipase C (PLC) e a mobilização de cálcio culminando na ativação de ERK1/2. A sinalização transmembranar mediada por PrP^C é dependente de receptores metabotrópicos de glutamato do grupo 1 (mGluR1 ou mGluR5), evidenciando que o complexo multiproteico organizado por PrP^C (MARTINS et al. 2002; LINDEN et al. 2008; MARTINS et al. 2010) induz a sinalização

celular tendo consequências na plasticidade neuronal (BERALDO et al. 2011).

1.4 DOENÇA DE ALZHEIMER E PrP^C

Diversas semelhanças neuropatológicas entre as doenças por príons e a DA, e ainda, a coexistência de ambas, já foram descritas na literatura (HAINFELLNER et al. 1998). Adicionalmente, já foi mostrado que PrP^C encontra-se co-localizado com o peptídeo A β nas placas senis (VOIGTLÄNDER et al. 2001).

Um dos primeiros relatos demonstrando a relação molecular entre PrP^C e a DA foi descrito em 2007. PARKIN et al. (2007) descreveram que PrP^C inibe a clivagem da APP pela β -secretase regulando, desta forma, a produção do peptídeo neurotóxico A β . O grupo do Prof. Stritmatter, em um trabalho revolucionário, descreveu PrP^C como um receptor para A β O. O trabalho demonstrou que o tratamento de culturas organotípicas hipocampais de camundongos *knockout* para PrP^C com A β O não afeta a LTP (LAURÉN et al. 2009) enquanto que, em concordância com os dados da literatura, esta atividade estava comprometida em culturas controle de animais tipo selvagem. Logo em seguida, esse mesmo grupo publicou outro trabalho utilizando um modelo de camundongos transgênicos que superexpressam APP/PS1 e cujo gene de PrP^C foi depletado (APP^{swe}/PSen1DeltaE9 x *Prnp*^{-/-}). Estes animais apresentam acúmulo de A β , mas não apresentam déficit cognitivo (GIMBEL et al. 2010). Além disso,

o tratamento intraperitoneal com anticorpo monoclonal anti-PrP^C por vinte dias é capaz de reverter o déficit cognitivo apresentado nos camundongos transgênicos (APP/PS1) para DA (CHUNG et al. 2010). Outros trabalhos mais recentes mostram diversos papéis importantes de PrP^C contra os efeitos tóxicos de A β . Segundo (RIAL et al. 2012) a superexpressão de PrP^C é capaz de prevenir os efeitos de A β nos déficits de memória e aprendizagem espacial em modelo animal. Outro estudo demonstra que um catabólito da clivagem de PrP^C, o fragmento N1, protege os neurônios da morte celular induzida por A β (GUILLLOT-SESTIER et al. 2012). Também foi demonstrado que PrP^C recombinante possui forte influência na agregação de A β , atuando como um potente inibidor da fibrilização e prevenindo a formação de oligômeros tóxicos, ou induzindo uma mudança na agregação de A β para espécies não tóxicas ou competitivamente bloqueando a ligação de A β ao PrP^C associado à membrana celular (NIEZNANSKI et al. 2012). Ainda, trabalhos recentes sustentam o papel de PrP^C na toxicidade de A β , capturando e concentrando A β em oligômeros tóxicos (YOUNAN et al. 2013), induzindo apoptose (HYEON et al. 2012), além de ter sido demonstrado que PrP^C é requerido para morte neuronal induzida por A β , pois reduzindo ou eliminando PrP^C, ou ainda, bloqueando a ligação de A β a PrP^C usando anticorpos ou peptídeos de PrP^C, a morte neuronal é evitada (KUDO et al. 2012).

Há, no entanto, relatos de literatura onde este papel de PrP^C é controverso. BALDUCCI et al. (2010) descreveram que animais *knockout* para PrP^C e animais tipo-selvagem são igualmente suscetíveis ao dano

causado pelo tratamento com A β O na memória de reconhecimento de objetos. Ainda, CALELLA et al. (2010) demonstraram que a remoção ou superexpressão de PrP^C em animais transgênicos APP/PS1 não tem efeito na plasticidade sináptica hipocampal. Segundo HAAS et al. (2014), as inconsistências em ensaios de toxicidade utilizando A β O são provavelmente devido a diferentes composições das preparações de A β O.

Diversos estudos têm demonstrado que PrP^C é um sítio de ligação de alta afinidade para A β , tanto *in vivo* quanto *in vitro* (LAURÉN et al. 2009; BALDUCCI et al. 2010; CHEN et al. 2010; ZOU et al. 2011; FREIR et al. 2011; UM et al. 2012; LARSON et al. 2012; OSTAPCHENKO et al. 2013, Anexo 2). Segundo estudos recentes, PrP^C está concentrado nas sinapses, sendo um componente do complexo de densidade pós-sináptica (PSD). Esta localização de PrP^C, na PSD, é consistente com seu envolvimento nos efeitos locais de A β na plasticidade sináptica, retração de espinhas dendríticas e perda sináptica (UM et al. 2012). A ligação de A β a PrP^C nas espinhas dendríticas ativa a proteína cinase Fyn e promove dano sináptico e cognitivo em animais transgênicos (UM et al. 2012; LARSON et al. 2012). Foi demonstrado que a ligação entre PrP^C e Fyn ocorre via mGluR5, de forma que esse receptor é necessário para a ativação de Fyn e consequente comprometimento da função neuronal (UM et al. 2013). Recentemente foi identificado o sítio de interação de PrP^C com mGluR5, entre os aminoácidos 91-153 de PrP^C, e demonstrado que esta interação pode ser manipulada por agonistas/antagonistas que induzem mudança conformacional em mGluR5, ou por anticorpos que bloqueiem PrP^C (HAAS et al. 2014). Nesse mesmo

trabalho foi demonstrado que há um aumento na interação entre PrP^C e mGluR5 no cérebro de camundongos que expressam transgenes de DA familiar, ou que receberam administração aguda de A β O. A manipulação farmacológica da interação entre PrP^C e mGluR5 é capaz de resgatar os fenótipos relacionados à DA ocasionados por A β O (HAAS et al. 2014). Em um trabalho de SIMONYI et al. (2010) já havia sido demonstrado que um modulador alostérico negativo de mGluR5 tem um efeito similar ao dos anticorpos que bloqueiam a ligação de A β a PrP^C, no entanto, o antagonismo total de mGluR5 possui efeitos deletérios na função neuronal (SIMONYI et al. 2010). Assim, o ideal seria a utilização de alguma molécula que evitasse a ativação de mGluR5 por A β /PrP^C, porém, sem bloquear a função fisiológica desse receptor.

Recentemente, demonstramos que STI1 inibe a ligação de A β O a PrP^C *in vitro*, diminuindo a ligação de A β O aos neurônios primários hipocampais. Dessa maneira, o tratamento com STI1 pode neutralizar os efeitos tóxicos do A β O em neurônios e em fatias de cérebro. Neurônios derivados de camundongos heterozigotos para STI1 (expressando 50% do STI1 em comparação com animais do tipo selvagem) são mais sensíveis à toxicidade mediada por A β . Portanto, estes últimos resultados sugerem que a regulação da sinalização de PrP^C pode atenuar os efeitos tóxicos do A β O (OSTAPCHENKO et al. 2013, Anexo 1).

Desta forma, a interação PrP^C-A β O, apesar de controversa, é um tema de grande interesse na área de doenças neurodegenerativas. A utilização de ligantes de PrP^C como STI1 e Laminina pode ser uma

ferramenta valiosa para modular/interferir nos efeitos tóxicos provocados pelos A β O e, além disso, servir como alvos terapêuticos em DA.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o possível efeito neuroprotetor dos ligantes de PrP^C, STI1 e peptídeo γ 1 de laminina (γ 1), contra a toxicidade mediada por A β O, e a participação de PrP^C neste processo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Examinar o efeito do tratamento de A β O nos níveis da proteína sináptica sinaptofisina, em culturas primárias de neurônios hipocampais, a fim de identificar uma medida fidedigna da atividade de A β O em culturas celulares.

Verificar o efeito da administração de STI1 recombinante em culturas primárias de neurônios hipocampais tratadas com A β O e a participação de PrP^C nesse processo.

Verificar o possível efeito neuroprotetor da STI1 secretada por astrócitos em culturas primárias de neurônios hipocampais tipo-selvagem ou deficientes para PrP^C.

Analisar em culturas primárias de neurônios hipocampais tratadas com A β O se os efeitos de STI1 via PrP^C dependem da participação de α 7nAChR.

Verificar o possível efeito neuroprotetor do peptídeo $\gamma 1$ sobre os efeitos tóxicos de $A\beta O$ e a participação de PrP^C nesse processo.

Analisar se os efeitos de $\gamma 1$ via PrP^C dependem da participação de $mGluR5$.

Verificar a influência de $STI1$ e $\gamma 1$ sobre o déficit de memória em modelos animais para a doença de Alzheimer

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE ANIMAL

Para as culturas primárias e preparação dos sinaptossomos foram utilizados camundongos C57Bl/6/129Ola tipo-selvagem (Prnp^{+/+}) e C57Bl/6/129Ola deficiente para o gene de PrP^C da linhagem Zurich I (Prnp^{0/0}) (BUELER et al. 1992), gentilmente cedidos por Charles Weissmann. Para isolamento de VEs, também foi utilizado o animal que superexpressa a proteína STI1, denominado TgA. Este é um animal transgênico que apresenta 10 alelos extras de STI1 que levam a um aumento de 4 vezes nos níveis da proteína. Esse modelo foi gerado usando técnicas de recombinação homóloga utilizando células C57BL/6J ES (BERALDO et al. 2013).

Os camundongos APP/PS1 (APP^{swe}, PSEN1^{dE9})85Dbo/J foram gerados pela inserção dos genes de APP humano, contendo as mutações K595N/M596L, e de presenilina-1, contendo uma deleção no éxon 9, associados à DA familiar. A colônia é mantida em hemizigose através de cruzamentos com camundongos tipo-selvagem da linhagem C57BL/6J.

Todos os animais são mantidos em biotério SPF (livre de patógenos específicos). Os camundongos são genotipados para a identificação do genótipo desejado para a experimentação e para a manutenção da colônia. A genotipagem é realizada através da técnica de PCR utilizando DNA

extraído da cauda do camundongo. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do A.C. Camargo Cancer Center (CEUA – 046/10 e 060/13) (Anexo 1).

3.2 CULTURAS PRIMÁRIAS DE NEURÔNIOS HIPOCAMPAIS E ASTRÓCITOS

As culturas primárias de neurônios e astrócitos foram obtidas como previamente descrito por (LOPES et al. 2005) e (LIMA et al. 2007), a partir de hipocampo e córtex, respectivamente, de embriões de 17 dias de vida intrauterina (E17). Para cada cultura uma fêmea grávida de 17 dias pós-coito foi eutanasiada por asfixia por CO₂. A assepsia do animal foi realizada com etanol 70% e, com o auxílio de pinça de ponta grossa e tesoura pequena estéreis, uma incisão foi realizada no ventre do animal. A tuba uterina foi removida, também com a utilização de pinça de ponta grossa e tesoura pequena, e colocada sobre placa de petri estéril. A placa de petri foi colocada sobre uma camada de gelo picado por 15min. Com o auxílio de pinça e tesoura, todos os embriões foram removidos da tuba uterina (em geral, de 6 a 8 embriões) e mantidos na mesma placa de petri sobre a camada de gelo por 30min para eutanásia. Todos os embriões de cada fêmea foram utilizados para a cultura, e cada cultura proveniente de todos os embriões é considerada n=1.

Brevemente, para cultura neuronal os hipocampos foram dissecados em “Hank’s Balanced Salt Solution” (HBSS) e tratados com tripsina (0.02%)

em HBSS por 20min a 37°C, sob agitação. Após centrifugação por 3min, a 2000 rpm, a protease foi inativada com 10% de soro fetal bovino (SFB) em meio Neurobasal por 5min. Depois de três lavagens com HBSS, as células foram mecanicamente dissociadas em meio Neurobasal contendo suplemento B-27, glutamina (2mM), penicilina/estreptomicina (100µg/mL). Células foram plaqueadas em placas de 35mM cobertas com poli-L-lisina (5 µg/ml). Os neurônios primários foram mantidos em incubadora a 5% CO₂ por 18 dias para a realização dos experimentos. Esse tempo de cultura foi importante para que todos os receptores e neurotransmissores fossem expressos e produzidos pelas células para mimetizar as condições *in vivo* para ação dos AβO.

Para as culturas de astrócitos primários os hemisférios cerebrais dos embriões foram dissociados em HBSS e tratados com tripsina (0.02%) em HBSS por 20min a 37°C, sob agitação. Após centrifugação por 3min, a 2000 rpm, a protease foi inativada com 10% de SFB em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com glicose (33mM), glutamina (2mM), penicilina/estreptomicina (100ug/mL) e bicarbonato de sódio (3mM). As células foram plaqueadas em placas de cultura de 100mm cobertas com poli-L-lisina (5 µg/ml) e cresceram em DMEM enriquecido com 10% SFB. O meio foi trocado a cada 2 dias. O número de astrócitos pode ser aumentado, quando necessário, através da tripsinização das células e passagem para um número maior de placas. No entanto, os astrócitos primários não se multiplicam indefinidamente, e após 1 mês em cultura já se tornam não responsivos a alguns fatores de crescimento. Nesse ponto, torna-se

necessária a realização de uma nova cultura. As culturas de astrócitos são mantidas para obtenção de meio condicionado de onde são isoladas as VEs por ultracentrifugação de 2h, como descrito por HAJJ et al. (2013), e apresentado em mais detalhes adiante.

3.3 SEPARAÇÃO DE FRAÇÕES DE MEIO CONDICIONADO, SOBRENADANTE E VESÍCULAS EXTRACELULARES DE ASTRÓCITOS

Para o isolamento das frações de meio condicionado, sobrenadante e VEs, foram utilizadas culturas de astrócitos primários, crescidos em placa de cultura de 100mm, com confluência de 80-90%, que foram lavadas três vezes com Tampão Fosfato Salina (PBS) 1X e mantidas por 48h em meio DMEM sem soro. Após, o meio condicionado foi coletado e submetido a centrifugações sequenciais para eliminar “debris” celulares (300xg por 10min, 2000xg por 10min, 10000xg por 30min). O sobrenadante da última centrifugação foi coletado e uma parte foi separada para posterior tratamento dos neurônios, e outra parte igual foi utilizada para isolamento das VEs. O isolamento das VEs foi realizado através de ultracentrifugação do meio condicionado a 100.000xg por 2h, em um rotor SW40Ti (Beckman-Coulter). O sobrenadante foi recolhido para posterior tratamento dos neurônios, e o precipitado de VEs foi lavado com PBS e ultracentrifugado novamente pelo mesmo período.

Para os tratamentos com meio condicionado e sobrenadante, esses foram concentrados 50 vezes (5mL para 100uL) através do sistema Amicon® (Millipore) utilizando uma membrana com corte de 10 kDa, e 80uL foram utilizados para tratar os neurônios e 20uL para *Western Blot*. Para os tratamentos com VEs, o pellet obtido da ultracentrifugação foi ressuspensão em 100uL de PBS 1X, de forma que 80uL foram utilizados para o tratamento dos neurônios e 20uL para *Western blot*.

Para caracterização das VEs quanto ao número e ao tamanho, foi utilizado o aparelho NanoSight LM10 (NanoSight Ltd., Amesbury, Reino Unido).

3.4 PREPARAÇÃO DOS OLIGÔMEROS DE A β

Em resumo, o protocolo de preparação dos A β O consiste em inicialmente solubilizar o A β (American Peptide) em ácido tri-fluoro acético (TFA) seguido por solubilização por 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP). Essa solução é evaporada formando-se um filme do peptídeo A β , conservado a -80°C. Para a preparação dos oligômeros essa película foi solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO) 2% em PBS e incubada por 24h a 4°C. Após a incubação, a solução foi centrifugada a 14000xg por 10min a 4°C. O sobrenadante resultante consiste na forma oligomérica do peptídeo A β . A composição dos A β O utilizados nos experimentos é rotineiramente realizada por meio de eletroforese em gel de gradiente, seguida por *Western*

blot e coloração com nitrato de prata, utilizando PageSilver™ Silver Staining Kit (Fermentas Life Sciences).

3.5 TRATAMENTOS CELULARES COM STI1, STI1_{DEL}, E COM O PEPTÍDEO STI1₂₃₀₋₂₄₅

Os tratamentos com STI1 recombinante de camundongo e o STI1 mutante com deleção no sítio de ligação a PrP^C 230–245 (STI1del), purificados como descrito por Zanata e colaboradores (2002), e os peptídeos STI1₂₃₀₋₂₄₅ (ELGNDAYKKKDFDKAL) e peptídeo irrelevante STI1₆₁₋₇₆ (pepIRR) (GCKTVDLKPDWGKGYGYS), sintetizados pela Neosystem (Strasbourg, France), foram realizados após 18 dias de cultura primária dos neurônios hipocâmpais.

Os tratamentos com o peptídeo γ 1 (RNIAEIKDI), sintetizado pela GenScript Corp. (Piscataway, NJ, USA), e com o peptídeo γ 1 “scrambled” (γ 1 SCR) (IRADIEIKID) sintetizado pela Neosystem (Strasbourg, France), foram realizados nas preparações de sinaptossomos hipocâmpais funcionais.

3.6 IMUNOCITOQUÍMICA

Para avaliar o potencial sinaptotóxico dos oligômeros de A β , a presença do marcador sináptico Syp foi avaliada através de imunofluorescência. Os neurônios previamente tratados foram fixados em

solução de paraformaldeído 4% e permeabilizados com solução de Triton 0,2% em PBS durante 5min e então bloqueadas com solução de albumina de soro bovino (BSA) 5% em PBS1X por 1h. As lamínulas foram incubadas com anti-Syp (Santa Cruz, cat.#SC17750, 1:1000), overnight, e em seguida lavadas 3 vezes com PBS para a posterior incubação com o anticorpo secundário acoplado a fluoróforo Alexa Fluor 488 (1:1000) por um período de 1h.

Para avaliar a marcação do ácido liso-bis-fosfatídico (LBPA) em astrócitos WT e TgA, as células foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% e permeabilizados com solução de Triton 0,5% em PBS durante 5min e então bloqueadas com BSA 5% em PBS1X por 1h. As lamínulas foram incubadas com anti-LBPA (Echelon Biosciences Inc, 1:250), overnight, e em seguida lavadas 3 vezes com PBS para a posterior incubação com o anticorpo secundário acoplado a fluoróforo Alexa Fluor 488 (1:1000), acrescido de TO-PRO-3 (1:500) por um período de 1h.

3.7 QUANTIFICAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA

A quantificação da imunofluorescência consiste nas seguintes etapas:

- Captura de 20 fotomicrografias de cada lamínula em microscópio com epifluorescência (Nikon Eclipse TE2000-U) utilizando o software NIS-Elements F;
- Para cada experimento houve pelo menos duas lamínulas controles, cuja reação de imunofluorescência foi realizada na ausência do

anticorpo primário. As fotos adquiridas das lamínulas controle serviram de base para o estabelecimento da fluorescência basal que foi excluída da quantificação.

- A fluorescência basal foi excluída de cada uma das imagens adquiridas e o número de pixels nos quais a fluorescência foi maior do que o basal foi quantificado. A média dos valores obtidos em pelo menos duas lamínulas para cada tratamento foi utilizada. Essa quantificação foi feita com auxílio software gratuito ImageJ, disponível em <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>

3.8 PURIFICAÇÃO DE SINAPTOSSOMOS DE NEURÔNIOS HIPOCAMPAIS

Os sinaptossomos foram purificados a partir do hipocampo de fêmeas adultas eutanasiadas com CO₂ (mesmas fêmeas grávidas utilizadas para gerarmos os embriões para realização das culturas de neurônios e astrócitos), segundo protocolo descrito por (AGOSTINI et al. 2013).

Brevemente, os hipocampos dos animais foram dissecados em gelo, lavados duas vezes em PBS1X gelado, e então homogeneizados em 5mM ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanossulfônico (HEPES), pH 7.4, 320mM de sacarose, 1mM ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) usando um homogeneizador manual. O homogenato foi centrifugado a 3000xg por 10min a 4°C e o sobrenadante recuperado e centrifugado novamente a 14000xg por 12min a 4°C. O pellet resultante foi cuidadosamente

ressuspendido em tampão Krebs-Ringer (10mM HEPES, pH7.4, 140mM cloreto de sódio (NaCl), 5mM cloreto de potássio (KCl), 5mM glicose, 1mM EDTA), seguido da adição de Percoll (concentração final 45% v/v), misturando gentilmente o tubo por inversão. Após centrifugação a 13000xg por 2min a 4°C, a fração sinaptossomal foi recuperada da superfície de flotação do gradiente, e cuidadosamente ressuspendida em tampão Krebs-Ringer. Após centrifugação a 13000xg por 30s a 4°C o pellet resultante representa a preparação de sinaptossomos funcionais, que foi ressuspendida em um volume apropriado de tampão Krebs-Ringer. A pureza da preparação foi confirmada pelo enriquecimento de marcadores sinápticos nessa fração. Para os tratamentos, foram utilizados 2 μ g de sinaptossomos por condição. Os tratamentos com γ 1 e A β O foram feitos a 37°C, após centrifugamos os sinaptossomos, o sobrenadante foi removido e o *pellet* ressuspenso em tampão de amostra para posterior análise por *Western blot*.

3.9 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Os extratos proteicos foram preparados utilizando tampão ripa (50mM trisaminometano (Tris), 150mM NaCl, 1% NP40, 0,5% Deoxicolato de sódio, 1mM EDTA), e congelados por 10min. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm a 4°C por 15min. A quantidade de proteína foi dosada pelo método de Bradford, usando como curva padrão BSA 1mg/ml. De dois a quinze microgramas de amostra foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e

transferidas para membrana de nitrocelulose. O bloqueio foi feito com leite 5% por 1h, temperatura ambiente, sob agitação. Os ensaios de *Western blot* foram realizados usando os anticorpos anti-Syp (D-4) mAb (Santa Cruz, cat.#SC17750, 1:1000), anti-Phospho-eIF2 α (Ser51) mAb (Cell signaling, cat.#9721, 1:500), anti-eIF2 α mAb (Biosource, cat.#AHO0802, 1:1000), anti-STI1 (Bethyl, 1:20000), anti p44/42 MAPK (Erk1/2) (Cell Signaling, cat.#9102, 1:1000), anti- α -Tubulina mAb (Sigma-Aldrich, cat.#T9026, 1:20000), anti-Alix mAb (Cell signaling, cat.#2171S, 1:1000), anti-TSG101 mAb (Abcam, cat.#ab83, 1:500), anti-VPS36 pAb (Abcam, cat.#ab76331, 1:1000), anti-Rab5 pAb (Abcam, cat.#ab18211, 1:1000), anti-Rab7 mAb (Cell signaling, cat.#9367S, 1:1000), anti-Rab27b pAb (Sigma Aldrich, cat.#HPA019849, 1:1000), anti-Beclin-1 (Cell signaling, cat.#3738S, 1:500), anti-LC3A/B (Cell signaling, cat.#12741, 1:1000), incubados overnight a 4°C, sob agitação. As membranas foram lavadas 3 vezes com Tampão Fosfato Salina contendo 0,05% de Tween 20 (TBS-T) e o anticorpo secundário anti-IgG rabbit-HRP (Amersham, cat.#NA9340, 1:3000) ou anti-IgG mouse-HRP (Amersham, cat.#NA9310, 1:3000) foi adicionado. O tempo de incubação foi de 1h a temperatura ambiente, sob agitação. Logo em seguida a membrana foi lavada 3 vezes com TBS-T e revelada com Kit de detecção de peroxidase ECL (Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Kit). A visualização e a densitometria das bandas foram feitas através do aparelho Uvitec Cambridge.

3.10 AVALIAÇÃO NEUROPATOLÓGICA E COMPORTAMENTAL DOS ANIMAIS TRANSGÊNICOS APP/PS1

Foram utilizados camundongos adultos machos APP/PS1 (APP^{swe}, PSEN1^{dE9})85Dbo/J com idade de 6 a 14 meses. Para avaliação neuropatológica, através da presença do peptídeo β -amiloide e de neurônios degenerados, foram realizados os testes de ELISA (A β 42 Human ELISA Kit – Invitrogen), imunohistoquímica, e coloração com Fluoro-Jade (Fluoro-Jade[®]B.- Millipore). Para isso, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, e então os cérebros removidos. Para o teste de ELISA foi feito homogenato cerebral e demais reações de acordo com protocolo do fabricante. Para imunohistoquímica e coloração com Fluoro-Jade os cérebros foram fixados em paraformaldeído 4%, overnight, e emblocados em parafina para posterior corte de secções de 3-5 μ M, em micrótomo. Para imunohistoquímica os cortes foram desparafinizados, hidratados e feita a recuperação antigênica em tampão Tris-EDTA pH9.0 em banho-maria. Os cortes foram incubados com anti-Peptídeo β Amiloide (Invitrogen, cat.#A8326, 1:50) e revelado utilizando o kit LSAB[™]+, Universal – Dako. Já a coloração com Fluoro-Jade foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante (Fluoro-Jade[®]B.- Millipore). Os cortes foram observados em microscópio epifluorescente (Nikon Eclipse TE2000-U) utilizando o software NIS-Elements F.

Para verificar as possíveis alterações comportamentais os animais foram treinados na tarefa de Reconhecimento de Objetos (RO), teste de

esquiva inibitória do tipo *step-down*, e comportamento de nidificação. O teste de Reconhecimento de Objetos (RO) foi realizado de acordo com o protocolo descrito por (MYSKIW et al. 2008), onde os animais são habituados em campo aberto na ausência de objetos e outros estímulos durante 20min, por 4 dias. Os objetos a serem reconhecidos são feitos de plástico e fixados no chão da arena com fita adesiva. No dia do treino os animais foram colocados no campo aberto, na presença de dois objetos idênticos (Objeto 1), e exploraram-nos por 5min. O teste de memória de curta duração (Teste STM) foi realizado 2h após a sessão de treino, onde um dos objetos 1 foi trocado por um novo objeto (Objeto 2) e o camundongo testado novamente por 5min. Já o teste de memória de longa duração (Teste LTM) foi realizado após 24h do treino, com um objeto 1 e um novo objeto (Objeto 3), por 5min. A posição dos objetos (familiar ou novo) foi modificada aleatoriamente para cada animal e a arena limpa entre cada animal testado. A exploração dos objetos é definida como o fato de cheirar ou tocar os objetos com o nariz e as patas anteriores. O tempo gasto explorando cada objeto foi registrado e expresso como o percentual do tempo total de exploração em segundos.

As memórias de curto e de longo prazo também foram avaliadas através do modelo de esquiva inibitória do tipo *step-down*. O teste foi realizado em uma caixa de metal e acrílico medindo 50 x 25 x 25 cm. O aparelho possui uma plataforma metálica elevada, além de um piso com uma grade metálica com 1mm de diâmetro, com espaçamento de 1 cm entre elas, eletrificada por um gerador. O animal foi então colocado sobre a plataforma e sua latência para descer sobre a grade (com as quatro patas)

foi cronometrada. Na sessão de treino, imediatamente após o animal descer sobre a grade, ele foi estimulado com um leve choque nas patas (0.4 mA) durante 2 segundos. Após, o animal foi então removido da câmara e devolvido à sua gaiola. Cada animal foi testado 120min e 24h após o treino para avaliação das memórias de curta e longa duração, respectivamente, realizando-se para isto o mesmo procedimento, mas omitindo-se o choque. Em casos específicos em que o animal não desceu da plataforma, durante as sessões de teste, um tempo máximo de 180 segundos foi aguardado para que o animal fosse retirado da caixa. Neste teste o aprendizado consiste em o animal não descer da plataforma, ou fazê-lo após um período de tempo maior do que aquele observado na sessão de treino (ROESLER et al. 1999).

Outro teste utilizado para avaliação comportamental dos animais transgênicos APP/PS1 foi o de atividade de nidificação. Para a realização do teste os animais foram mantidos em gaiolas individuais, cobertas com serragem. No primeiro dia do teste, duas horas antes do início da fase escura do ciclo de iluminação, 8 pedaços de papel toalha (5×5 cm) foram introduzidos em cada gaiola para permitir a nidificação. A presença e qualidade dos ninhos foram avaliadas após 16h (WESSON e WILSON 2011).

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis contínuas foram expressas como médias \pm EP (erro padrão) e comparadas entre os grupos usando Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste post hoc de Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 5. A significância estatística foi definida como um valor de $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 MECANISMOS ASSOCIADOS À REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE SINAPTOFISINA POR A β O

A fim de verificar o efeito dos A β O sobre a expressão da proteína Syp, tratamos neurônios hipocampais envelhecidos (18 dias de cultura) com A β O, e avaliamos por *Western blot* os níveis dessa proteína sináptica. Foram utilizados neurônios envelhecidos para que todos os receptores e neurotransmissores fossem expressos e produzidos pela cultura. Observamos que o tratamento com A β O em poucos minutos é capaz de diminuir os níveis da proteína Syp de uma maneira dependente de PrP^C (Figura 1A e B). Dessa forma, foi possível utilizar a expressão da proteína Syp como uma medida da atividade de A β O em culturas celulares.

Em seguida analisamos se esse mesmo tratamento poderia causar alguma alteração nas vias de controle traducional, e se essa disfunção poderia ser causada pela interação de A β O com PrP^C. Para isso tratamos os neurônios primários com A β O, e avaliamos por *Western blot* a fosforilação do fator de tradução eIF2 α . Os nossos resultados demonstram que não há alteração significativa nos níveis de fosforilação do fator de tradução eIF2 α tanto em neurônios tipo-selvagem, quanto em neurônios *knockout* para PrP^C após seu tratamento com A β O, nas condições realizadas (Figura 1C e D).

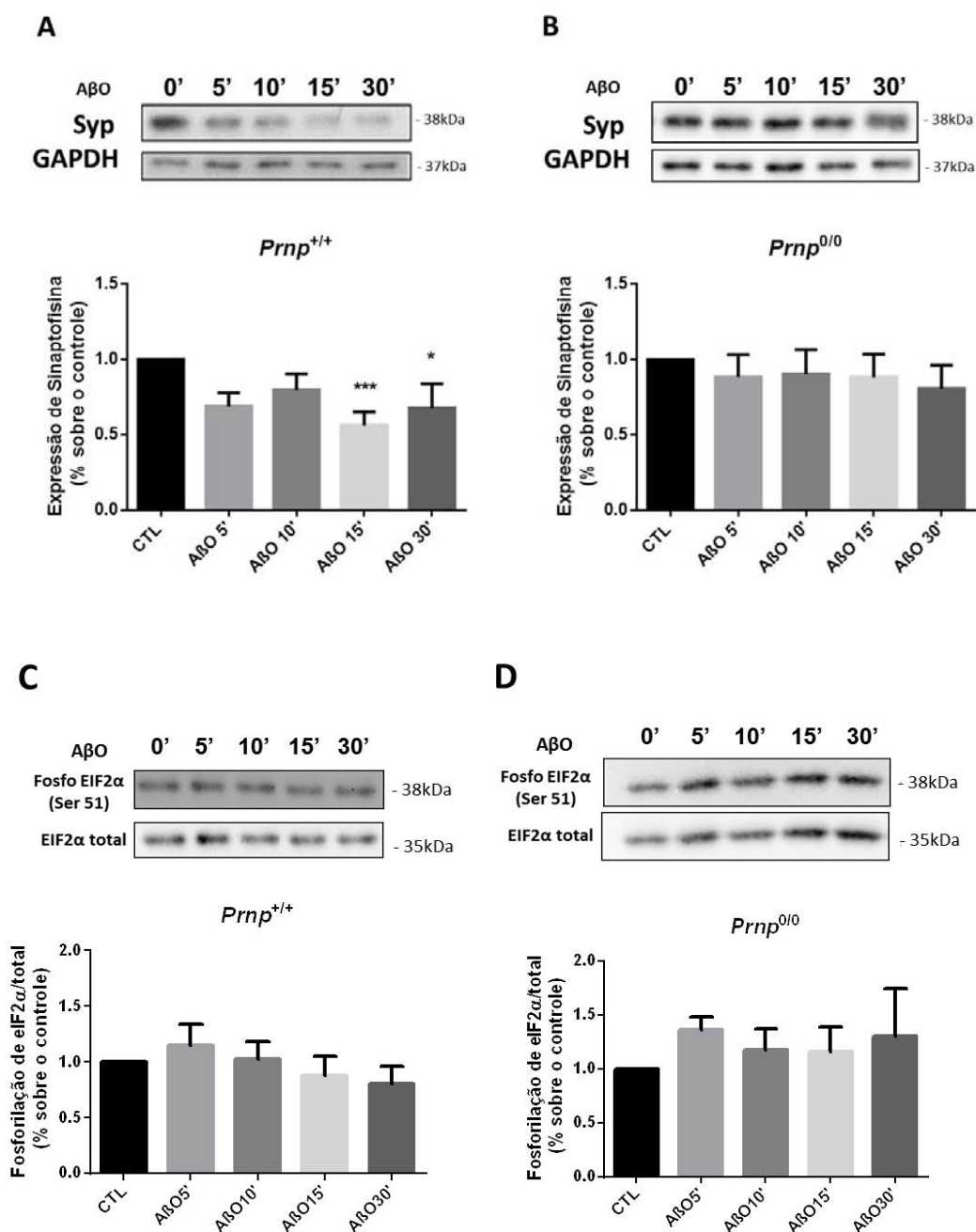


Figura 1 - Oligômeros A β diminuem os níveis de Syp mas não alteram os níveis de fosforilação de eIF2 α . Neurônios tipo-selvagem e *knockout* para PrP^C (18 dias *in vitro*) foram tratados com oligômeros A β , lisados, e os extratos celulares submetidos à SDS-PAGE seguido por imunoblotting usando anticorpos anti-Syp, anti-GAPDH, anti-fosfo eIF2 α (Ser51) e anti-eIF2 α total. As bandas foram quantificadas por densitometria, e os gráficos representam a relação entre Syp e GAPDH (A e B), eIF2 α fosforilada e a total (C e D). Os neurônios foram tratados com oligômeros A β (500nM, 5, 10, 15 ou 30min). Barras representam média \pm EP (barra de erros). (* p <0,05, *** p <0,001, ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey). $n=4$

Em seguida fomos avaliar se a diminuição da Syp, após tratamento com A β O está relacionada ao seu processo de degradação. Assim, analisamos a expressão de Syp após o tratamento dos neurônios com A β O e com MG132, um inibidor de proteassomo. Nossos resultados demonstram que com apenas 15min de tratamento com A β O pode ser observada a diminuição significativa nos níveis de Syp em relação ao controle. Porém, quando os neurônios são tratados com o MG132 seguido pelo tratamento com A β O por 15min os níveis de Syp permanecem comparáveis aos controles (Figura 2).

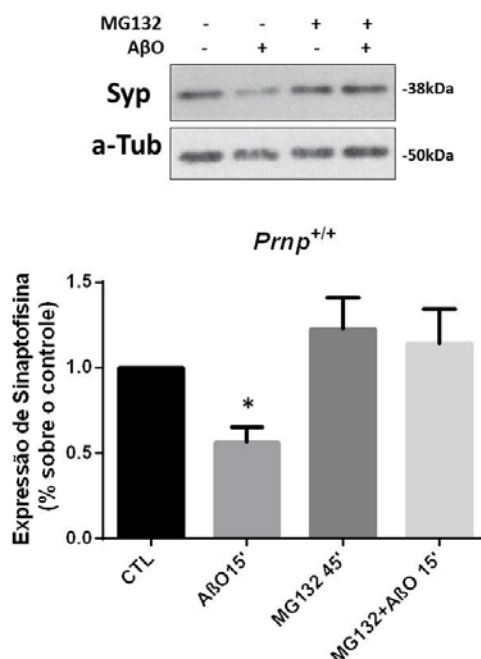


Figura 2 - Efeito dos oligômeros A β sobre a degradação de proteínas. Neurônios tipo-selvagem (18 dias *in vitro*) foram tratados com oligômeros A β , ou com o inibidor de proteassomo MG132, lisados, e os extratos celulares submetidos à SDS-PAGE seguido por imunoblotting usando anticorpos anti-Syp e anti- α -tubulina. As bandas foram quantificadas por densitometria, e os gráficos representam a relação entre a Syp e a α -tubulina. Os neurônios foram tratados com oligômeros A β (500nM, 5, 10, 15 ou 30min), MG132 (10 μ m por 45min) ou pré-tratados com MG132 (10 μ m por 30min) seguido pelo tratamento com A β (500nM, por 15min). Barras representam média \pm EP (barra de erros). (* p <0.05, ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey). $n=4$

Para verificarmos se além do papel da degradação haveria alguma alteração na síntese de Syp após tratamento com A β O, culturas primárias de neurônios hipocâmpais envelhecidos foram tratadas com o inibidor de síntese proteica cicloheximida (Chx). Os resultados obtidos indicam que este tratamento não altera as concentrações de Syp nos neurônios. Porém, o tratamento prévio com Chx é capaz de bloquear a diminuição de Syp ocasionado pelo tratamento com A β O (Figura 3).

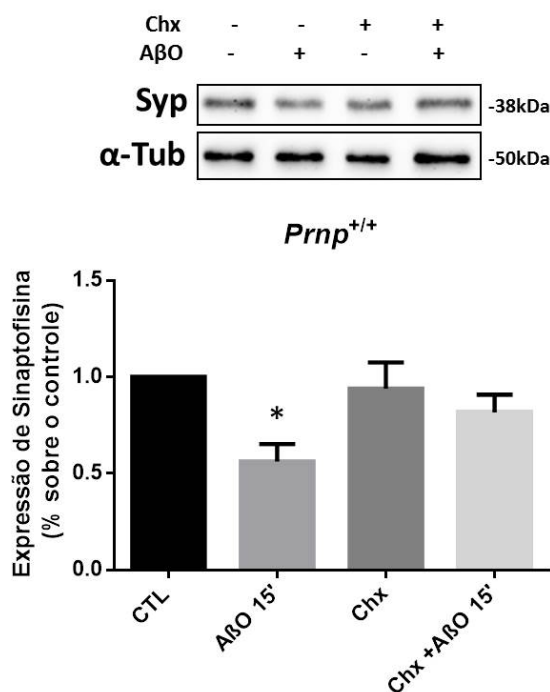


Figura 3 - Efeito dos oligômeros A β sobre a síntese de proteínas. Neurônios tipo-selvagem (18 dias *in vitro*) foram tratados com oligômeros A β , ou com o inibidor de síntese proteica cicloheximida (Chx), lisados, e os extratos celulares submetidos à SDS-PAGE seguido por imunoblotting usando anticorpos anti-Syp e anti- α -tubulina. As bandas foram quantificadas por densitometria, e os gráficos representam a relação entre a Syp e a α -tubulina. Os neurônios foram tratados com oligômeros A β (500nM, 5, 10, 15 ou 30min), Chx (0,1 μ g/ μ L por 30min) ou pré-tratados com Chx (0,1 μ g/ μ L por 15min) seguido pelo tratamento com A β (500nM, por 15min). Barras representam média \pm EP (barra de erros). (* p <0.05, ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey). $n=4$

4.2 ANÁLISE DO EFEITO NEUROPROTETOR DE STI1 EM CULTURAS PRIMÁRIAS DE NEURÔNIOS HIPOCAMPAIS TRATADAS COM A β

Para avaliar se STI1 poderia interferir com a ligação de PrP^C e os A β O, revertendo os efeitos neurotóxicos observados na DA, inicialmente as culturas neuronais envelhecidas (18 dias de cultura *in vitro*) foram tratadas com STI1 e analisado o seu efeito sobre a expressão da proteína Syp. Foi verificado que a proteína STI1 aumenta cerca de 2,5 vezes a expressão de Syp em relação ao controle (Figura 4). Da mesma forma, um aumento de aproximadamente 3 vezes também foi observado quando o tratamento foi realizado com o peptídeo de STI1₂₃₀₋₂₄₅, que possui apenas o domínio de ligação a PrP^C (Figura 4). Porém, quando os neurônios foram tratados com STI1 com deleção no sítio de ligação a PrP^C (STI1del), ou com o peptídeo irrelevante (PepIRR), os níveis de expressão de sinaptofisina foram semelhantes ao controle (Figura 4). Nossos resultados demonstram mais uma importante função de STI1, na regulação da expressão de Syp, sendo esse efeito também dependente da interação com PrP^C, já que quando os tratamentos foram realizados em neurônios de animais *knockout* para PrP^C nem o tratamento com STI1, nem o tratamento com os demais peptídeos, foram capazes de alterar os níveis de Syp nas células (Figura 4).

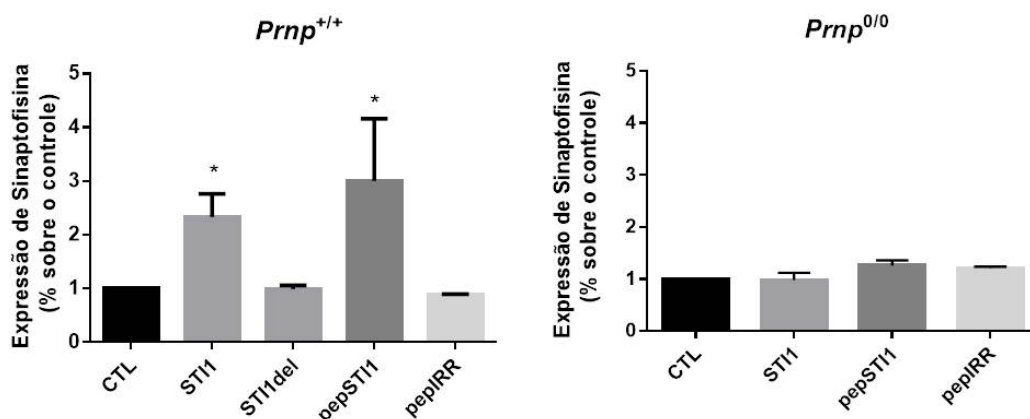


Figura 4 - Efeito do ligante de PrP^C STI1 sobre a expressão de Syp. Neurônios de animais tipo-selvagem (*Prnp*^{+/+}) e *knockout* para PrP^C (*Prnp*^{0/0}) (18 dias *in vitro*) foram tratados com o ligante de PrP^C STI1, fixados e imunomarcados contra Syp. Foi realizada a análise quantitativa da imunofluorescência de Syp nos neuritos (excluindo o corpo celular). Os neurônios foram tratados com STI1 (100nM), STI1del (100nM), peptídeo de STI1₂₃₀₋₂₄₅ (PepSTI1, 5uM) ou peptídeo irrelevante (PepIRR, 5uM), por 30min. Barras representam media ± EP (barra de erros). (**p*<0.05, ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey). *n*=3

Em seguida, as culturas neuronais envelhecidas (18 dias de cultura *in vitro*) foram tratadas com A β O, ou STI1, ou ainda pré-tratadas com STI1 e então expostas aos A β O.

Nossos resultados demonstram que culturas tipo-selvagem tratadas com A β O por 1h apresentam uma diminuição da fluorescência de Syp quando comparadas com culturas controle. De maneira muito interessante, o pré-tratamento dessas culturas com STI1, seguido pelo tratamento com A β O mantém ou parece aumentar os níveis de Syp quando comparada com culturas controle (Figura 5), demonstrando assim o efeito neuroprotetor do tratamento com STI1 contra o efeito tóxico promovido pelos A β O. Nossos dados apontam ainda (Figura 5) que em culturas de neurônios *knockout* para

PrP^C, parece não ocorrer mudança dos níveis de Syp quando as células são tratadas com A β O (Figura 5).

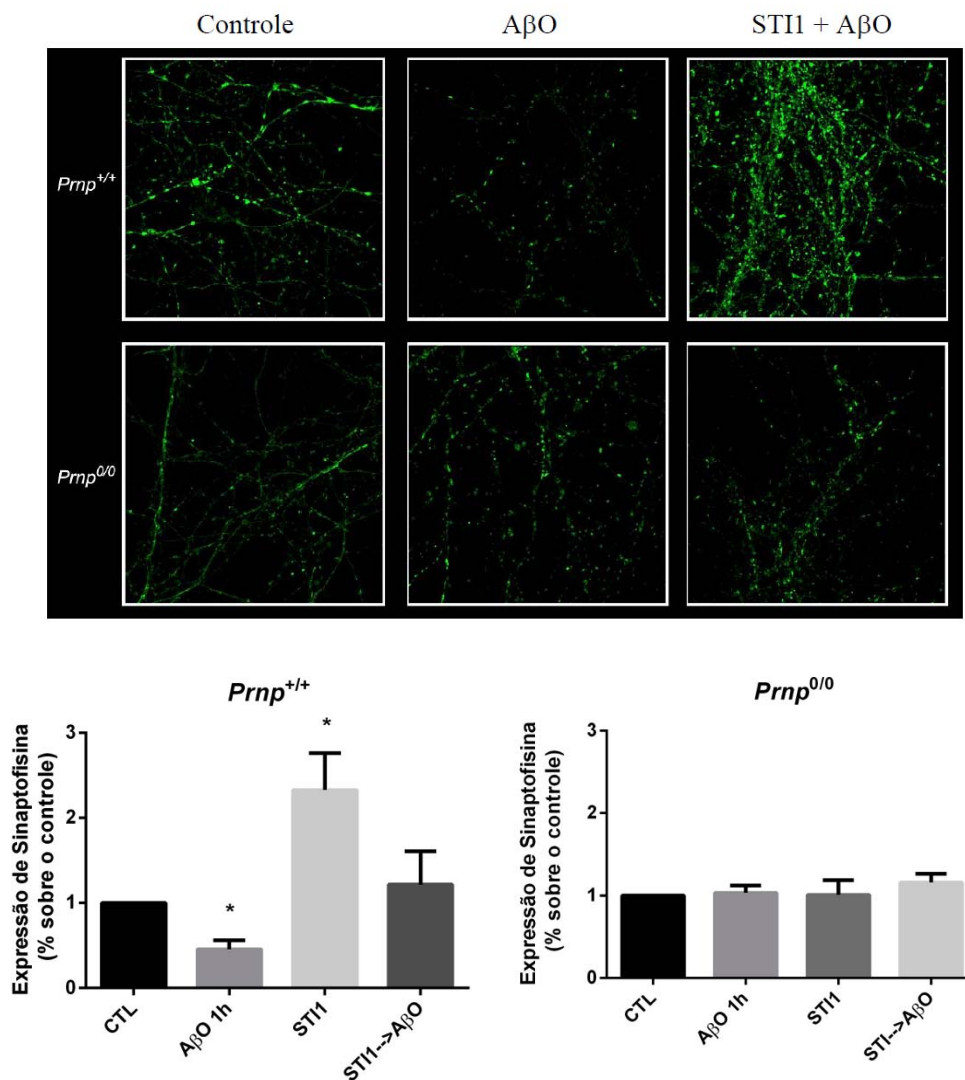


Figura 5 - STI1 aumenta os níveis de Syp e protege contra os efeitos neurotóxicos causados pelos A β O. Imagens representativas de neurônios tipo-selvagem (*Prnp*^{+/+}) e *knockout* para PrP^C (*Prnp*^{0/0}) imunomarcados contra Syp. Neurônios controle (1^a coluna). Neurônios tratados com A β O (500nM, 1h) (2^a coluna). Neurônios tratados com STI1 (100nM, 30min) (3^a coluna). Neurônios pré-tratados por 30min com STI1 e então expostos aos A β O (4^a coluna). Os gráficos representam a análise quantitativa da imunofluorescência para Syp nos neuritos (excluindo o corpo celular) *Prnp*^{+/+} e *Prnp*^{0/0}. Barras representam media \pm EP (barra de erros). (*p<0.05, ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey). n=4

Em seguida, a fim de verificar se o tratamento com STI1 concomitante ou após o tratamento com A β O apresentava o mesmo efeito que o tratamento prévio com STI1, realizamos diversas combinações de tratamentos. Os resultados apresentados na figura 6 mostram que o tratamento concomitante dos neurônios com STI1 e A β O, ou o pré-tratamento com A β O seguido pelo tratamento com STI1 não surtem o mesmo efeito na expressão de Syp como quando o pré-tratamento é realizado com STI1 e seguido pelo tratamento com A β O (Figura 6).

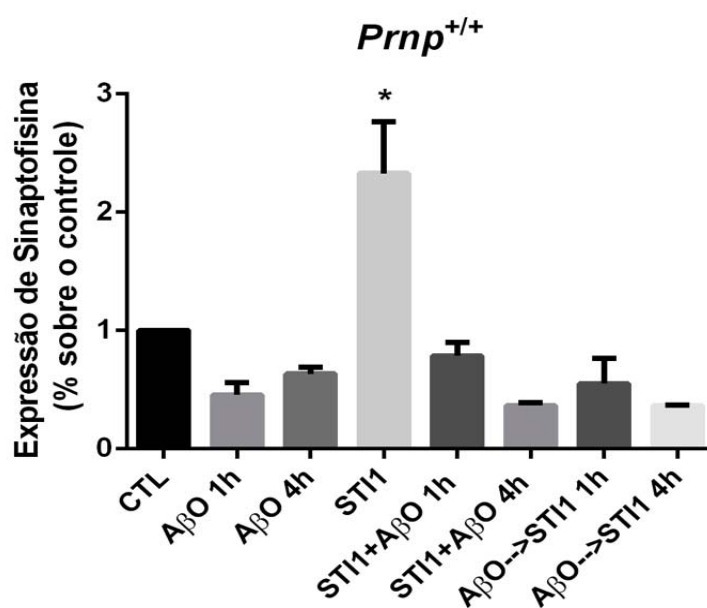


Figura 6 - STI1 não produz efeito na expressão de Syp quando adicionado junto ou depois dos oligômeros A β . Neurônios tipo-selvagem (18 dias *in vitro*) foram tratados com STI1 e A β O, fixados e imunomarcados contra Syp. Foi realizada a análise quantitativa da imunofluorescência para Syp nos neuritos (excluindo o corpo celular). Os neurônios foram tratados com A β O (500nM, 1 ou 4 h), STI1 (100nM, 30min), A β O concomitantemente com STI1 (STI1+A β O, 1 ou 4 h) ou pré-tratados por 30min com os A β O seguido pela adição de STI1 (A β O→STI1, 1 ou 4 h). Barras representam médias \pm EP (barra de erros). (* p <0.05, ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey). n=3

4.3 PAPEL DA INTERAÇÃO DE $\alpha 7$ nAChR SOBRE OS EFEITOS CAUSADOS POR STI1 NA EXPRESSÃO DE SYP

A fim de analisar se os efeitos de STI1 na expressão de Syp em neurônios hipocâmpais se dão devido à interação com $\alpha 7$ nAChR, as culturas de neurônios envelhecidos foram tratadas com o inibidor α -bungarotoxina. Os resultados apresentados na figura 7 demonstram que a inibição de $\alpha 7$ nAChR (bungarotoxina) bloqueia o efeito de STI1 sobre o aumento da expressão de Syp, diminuindo os níveis dessa proteína aos níveis da condição controle.

Também avaliamos se o efeito dessa interação era importante para o efeito neuroprotetor de STI1 em culturas primárias de neurônios hipocâmpais tratadas com A β O, com base nos níveis de Syp. Porém, os resultados obtidos mostram que a inibição prévia de $\alpha 7$ nAChR não bloqueia o efeito protetor de STI1 em neurônios tratados com A β O (Figura 7).

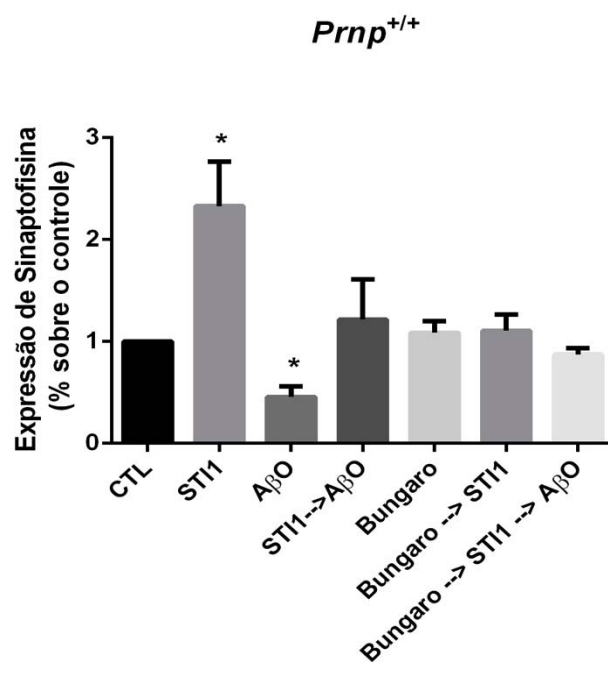


Figura 7 - Efeitos do ST11 sobre a expressão de Syp são dependentes de $\alpha 7$ AchR. Neurônios tipo-selvagem (18 dias *in vitro*) foram tratados com ST11 e Bungarotoxina, fixados e imunomarcados contra Syp. Foi realizada a análise quantitativa da imunofluorescência de Syp nos neuritos (excluindo os corpos celulares). Neurônios foram tratados com ST11 (100nM, 30min), A β O (500nM, 1h), ou bungarotoxina (1nM, 30min). Barras representam a média \pm EP (barra de erros). (* $p < 0.05$, ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey). n=3

4.4 PAPEL DE FATORES SECRETADOS POR ASTRÓCITOS NOS NÍVEIS DE SYP DE CULTURAS PRIMÁRIAS NEURONAIIS

A fim de verificar se a ST11 secretada por astrócitos possui o mesmo efeito de elevação da expressão de Syp que a ST11 recombinante, isolamos VEs através de ultracentrifugação de meio condicionado de astrócitos primários, para posterior tratamento dos neurônios envelhecidos. Para isso, o primeiro passo foi a caracterização das VEs quanto ao tamanho, concentração (Figura 8A) e presença de ST11 (Figura 8B).

Nossos resultados mostram que, a partir da metodologia utilizada, foi possível purificar VEs de até 300nm, sendo a maior parte composta por VEs de 50-150nm (Figura 8A). A presença da proteína STI1 nestas vesículas também foi analisada, de forma que esta foi encontrada em grandes quantidades no meio condicionado total e no sobrenadante (fração solúvel), e em menor quantidade nas VEs purificadas (Figura 8B).

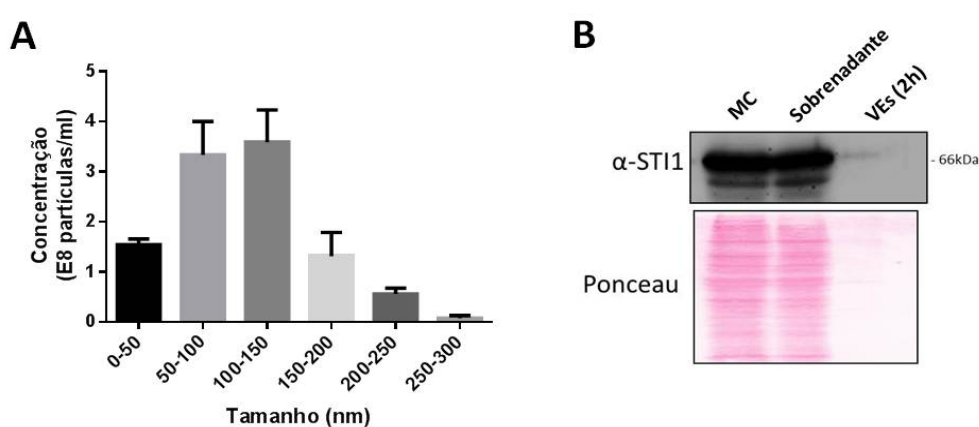


Figura 8 - Caracterização das VEs isoladas de culturas primárias de astrócitos. A preparação de VEs (pellets) de 2h de ultracentrifugação a 100.000xg foi caracterizada quanto ao tamanho e a concentração utilizando o aparelho NanoSight LM10 (NanoSight Ltd.) (A), e quanto à presença de STI1, em relação ao sobrenadante e ao meio condicionado total, por *Western blot* usando o anticorpo anti-STI1 (B).

Após a caracterização das VEs, culturas de neurônios hipocâmpais foram tratadas com meio condicionado, sobrenadante, e VEs derivadas de cultura de astrócitos primários. Nossos resultados mostraram um aumento dos níveis de Syp após os tratamentos com as frações derivadas de culturas de astrócitos em neurônios tipo selvagem, contudo essa diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 9A). Os mesmos tratamentos foram

realizados em neurônios *knockout* para PrP^C e os resultados não mostraram diferenças entre os níveis de Syp nos diferentes grupos (Figura 9B)

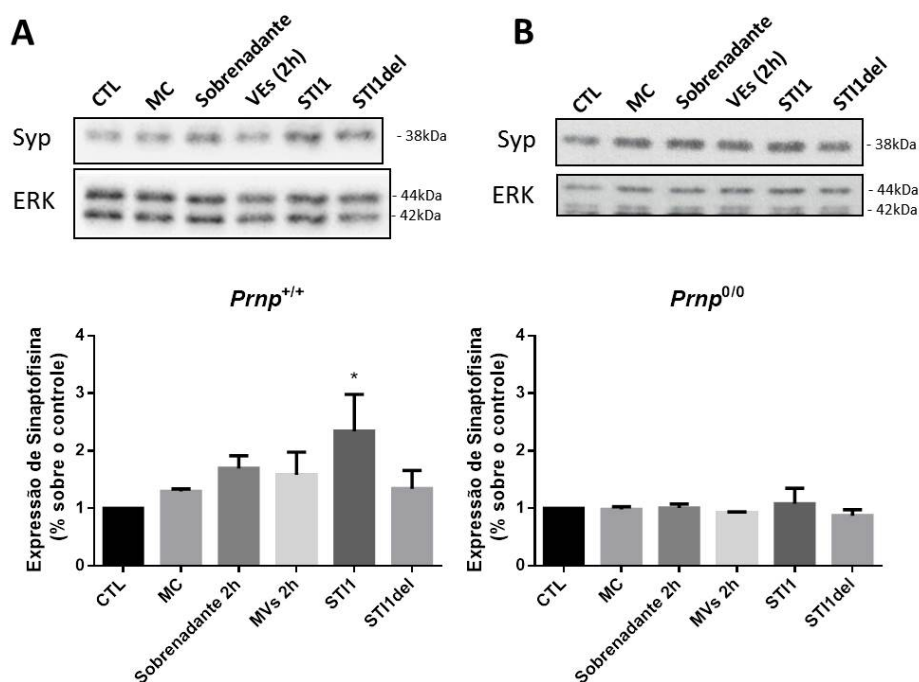


Figura 9 - Efeito do tratamento com meio condicionado e VEs de astrócitos nos níveis de Syp de neurônios hipocâmpais. Neurônios tipo-selvagem (A) e *knockout* (B) para PrP^C (18 dias *in vitro*) foram tratados por 30min com meio condicionado ou com as frações de sobrenadante e VEs (pellets) de 2h de ultracentrifugação a 100.000xg. Foram realizados tratamentos por 30min com STI1 recombinante (100nM) e STI1del (100nM), STI1 sem o domínio de ligação a PrP^C. Os neurônios foram lisados após os tratamentos, e os extratos celulares submetidos à SDS-PAGE seguido por *immunoblotting* usando anticorpos anti-Syp e anti-ERK total (usado como controle de carregamento). As bandas foram quantificadas por densitometria, e os gráficos representam a relação entre a Syp e ERK (A e B). Barras representam média \pm EP (barra de erros). (* $p < 0.05$, ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey). $n=4$

Adicionalmente, tentamos uma abordagem de isolamento de VEs que apresentassem uma grande concentração de STI1. Para isso, realizamos o isolamento de VEs provenientes de culturas primárias de astrócitos de

animais que superexpressam STI1 (TgA). Na caracterização inicial dessas VEs observamos que astrócitos TgA secretam 2,3 vezes menos vesículas que astrócitos WT, em ausência de SFB (Figura 10A). Em seguida, avaliamos se as VEs provenientes de astrócitos TgA continham mais STI1. Para isso fizemos um *Western blot* para STI1 com o mesmo número de vesículas WT e TgA. Nossos resultados mostram que apesar de os astrócitos TgA secretarem menos VEs nas condições analisadas, quando comparamos uma mesma quantidade de vesículas, os astrócitos TgA secretam mais STI1 que os astrócitos WT (Figura 10B).

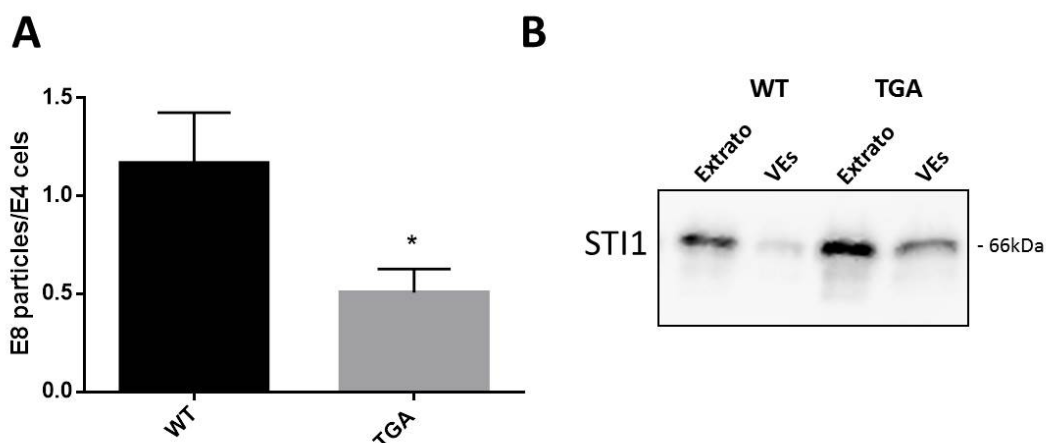


Figura 10 - Caracterização das VEs secretadas por astrócitos que superexpressam STI1. (A) Quantificação do número de vesículas secretadas por astrócitos WT e TgA. O meio condicionado dos astrócitos WT e que superexpressam STI1 foi ultracentrifugado a 100.000g por 2h, e o *pellet* (VEs) foi quantificado através do equipamento NanoSight® e normalizado pelo número de células. (B) Quantificação proteica de STI1 nos extratos de astrócitos WT e TgA (1µg de extrato) e quantificação da STI1 secretada (3×10^8 VEs) por essas células. n=4. *p<0.05.

Assim, utilizamos essas vesículas para tratar neurônios hipocâmpais e analisar seu efeito nos níveis de Syp. No entanto, assim como as vesículas

derivadas de animais tipo selvagem, o tratamento com as VEs de astrócitos que superexpressam STI1 não tiveram efeito sobre os níveis de Syp neuronal, nas condições analisadas (Figura 11).

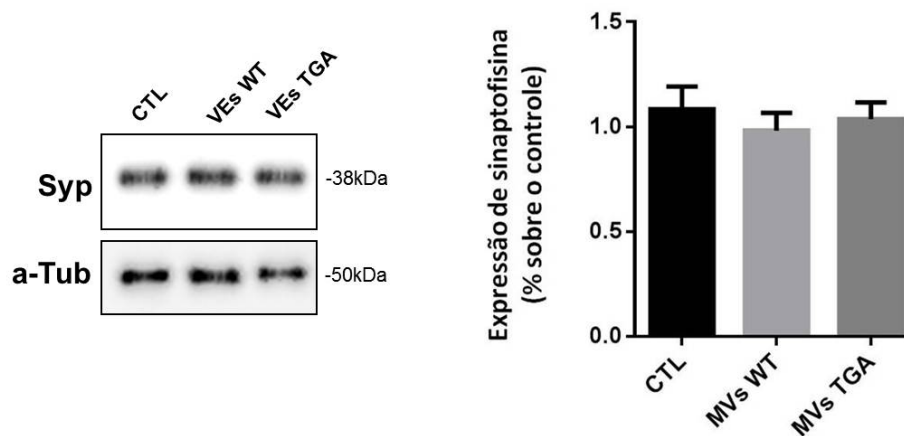


Figura 11 - Efeito do tratamento com VEs de astrócitos TgA nos níveis de Syp de neurônios hipocâmpais. Neurônios tipo-selvagem (18 dias *in vitro*) foram tratados por 30min com uma mesma quantidade de VEs de 2h de ultracentrifugação a 100.000xg. Os neurônios foram lisados após os tratamentos, e os extratos celulares submetidos à SDS-PAGE seguido por *immunoblotting* usando anticorpos anti-Syp e anti-alfa tubulina (usado como controle de carregamento). As bandas foram quantificadas por densitometria, e o gráfico representa a relação entre a Syp e alfa-tubulina. n=4.

4.5 MECANISMOS ASSOCIADOS COM A ALTERAÇÃO NA SECREÇÃO DE VESÍCULAS EM ASTRÓCITOS DERIVADOS DE ANIMAIS QUE SUPEREXPRESSAM STI1

A partir dos dados inesperados obtidos na figura 10 exploramos os mecanismos que poderiam explicá-los. Dessa maneira, analisamos por *Western blot*, em extrato de astrócitos WT e TgA, a expressão de proteínas marcadoras de endossomos iniciais e tardios, Rab5 e Rab7, proteínas dos complexos ESCRTs como TSG101, VPS36, e Alix, e a proteína Rab27b, envolvida na liberação das VEs (Figura 12).

Nossos resultados iniciais mostram que, em comparação aos astrócitos WT, os astrócitos TgA possuem uma diminuição na expressão das proteínas TSG101, VPS36 e Alix, que são proteínas envolvidas na biogênese dos MVBs e das vesículas intraluminais. Quando analisamos as proteínas marcadoras de endossomos, Rab5 e Rab7, e a proteína Rab27b, não houve diferença entre as linhagens (Figura 12).

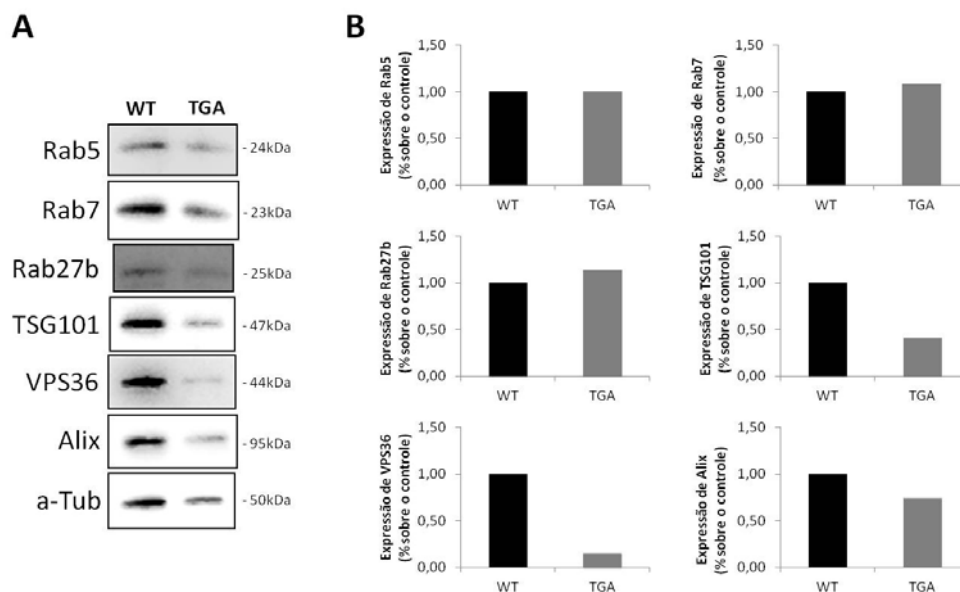


Figura 12 - Expressão das proteínas envolvidas na via de secreção de VEs.

(A) Imagens representativas do *Western blot* para seis marcadores envolvidos na formação, maturação e secreção de VEs e (B) Quantificação de cada proteína avaliada normalizada pela proteína a-Tubulina. n=1.

Para corroborar esses resultados, avaliamos nas duas linhagens, por imunofluorescência, a presença do ácido liso-bis-fosfatídico (LBPA), que é um lipídio encontrado em endossomos tardios, usado como marcador de vesículas intraluminais (KOBAYASHI et al. 1999). Foi observada uma diminuição na marcação de LBPA nos astrócitos TgA quando comparados aos astrócitos WT, tanto em condições normais quanto em privação de nutrientes (Figura 13).

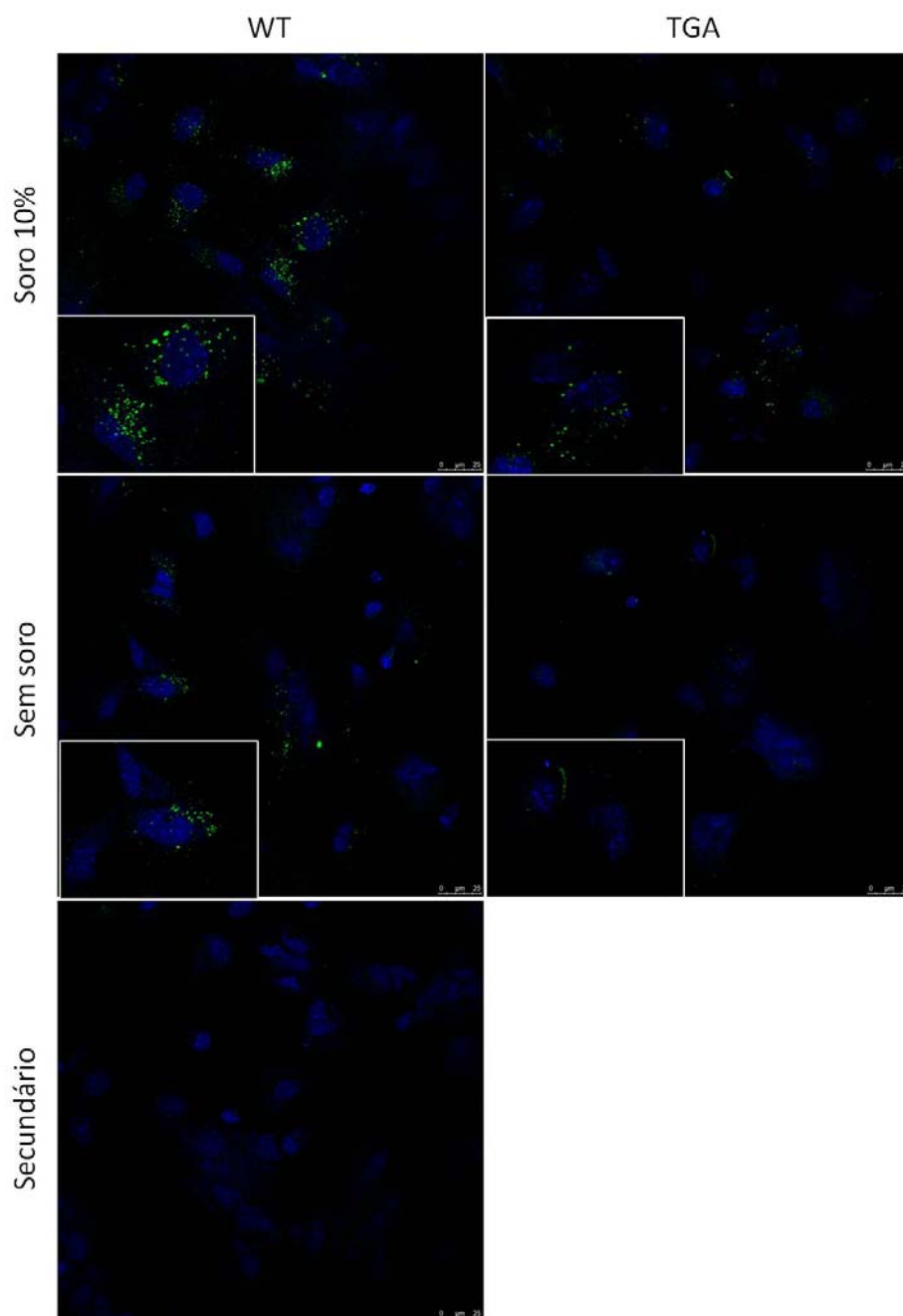
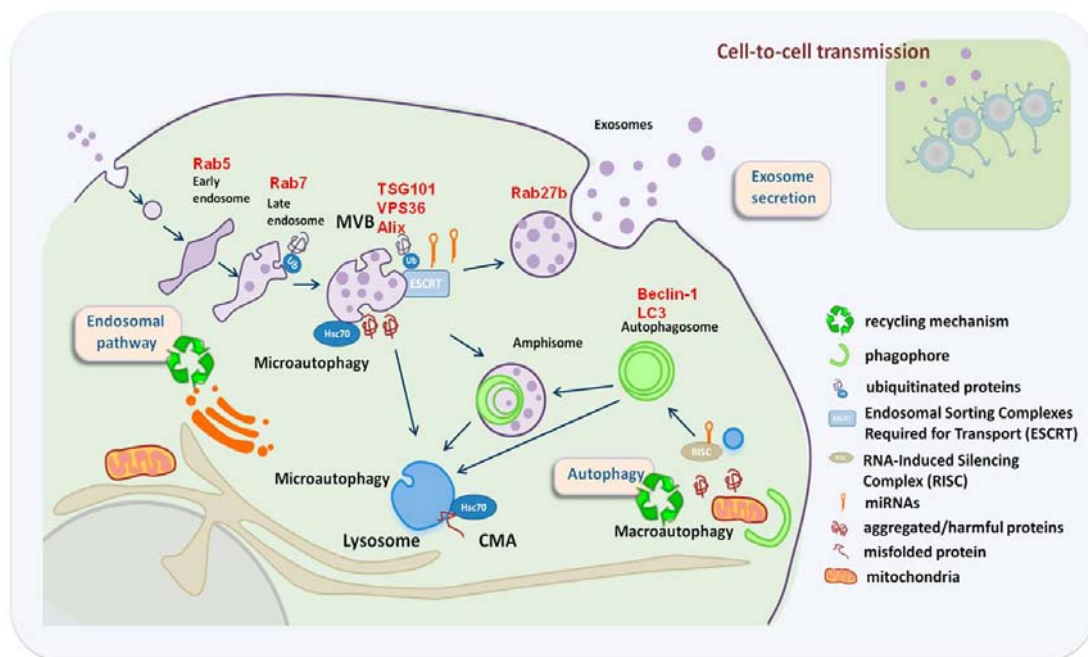


Figura 13 - Análise da localização de LBPA em astrócitos WT e TgA na presença ou ausência de SFB. Imagens representativas de astrócitos tipo-selvagem (WT) e que superexpressam ST11 (TgA) imunomarcados com anti-LBPA (verde) e TO-PRO-3 (núcleos, azul). Astrócitos controle (1ª coluna). Astrócitos TgA (2ª coluna). Os astrócitos foram plaqueados em lamínulas, e após 24h foram mantidos por mais 2h na presença (1ª linha) ou ausência (2ª linha) de SFB. Em seguida as células foram fixadas e imunomarcadas. Algumas células foram incubadas apenas com anticorpo secundário para controle da marcação (3ª linha). Barra de escala: 25µM. Incertos representam zoom de 2,5x. n=1

Na Figura 14 está um esquema da relação entre a secreção de exossomos e autofagia, para melhor localização das proteínas analisadas que participam de cada passo deste processo.



Fonte: Adaptado de BAIXAULI et al. (2014)

Figura 14 - Esquema do *crosstalk* entre a secreção de exossomos e autofagia na manutenção da homeostase celular.

Assim, fomos investigar se os astrócitos TgA possuem uma alteração na regulação da via autofágica. Dessa maneira, analisamos, nos extratos de astrócitos WT e TgA, a expressão das proteínas LC3 e Beclin-1. Nossos resultados preliminares indicam um aumento na expressão dessas proteínas nos astrócitos TgA carenciados (Figura 15).

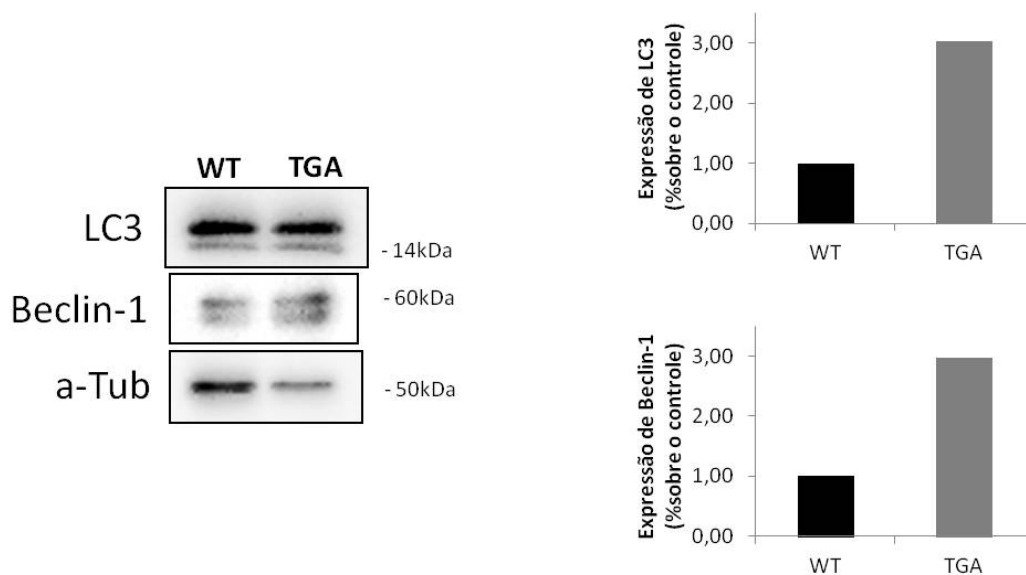


Figura 15 - Análise da expressão de proteínas envolvidas na via de autofagia. Imagens representativas do *Western blot* para as proteínas LC3 e Beclin-1 em extrato de astrócitos WT e TgA, e a quantificação de cada proteína avaliada normalizada pela proteína a-Tubulina. n=1.

Esses resultados indicam uma relação entre o aumento de STI1 na célula e um aumento na via de autofagia.

4.6 PAPEL DO LIGANTE DE PrP^C O PEPTÍDEO γ 1 DE LAMININA NA PROTEÇÃO DA NEUROTOXICIDADE MEDIADA POR A β O

A fim de analisar se, assim como STI1, o peptídeo γ 1 era capaz de interferir na ligação de A β O a PrP^C, e atuar de maneira protetora aos efeitos causados por A β O, utilizamos o modelo de sinaptossomos hipocampais.

Após o isolamento dos sinaptossomos, a pureza da preparação foi confirmada pelo enriquecimento do marcador sináptico Syp nessa fração (Figura 16).

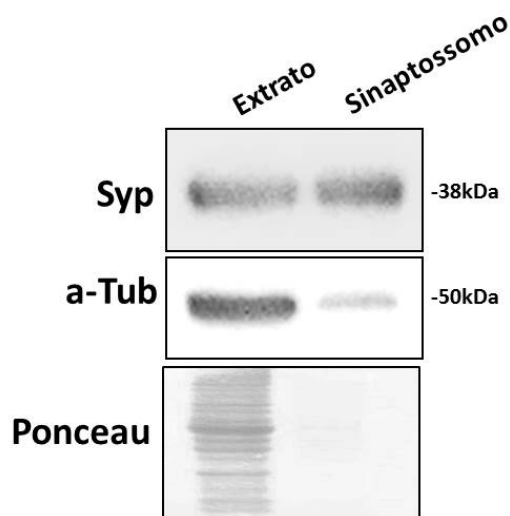


Figura 16 - Pureza da preparação de sinaptossomos. A pureza das preparações de sinaptossomos foi confirmada por *Western blot* através do enriquecimento do marcador sináptico Syp, quando comparado a uma quantidade proporcional de extrato de hipocampo. Anticorpos utilizados: anti-Syp e anti- α -tubulina.

Em seguida, os sinaptossomos do hipocampo de animais selvagem e *knockout* para PrP^C foram tratados com A β O e/ou o peptídeo γ 1. Nossos resultados demonstram que em sinaptossomos, assim como demonstrado anteriormente nos neurônios, o tratamento com A β O é capaz de diminuir os níveis de Syp. Porém, quando o tratamento com γ 1 é realizado antes ou após a adição de A β O os níveis de Syp são recuperados. Esse efeito é dependente de PrP^C, já que em sinaptossomos de animais PrP^C *knockout* não há alteração nos níveis de Syp (Figura 17). Já o tratamento com peptídeo γ 1, por si só, não altera as concentrações dessa proteína.

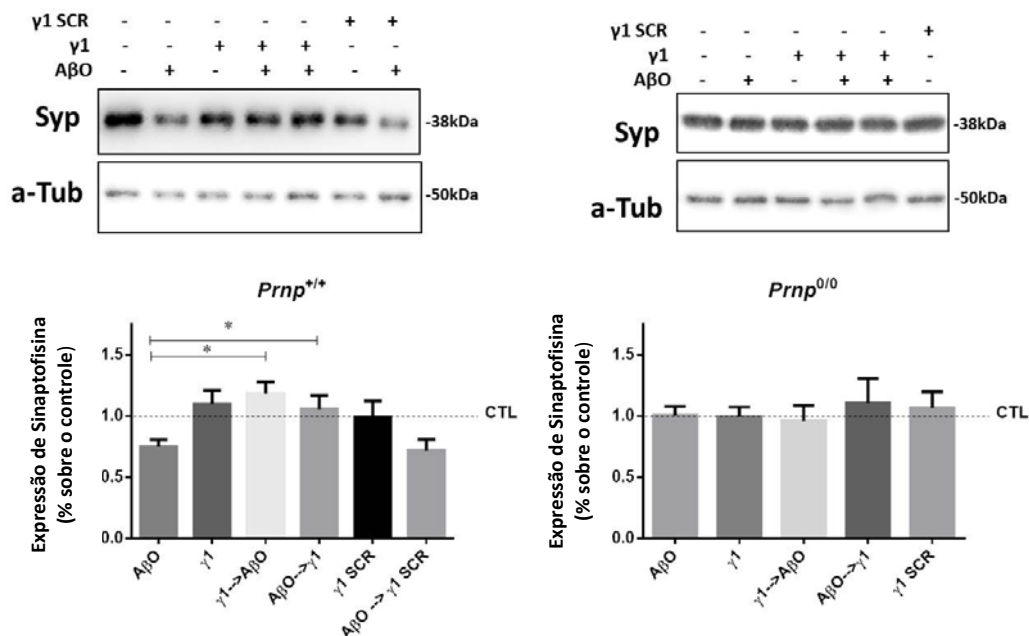


Figura 17 - O ligante de PrP^C γ 1 protege contra a perda de sinaptofisina causada pelos A β O. Sinaptossomos de animais tipo selvagem (*Prnp*^{+/+}) e *knockout* para PrP^C (*Prnp*^{0/0}) foram tratados com o peptídeo γ 1, submetidos à SDS-PAGE seguido por *immunoblotting* usando anticorpos anti-Syp e anti- α -tubulina. As bandas foram quantificadas por densitometria, e os gráficos representam a relação entre a Syp e a α -tubulina. Os neurônios foram tratados com oligômeros A β (500nM, 1h), γ 1 (30 μ M por 30min) ou γ 1 scramble (γ 1 SCR) (30 μ M por 30min). Barras representam média \pm EP (barra de erros). (*p<0.05, ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey). n=3.

Assim, investigamos se o efeito de proteção de γ 1 via PrP^C se dá com a participação do receptor mGluR5. Nossos resultados mostram que quando tratamos os sinaptossomos com A β O, seguido do tratamento com MPEP, um inibidor de mGluR5, o peptídeo γ 1 deixa de proteger os sinaptossomos contra os efeitos de A β O (Figura 18). Esse resultado evidencia um papel importante de mGluR5 no efeito de proteção de γ 1 aos insultos gerados por A β O em sinaptossomos.

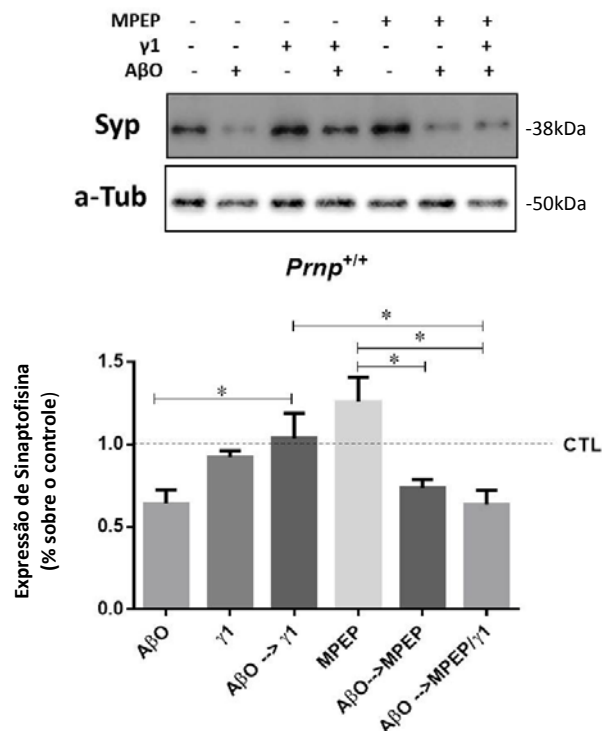


Figura 18 - O efeito de γ 1 na expressão sinaptofisina após tratamento com A β O depende mGluR5. Sinaptossomos de animais tipo selvagem (*Prnp^{+/+}*) e *knockout* para PrP^C (*Prnp^{0/0}*) foram tratados com A β O (500nM, 1h), γ 1 (30uM, 30min) ou 2-*metil*-6-(2-*feniletil*)piridina (MPEP) (10uM, 30min) e submetidos à SDS-PAGE seguido por imunoblotting utilizando anti-Syp e anti- α -tubulina. As bandas foram quantificadas por densitometria e os gráficos representam a relação entre Syp e α -tubulina. As barras representam a média \pm EP (barra de erro). (* P <0,05, ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey). n = 4

4.7 ANÁLISE DO PERFIL NEUROPATOLÓGICO E COMPORTAMENTAL DOS ANIMAIS TRANSGÊNICOS APP/PS1

Um segundo passo no estudo do papel dos ligantes de PrP^C na proteção contra neurodegeneração da doença de Alzheimer, seria testar STI1 e γ 1 em modelos animais da doença. Para isso, foi analisada, em homogenato de encéfalo de camundongos APP/PS1 de 8 e 14 meses, a

presença das placas amiloides por ELISA com anticorpo contra o peptídeo A β 42. Altas concentrações deste último foram detectadas em regiões específicas, como hipocampo, córtex, cerebelo e bulbo olfatório e, como esperado, maiores concentrações foram identificadas no hipocampo seguido do córtex (Figura 19).

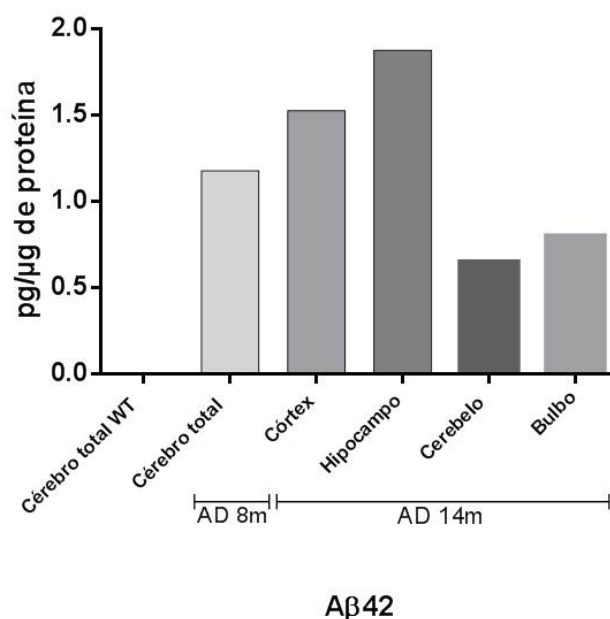


Figura 19 - Presença de A β 42 humano em homogenato de cérebro de animal APP/PS1. Os cérebros de um animal tipo selvagem (WT) e de um animal transgênico de 8 meses (AD 8m) foram extraídos e feitos homogenatos de cérebro total. O cérebro de um animal transgênico de 14 meses (AD 14m) foi dissecado e feito homogenatos do córtex, hipocampo, cerebelo e bulbo. O A β 42 humano foi detectado através de um kit de ELISA, de acordo com protocolo do fabricante. Os níveis de A β 42 foram expressos em pg por μ g de proteína total. n=2

A presença do peptídeo β -amiloide também foi avaliada em cortes de cérebro de animais transgênicos APP/PS1, de 14 meses, por imunohistoquímica. Nessa idade verificou-se grande quantidade de marcação para o peptídeo β -amiloide, principalmente no córtex e

hipocampo, depositados em forma de placas (Figura 20A). Foi realizada uma coloração com Fluoro-Jade[®]B, fluorocromo que detecta degeneração neuronal, em cortes de cérebro dos mesmos animais, a qual também mostrou coloração intensa (SCHMUED e HOPKINS 2000; DAMJANAC et al. 2007). Uma grande quantidade de neurônios degenerados estava agrupada em estruturas semelhantes aos depósitos de β -amiloide (Figura 20B). Deste modo, confirmamos que os animais transgênicos utilizados como modelo apresentam depósitos amiloides e neurodegeneração.

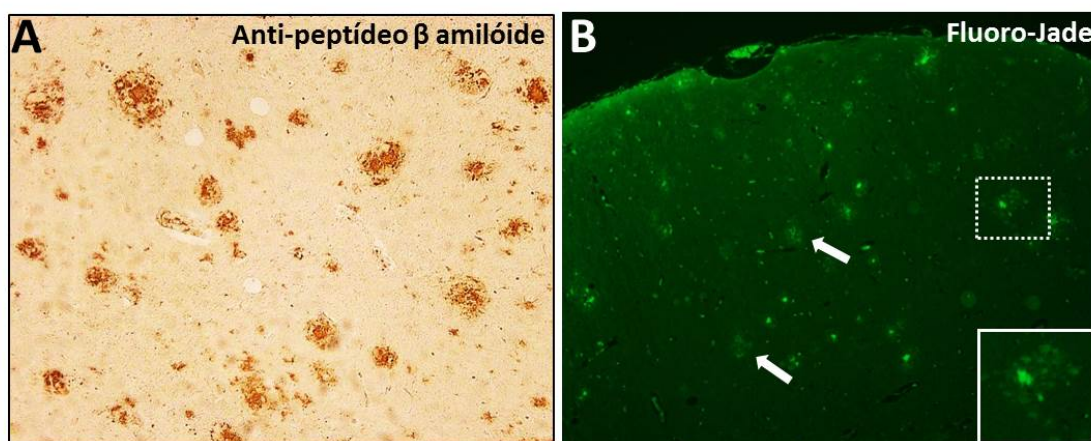


Figura 20 - Imunohistoquímica para peptídeo β amiloide e coloração com Fluoro-Jade em cortes de cérebro de camundongos transgênicos APP/PS1. O cérebro foi fixado em paraformaldeído 4% e embocado em parafina para posterior corte de secções de 3-5 μ M, em micrótomo. (A) Para imunohistoquímica os cortes foram desparafinizados, hidratados e feita a recuperação antigênica em tampão Tris-EDTA pH9.0 em banho-maria. Os cortes foram incubados com anti-Peptídeo β Amiloide (Invitrogen – 1:50) e revelados utilizando o kit *LSAB*[™]+, Universal – *Dako*. (B) A coloração foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante (Fluoro-Jade[®]B. - Millipore). Os cortes foram observados em microscópio equipado com epifluorescência. Setas indicam neurônios degenerados corados em verde com Fluoro-Jade B.

O próximo passo foi estabelecer a adequação do modelo através de testes comportamentais. O primeiro teste utilizado foi o de reconhecimento de objetos (RO). Como esperado, tanto os animais controle como os animais transgênicos permaneceram tempos equivalentes nos dois objetos idênticos (1) apresentados durante a fase de treino. No teste de STM os animais controle permaneceram tempos equivalentes no objeto familiar (Objeto 1) e no objeto novo (Objeto 2). Já no teste de LTM os animais controle apresentaram menor tempo de exploração do objeto antigo, mostrando sua capacidade de reconhecer objetos já explorados. Por sua vez, os animais transgênicos não apresentaram déficits cognitivos de memória tanto de curta duração, quanto de longa duração, permanecendo por mais tempo explorando os objetos novos (Objeto 2 e 3, respectivamente) do que o objeto familiar (Objeto 1) (Figura 21). Esses resultados indicam que os animais transgênicos utilizados não apresentam déficit de memória no teste de reconhecimento de objetos.

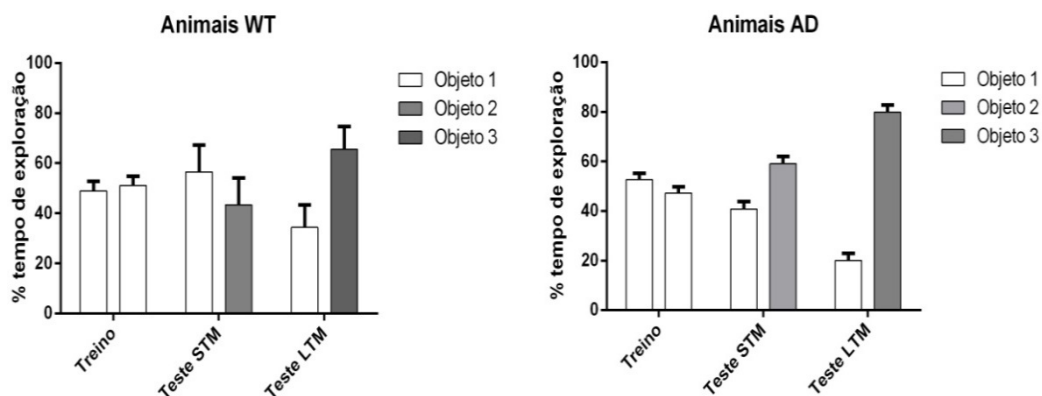


Figura 21 - Análise das memórias de curta (STM) e longa duração (LTM) em camundongos adultos tipo-selvagem e transgênicos APP/PS1 na tarefa de reconhecimento de objetos. Na fase de treino os animais foram colocados em um campo aberto contendo dois objetos iguais (Objeto 1) e permaneceram 5min para explorar livremente. Nas fases de teste STM (120min após o treino) e teste LTM (24h após o treino) os animais puderam explorar por 5min o objeto 1 (familiar) e os objetos 2 e 3 (novos). Os resultados foram expressos pela média do percentual de exploração total em cada caso \pm EP (barra de erros). $n = 5$ por grupo.

Dessa forma, fomos avaliar se os animais respondiam no teste de esquiwa inibitória do tipo “*step down*”. Porém, nos nossos experimentos, tanto os animais selvagens como os animais transgênicos exibiram aprendizagem semelhante, a curto e longo prazo (120min e 24h, respectivamente), permanecendo por tempo semelhante na plataforma (Figura 22).

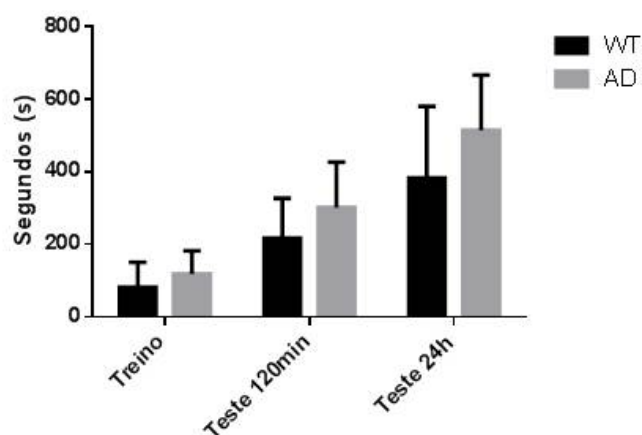


Figura 22 - Avaliação de memória contextual de curto e longo prazo em camundongos APP/PS1. Memória contextual em curto e longo prazo foi avaliada por meio do teste de esquila inibitória “*step down*”. Durante a sessão de treinamento, o período de latência não diferiu entre os camundongos transgênicos APP/PS1 (AD) e camundongos WT. Durante o teste de retenção de 120min e 24h após a sessão de treinamento, a latência também não foi diferente estatisticamente entre os camundongos AD e WT.

Outro teste utilizado na análise do perfil comportamental de animais modelo de Alzheimer foi a atividade de nidificação. Dessa forma, avaliamos em nosso modelo de DA a atividade de construção de ninho em animais de 6 e 14 meses, porém, não observamos nenhuma diferença entre os genótipos. Alguns animais selvagens, assim como alguns animais transgênicos, construíram um ninho organizado agrupado em um canto da gaiola (Figura 23, 1ª coluna), já outros animais mantiveram os papéis totalmente bagunçados (Figura 23, 2ª coluna), não havendo um padrão específico que diferenciasse os genótipos.

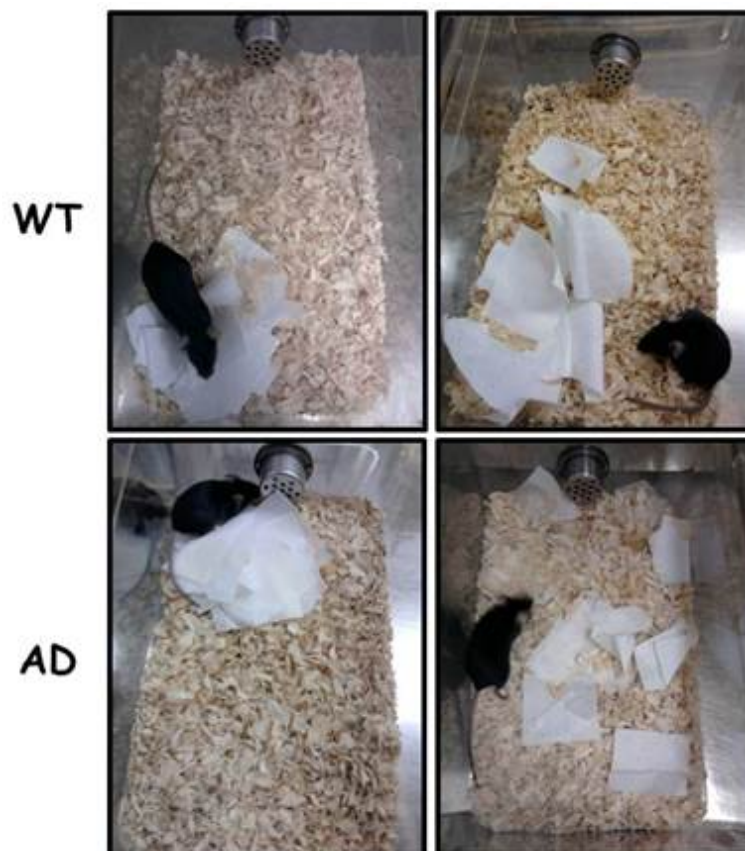


Figura 23 - Imagens representativas de construção de ninho. Exemplos de ninhos organizados (1ª coluna) e ninhos não identificáveis (2ª coluna) de animais selvagens (WT) e transgênicos (AD). Foram feitos testes utilizando machos de 6 a 12 meses.

Deste modo, nosso modelo animal possui as características neuropatológicas para DA, como depósitos de peptídeo β -amiloide e degeneração neuronal, porém, não apresentou déficits cognitivos nos testes comportamentais realizados.

5 DISCUSSÃO

5.1 O TRATAMENTO COM A β O INIBE OS NÍVEIS CELULARES DE SINAPTOFISINA PELA DEGRADAÇÃO VIA PROTEASSOMO

Sabe-se que os A β O são ligantes de sinapses estreitamente relacionados com a patogênese da DA. Dessa forma, analisamos se o tratamento com A β O de neurônios hipocampais envelhecidos era capaz de produzir efeitos sobre os níveis da proteína sináptica Syp, um marcador muito utilizado para monitorar plasticidade sináptica. Observamos em nossos resultados que o tratamento com A β O em poucos minutos é capaz de diminuir os níveis da proteína Syp, de uma maneira dependente de PrP^C. Desta forma, foi possível utilizar a expressão da proteína Syp como uma medida fidedigna da atividade de A β O em culturas celulares.

Estes dados estão em concordância com os de SEBOLLELA et al. (2012) que demonstraram, através de ensaios de microarranjos de DNA e RT-PCR, em fatias de cérebros humanos adultos expostos a doses subletais de A β O, um conjunto de 27 genes que demonstraram expressão diferencial consistente. Dentre esses genes diferencialmente expressos, o gene mais significativamente reprimido foi o gene para Syp.

A partir desse resultado, avaliamos alguns possíveis mecanismos associados à regulação da expressão de Syp por A β O. Primeiramente, analisamos se esse mesmo tratamento poderia causar alguma alteração nas

vias de controle traducional, e se essa disfunção poderia ser causada pela interação de A β O com PrP^C.

Sabe-se que a modulação da síntese proteica é crítica para as funções neurotróficas de PrP^C-STI1, na plasticidade e excitabilidade neuronal, na formação e consolidação da memória, e na neuroproteção contra insultos celulares e sistêmicos (LINDEN et al. 2008). Tanto a tradução basal quanto aquela estimulada por PrP^C-STI1 são corrompidas em linhagens de células neuronais persistentemente infectadas com PrP^{Sc}, bem como em culturas primárias de neurônios hipocâmpais expostos de maneira aguda a PrP^{Sc}. Na DA, alterações na atividade de fatores de início de tradução já foram descritas (MOREL et al. 2009). O fator eIF2 é uma proteína dependente de GTP, que se liga a diversos fatores de iniciação e à subunidade 40S, gerando um complexo de pré-iniciação, e a conversão do seu estado inativo para ativo é regulada por eIF2B. A fosforilação da subunidade α de eIF2 na serina do resíduo 51 torna-o um inibidor competitivo de eIF2B, bloqueando a síntese proteica. Alguns trabalhos relacionam a fosforilação de eIF2 α na progressão da DA, sendo sua forma fosforilada observada frequentemente em degeneração dos neurônios do cérebro de pacientes com DA (CHANG et al. 2002a) e em culturas de células neuronais tratadas com A β (CHANG et al. 2002b). Segundo (KIM et al. 2007), o acúmulo de A β leva à fosforilação de eIF2 α , e conseqüentemente redução na eficácia de tradução, ocasionando uma falha na plasticidade sináptica e na retenção da memória.

Assim, tratamos os neurônios primários com A β O, e avaliamos a fosforilação do fator de tradução eIF2 α . Os nossos resultados demonstram que não há alteração significativa nos níveis de fosforilação do fator de tradução eIF2 α tanto em neurônios tipo-selvagem, quanto em neurônios *knockout* para PrP^C após seu tratamento com A β O, nas condições realizadas.

Os resultados obtidos diferem de resultados encontrados na literatura em que o acúmulo de A β leva à fosforilação de eIF2 α . Isso pode ser devido às condições diferentes de tratamento, a exemplo de tempo (5, 10, 15 e 30min) e concentração (500nM) menores de A β utilizados. Segundo (CHANG et al. 2002), o tratamento de culturas neuronais primárias de rato com 20uM de A β por 2h promovem aumento de aproximadamente 50% na fosforilação de eIF2 α .

Como não foi observado um efeito do tratamento com A β O na fosforilação de eIF2 α , a diminuição da expressão de Syp nos neurônios hipocampais envelhecidos pode estar relacionada ao processo de degradação proteica.

Sabe-se que em neurônios provenientes de animais saudáveis a degradação da Syp é processada pelo sistema ubiquitina-proteassomo (WILLEUMIER et al. 2006). Para então avaliar a hipótese de que a diminuição da Syp está relacionada ao seu processo de degradação, analisamos a expressão desta proteína após o tratamento dos neurônios com A β O e com MG132, um inibidor de proteassomo. Após os tratamentos avaliamos a expressão de Syp. Nossos resultados demonstram que com

apenas 15min de tratamento com A β O pode ser observada a diminuição significativa nos níveis de Syp em relação ao controle. Porém, quando os neurônios são tratados com o MG132 seguido pelo tratamento com A β O os níveis de Syp permanecem comparáveis aos controles.

Os resultados obtidos indicam um possível papel de A β O na indução da degradação da Syp pelo proteassomo. Em um trabalho recentemente publicado por (QURESHI et al. 2013) foi demonstrado que a proteína 14-3-3z é capaz de reduzir os níveis de Syp em neurônios hipocâmpais de ratos através do aumento da degradação pelo proteassomo. 14-3-3z induz a fosforilação da Ser262 da proteína tau e essa fosforilação diminui a ligação de tau aos microtúbulos, ocasionando a desestabilização destes, e consequente aumento na atividade proteassomal (HUFF et al. 2010; QURESHI et al. 2013). Quando neurônios que superexpressavam a proteína 14-3-3z foram tratados com a droga taxol, que estabiliza microtúbulos, a fosforilação da Ser 262 de tau diminui, e os níveis de Syp foram restaurados (QURESHI et al. 2013). Alguns trabalhos vêm relacionando A β O com um aumento na fosforilação de tau no resíduo Ser 262, tanto em modelos celulares e modelos animais, como em culturas de neurônios tratadas com A β O (AMADORO et al. 2011), em cérebro de animais duplo transgênicos expressando a proteína APP e tau (PÉREZ et al. 2005), e em córtex de macaco após a injeção de A β O (GEULA et al. 1998). Também foi demonstrado que em drosófilas transgênicas expressando A β 42 e tau humanas, A β 42 aumenta a fosforilação de tau em sítios relacionados à DA, incluindo Ser262, e aumenta a neurodegeneração induzida por tau (IIJIMA et

al. 2010). Assim, é possível que em nosso modelo o tratamento com A β O esteja alterando a fosforilação de tau, e conseqüentemente desestabilizando os microtúbulos e induzindo a degradação de Syp pelo proteassomo. Dessa forma, quando tratamos os neurônios com MG132 seguido pelo tratamento de A β O, os níveis de Syp não são alterados.

Para verificarmos se além do papel da degradação haveria alguma alteração na síntese de Syp após tratamento com A β O, culturas primárias de neurônios hipocâmpais envelhecidos foram tratadas com o inibidor de síntese proteica cicloheximida (Chx). Este tratamento não alterou as concentrações de Syp nos neurônios, indicando uma estabilidade dessa proteína no sistema. Porém, o tratamento prévio com Chx é capaz de bloquear a diminuição de Syp ocasionado pelo tratamento com A β O.

Estes dados sugerem que os A β Os atuem tanto promovendo a degradação de Syp pelo proteassomo como diminuindo a síntese da proteína Syp. Outra hipótese é que os A β O podem estar estimulando a síntese de alguma outra molécula que atue diminuindo a tradução da Syp.

5.2 STI1 RECOMBINANTE É CAPAZ DE PROTEGER NEURÔNIOS HIPOCÂMPAIS DOS EFEITOS TÓXICOS DE A β O

Em trabalhos anteriores do grupo, pudemos demonstrar que o ligante de PrP^C, STI1, possui importantes propriedades neuroprotetoras e de sinalização celular (LOPES et al., 2005). A interação entre STI1 e PrP^C promove efeitos positivos na neuritogênese e sobrevivência neuronal.

Quando STI1 recombinante é adicionada a neurônios hipocampais em cultura, esta interage com PrP^C na superfície neuronal e promove neuritogênese de neurônios tipo selvagem, mas não de células *knockout* para PrP^C, mostrando a importância dessa interação para os efeitos causados por STI1. Outro fato importante demonstrado é que o domínio de STI1 (STI1₂₃₀₋₂₄₅) que se liga a PrP^C é suficiente para induzir os efeitos causados pela interação de STI1-PrP^C. Por outro lado, dados da literatura mostram que PrP^C é um ligante de AβO e que esta interação promove neurotoxicidade (UM et al. 2012; LARSON et al. 2012; OSTAPCHENKO et al. 2013).

Deste modo, hipotetizamos que STI1 poderia interferir com a ligação de PrP^C e os AβO com um importante potencial para reverter os efeitos neurotóxicos observados na doença de Alzheimer. Nosso primeiro passo, para então demonstrar este potencial efeito, foi a realização de ensaios *in vitro* com culturas primárias de neurônios hipocampais envelhecidos, utilizando como marcador a proteína sináptica Syp.

Foi verificado que a proteína STI1 aumenta, por si só, a expressão de Syp em relação ao controle. Da mesma forma, um aumento também foi observado quando o tratamento foi realizado com o peptídeo de STI1₂₃₀₋₂₄₅, que possui apenas o domínio de ligação a PrP^C. Porém, quando os neurônios foram tratados com o peptídeo irrelevante os níveis de expressão de Syp foram semelhantes ao controle, assim como quando o tratamento com STI1 foi realizado em neurônios *knockout* para PrP^C.

Nossos resultados demonstram mais uma importante função de STI1, na regulação da expressão de Syp, sendo esse efeito também dependente da interação com PrP^C. Isso por que, não foram observadas mudanças na expressão de Syp em relação ao controle quando STI1 com deleção na região de interação com PrP^C (STI1del) foi utilizado. Por outro lado, quando os tratamentos foram realizados com o peptídeo de STI1 apenas com o domínio de ligação a PrP^C (pepSTI1₂₃₀₋₂₄₅) os resultados foram semelhantes ao tratamento com STI1 recombinante.

Para verificar os efeitos neuroprotetores de STI1 contra a toxicidade dos A β O foram utilizadas culturas neuronais envelhecidas (18 dias de cultura *in vitro*), tratadas com A β O e/ou STI1. Nossos resultados demonstram que culturas tipo-selvagem tratadas com A β O apresentam uma diminuição da fluorescência de Syp quando comparadas com culturas controle. Esse resultado mostra mais uma vez o efeito tóxico provocado pelo tratamento com A β O na sinapse. De maneira muito interessante, o pré-tratamento dessas culturas com STI1, seguido pelo tratamento com A β O mantém ou parece aumentar a fluorescência de Syp quando comparada com culturas controle, demonstrando assim o efeito neuroprotetor do tratamento com STI1 contra o efeito tóxico promovido pelos A β O.

Nossos dados apontam ainda que em culturas de neurônios *knockout* para PrP^C parece não ocorrer mudança dos níveis de Syp quando as células são tratadas com A β O, o que reproduz o dado de LAURÉN et al. (2009), indicando que a presença do PrP^C é importante para mediar a toxicidade induzida por A β O. Por outro lado, o tratamento com STI1 não interfere com a

expressão de Syp nestes neurônios. Desta forma, estes resultados sugerem que os efeitos de A β O e STI1 dependem da presença de PrP^C, e que o complexo PrP^C-STI1 pode ser um alvo terapêutico interessante na DA. Esses resultados, demonstrando que STI1 previne a perda sináptica induzida por A β O, integram um artigo do nosso grupo e colaboradores, recentemente publicado no *The Journal of Neuroscience* (OSTAPCHENKO et al. 2013) (Anexo 2).

Em seguida, analisamos se o tratamento com STI1 concomitante ou seguido do tratamento com A β O apresentava o mesmo efeito de diminuição nos níveis de Syp, como quando as células eram pré-tratadas com STI1. No entanto, os resultados apresentados mostram que o tratamento concomitante dos neurônios com STI1 e A β O, ou o pré-tratamento com A β O seguido pelo tratamento com STI1 não surtem o mesmo efeito na expressão de Syp como quando o pré-tratamento é realizado com STI1 e seguido pelo tratamento com A β O.

Diversos estudos demonstraram que PrP^C é um sítio de ligação de alta afinidade para A β , tanto *in vivo* quanto *in vitro* (LAURÉN et al. 2009; BALDUCCI et al. 2010; CHEN et al. 2010; ZOU et al. 2011; FREIR. et al. 2011; UM et al. 2012; LARSON et al. 2012; OSTAPCHENKO et al. 2013). Foi indicado que tanto o resíduo N-terminal 23-27, como a região 92-110 de PrP^C, são criticamente importantes para sua interação com A β , pois a deleção de qualquer uma destas regiões resulta em perda da ligação (CHEN et al. 2010). Interessantemente, a proteína STI1 se liga a PrP^C na região dos

aminoácidos 113-128 (ZANATA et al. 2002), próxima a uma das regiões de ligação de A β a PrP^C (OSTAPCHENKO et al. 2013) (Anexo 2).

Estes dados podem sugerir que a ligação de STI1-PrP^C pode criar um impedimento estérico que exclui a interação de PrP^C a A β O (OSTAPCHENKO et al. 2013. Anexo 2). Dessa maneira, quando os neurônios são tratados inicialmente com STI1, este se liga a PrP^C e pode prevenir a formação do complexo A β O/PrP^C. Essa competição é provavelmente relacionada aos sítios de ligação adjacentes para STI1 e A β O no domínio N-terminal de PrP^C, sendo que a ligação de STI1 ocasiona mudanças conformacionais e possivelmente torna as regiões adjacentes estericamente indisponíveis para outros ligantes. Por outro lado a ligação de PrP^C a A β O pode ser de maior afinidade e não ser desligada por STI1 quando esta é adicionada as células depois de A β O. Em um artigo publicado recentemente, demonstramos que a co-localização de A β com PrP^C em neurônios hipocâmpais é diminuída significativamente na presença de STI1, e o mesmo ocorre na presença do domínio TRP2 de STI1, que contém apenas a região de ligação a PrP^C (OSTAPCHENKO et al. 2013. Anexo 2).

5.3 EFEITOS DE STI1 NO AUMENTO DE SYP EM NEURÔNIOS HIPOCÂMPAIS SÃO VIA INTERAÇÃO COM α 7NACHR

Alguns trabalhos têm relacionado A β com os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs), e essa interação pode resultar na ativação ou inibição do receptor, dependendo da concentração de A β e o subtipo de receptor.

Em trabalho de WANG et al. (2000) foi demonstrado que A β se liga com alta afinidade aos α 7nAChRs em regiões corticais e do hipocampo na DA. Resultados adicionais mostram que baixas concentrações de A β são capazes de estimular os α 7nAChRs resultando em influxo de cálcio (Ca²⁺), aumento da liberação de transmissores pré-sinápticos e despolarização pós-sináptica (PUZZO et al. 2008). Porém, altas concentrações de A β (nanomolar) podem inibir os α 7nAChRs prejudicando assim a participação destes receptores na plasticidade sináptica normal (CHEN et al. 2006).

Sabe-se que a atividade de α 7nAChR também está relacionada à interação de PrP^C com STI1. Segundo descrito pelo nosso grupo (BERALDO et al. 2010), a ligação de STI1 a PrP^C induz o influxo intracelular de Ca²⁺ em neurônios via modulação da atividade de α 7nAChR, levando à ativação de ERK1/2 e PKA, e promovendo sobrevivência e diferenciação neuronais. Foi observado que em culturas primárias neuronais a morte celular induzida por estaurosporina é bloqueada pelo tratamento com STI1, e esse efeito é revertido pela pré-incubação com α -Bungarotoxina (α -Bgt), um inibidor de α 7nAChR. Além disso, o tratamento de neurônios hipocâmpais com α -Bgt bloqueia a neuritogênese mediada por PrP^C-STI1. No artigo recentemente publicado (Anexo 2) esses resultados foram corroborados através da demonstração de que a neuroproteção induzida por STI1 contra a apoptose induzida por estaurosporina não ocorre em neurônios *knockout* para α 7nAChR (α 7nAChR^{-/-}). Nessas células o influxo intracelular de Ca²⁺ induzido por STI1 foi abolido. De maneira semelhante, STI1 não resgata a

morte neuronal induzida por A β em neurônios $\alpha 7nAChR^{-/-}$ (OSTAPCHENKO et al. 2013).

A fim de analisar se os efeitos de STI1 na expressão de Syp em neurônios hipocampais também se dão devido à interação com $\alpha 7nAChR$, as culturas de neurônios envelhecidos foram tratadas com o inibidor α -bgt.

Os resultados apresentados demonstram que a inibição de $\alpha 7nAChR$ bloqueia o efeito de STI1 sobre o aumento da expressão de Syp. A seguir, avaliamos se o efeito dessa interação era importante para o efeito neuroprotetor de STI1, em culturas primárias de neurônios hipocampais tratadas com A β O, com base nos níveis de Syp. Porém, os resultados obtidos mostram que a inibição prévia de $\alpha 7nAChR$ não bloqueia o efeito protetor de STI1 em neurônios tratados com A β O.

Em nosso trabalho recentemente publicado (OSTAPCHENKO et al. 2013, Anexo 2), demonstramos que em culturas de neurônios $\alpha 7nAChR^{-/-}$ o tratamento com A β O induz um aumento na morte celular, e que o tratamento com STI1 não é capaz de resgatar a morte induzida por A β O. Talvez, no nosso modelo a bungarotoxina não esteja bloqueando completamente o receptor $\alpha 7nACh$ a fim de inibir os efeitos protetores de STI1 sobre a toxicidade de A β O, porém, esse bloqueio é capaz de inibir o efeito de STI1 sobre o aumento da expressão de Syp.

Os resultados apresentados demonstram um papel crucial de $\alpha 7nAChR$ para o aumento na expressão de Syp em neurônios hipocampais envelhecidos mediada por STI1.

5.4 TRATAMENTOS COM VESÍCULAS EXTRACELULARES DE ASTRÓCITOS TIPO SELVAGEM E QUE SUPEREXPRESSAM STI1 NÃO FORAM CAPAZES DE MEDIAR PROTEÇÃO CONTRA TOXICIDADE DE A β O

Muitas proteínas que exercem função no espaço extracelular são secretadas em associação com vesículas lipídicas, entre elas vesículas geradas por *shedding* da membrana plasmática e vesículas derivadas do sistema endossomal chamadas de exossomos (MATHIVANAN et al. 2010). Devido a uma grande diversidade de protocolos para isolamento e caracterização das diferentes classes de vesículas lipídicas secretadas, foi convencionalizado chamá-las coletivamente de vesículas extracelulares (VE).

A proteína STI1 não possui peptídeo sinal para secreção pela via clássica, no entanto, nosso grupo identificou que STI1 é secretada associada a VEs de tamanho entre 50 a 200nm derivadas do complexo endossomal (HAJJ et al. 2013). A STI1 secretada possui atividade de promover sinalização celular em neurônios do tipo selvagem (HAJJ et al. 2013). Dessa forma, foi de interesse também verificar se a STI1 secretada por astrócitos possui o mesmo efeito de elevação da expressão de Syp em neurônios.

Assim, isolamos através de ultracentrifugação VEs de meio condicionado de astrócitos primários, e caracterizamos quanto ao tamanho, concentração e presença de STI1. Nossos resultados mostram que, a partir da metodologia utilizada, foi possível purificar VEs de até 300nm, sendo a

maior parte composta por VEs de 50-100nm. Além disso, nessas vesículas, assim como no meio condicionado total e no sobrenadante, foi observada a presença da proteína STI1, sendo que esta foi encontrada em grandes quantidades no meio condicionado total e no sobrenadante (fração solúvel), e em menor quantidade nas VEs purificadas.

Após a caracterização das VEs, culturas de neurônios hipocâmpais foram tratadas com meio condicionado, sobrenadante, e VEs derivadas de cultura de astrócitos primários. Nossos resultados mostraram uma tendência ao aumento dos níveis de Syp após os tratamentos com as frações derivadas de culturas de astrócitos em neurônios tipo selvagem, contudo essa diferença não foi estatisticamente significativa. Os mesmos tratamentos foram realizados em neurônios *knockout* para PrP^C e os resultados não mostraram diferenças entre os níveis de Syp nos diferentes grupos.

Segundo dados do grupo, a concentração de STI1 recombinante necessária para ativar ERK1/2 é 100 vezes maior que a concentração de STI1 presente em VEs (HAJJ et al. 2013), ou seja, a STI1 presente em VEs é cerca de 100 vezes mais ativa do que a STI1 recombinante.

Como não obtivemos uma alteração nos níveis de Syp após o tratamento de neurônios com as frações derivadas de astrócitos selvagens, adicionalmente, tentamos uma abordagem de isolamento de VEs que apresentassem uma grande concentração de STI1. Para isso, realizamos o isolamento de VEs provenientes de culturas primárias de astrócitos de animais que superexpressam STI1 (TgA). Observamos que astrócitos TgA, em ausência de SFB, secretam 2,3 vezes menos vesículas que astrócitos

WT. Esse foi um resultado inesperado, e que permitiu novas abordagens para explorá-lo, que serão discutidas adiante.

Em seguida, avaliamos se além de as células dos animais TgA expressarem mais STI1, se as VEs provenientes de astrócitos TgA também continham mais STI1, ou seja, se secretam mais essa proteína. Para isso fizemos um *Western blot* para STI1 com o mesmo número de vesículas WT e TgA. Nossos resultados mostram que apesar de os astrócitos TgA secretarem menos VEs nas condições analisadas, quando comparamos uma mesma quantidade de vesículas, os astrócitos TgA secretam mais STI1 que os astrócitos WT.

Deste modo, utilizamos essas vesículas para tratar neurônios hipocampais e analisar seu efeito nos níveis de Syp. No entanto, assim como as vesículas derivadas de animais tipo selvagem, o tratamento com as VEs de astrócitos que superexpressam STI1 não tiveram efeito sobre os níveis de Syp neuronal, nas condições analisadas.

As abordagens que usaram vesículas derivadas de astrócitos tipo selvagem ou que superexpressam STI1 não foram capazes de demonstrar o efeito destas sob a regulação de Syp. É possível que os demais fatores carregados pelas VEs desencadeiem sinalizações diversas, em detrimento do aumento de expressão de Syp. É possível ainda que o efeito das VEs sobre os neurônios possa ter uma cinética diferente da desencadeada pela proteína recombinante. Se este for o caso, diferentes tempos de tratamento poderiam ser necessários para observar alguma alteração.

Isso pode indicar que a metodologia do uso de vesículas comparativamente ao uso da proteína recombinante STI1 deve ser melhor avaliada, e inclusive com uma medida objetiva das concentrações de STI1 nestas vesículas. Acreditamos que estas metodologias precisam ser melhor estabelecidas para que seus resultados possam ser discutidos com maior precisão.

5.5 ALTERAÇÃO NA SECREÇÃO DE VESÍCULAS E AUMENTO DE AUTOFAGIA EM ASTRÓCITOS DERIVADOS DE ANIMAIS QUE SUPEREXPRESSAM STI1

A partir dos dados inesperados obtidos, da diminuição na secreção de VEs isoladas de animais que superexpressam STI1, exploramos os mecanismos que poderiam explicá-los. Esse resultado foi inesperado, pois não há nada na literatura que relacione a proteína STI1 com a formação e secreção de vesículas. Brevemente, o processo de secreção de vesículas a partir do sistema endossomal é subdividido em três compartimentos: endossomo inicial, endossomo tardio e endossomo de reciclagem. Vesículas endocíticas se formam por invaginações da membrana plasmática e são transportadas para os endossomos iniciais (marcador Rab5), que após sofrerem uma série de transformações originam os endossomos tardios (marcador Rab7) e, por conseguinte, dão origem aos corpos multivesiculares (MVBs) (KELLER et al. 2006). As vesículas intraluminais resultantes atuam como um dispositivo para levar proteínas para degradação no lisossomo ou,

alternativamente, os MVBs podem se fundir com a membrana plasmática e liberar os exossomos no ambiente extracelular, permitindo que atuem em processos de sinalização intercelular (DE GASSART et al. 2004). A proteína Rab27b possui um papel na liberação dos exossomos, mediando a transferência dos MVBs dos microtúbulos para a região cortical rica em actina e sua retenção na periferia celular (OSTROWSKI et al. 2010).

Outro aspecto importante para a formação das vesículas intraluminais é a seleção (*sorting*), na via endossomal, de proteínas mono-ubiquitinadas através de proteínas dos complexos ESCRT (Complexo endossomal de escolha proteica para transporte) (WOLLERT e HURLEY 2010). A maquinaria de seleção das proteínas ubiquitinadas se inicia pelo reconhecimento através da proteína VPS27/HRS que age como uma ponte entre as proteínas de membrana mono-ubiquitinadas e a clatrina nos endossomos. HRS recruta a proteína TSG101, que é um dos componentes do complexo ESCRT I, que também reconhece sítios de ubiquitinação. ESCRT I recruta os complexos ESCRT II, sendo um de seus componentes a proteína VPS36, e ESCRT III que se conectam através da proteína Alix (FÉVRIER E RAPOSO 2004). Esses componentes permitem a invaginação e brotamento das vesículas.

Dessa maneira, analisamos em astrócitos WT e TgA, a expressão de proteínas marcadoras de endossomos iniciais e tardios, Rab5 e Rab7, proteínas dos complexos ESCRTs como TSG101, VPS36, e Alix, e a proteína Rab27b, envolvida na liberação das VEs.

Nossos resultados iniciais mostram que, em comparação aos astrócitos WT, os astrócitos TgA possuem uma diminuição na expressão das proteínas TSG101, VPS36 e Alix, que são proteínas envolvidas na biogênese dos MVBs e das vesículas intraluminais. Quando analisamos as proteínas marcadoras de endossomos, Rab5 e Rab7, e a proteína Rab27b, não houve diferença entre as linhagens. Para corroborar esses resultados, avaliamos nas duas linhagens, por imunofluorescência, a presença do ácido liso-bis-fosfatídico (LBPA), que é um lipídio encontrado em endossomos tardios, usado como marcador de vesículas intraluminais (KOBAYASHI et al. 1999). Foi observada uma diminuição na marcação de LBPA nos astrócitos TgA quando comparados aos astrócitos WT, tanto em condições normais quanto em privação de nutrientes.

Esses resultados sugerem que os astrócitos TgA possuem uma alteração na via de biogênese dos MVBs e das vesículas intraluminais, o que se torna mais expressivo em condição de privação de nutrientes, ocasionando uma diminuição na secreção dos exossomos.

A inibição na secreção de exossomos também pode ocorrer quando a célula é induzida para via autofágica, principalmente em condição de privação de nutrientes (FADER et al. 2008). A disfunção dos complexos ESCRTs também leva a um fenótipo de indução de autofagia.

Assim, fomos investigar se os astrócitos TgA possuem uma alteração na regulação da via autofágica. Brevemente, a via de autofagia surgiu durante a evolução como uma adaptação da célula eucariótica à falta de nutrientes, permitindo a mobilização de nutrientes da própria célula,

sacrificando partes do citosol. Os eventos celulares durante o processo de autofagia seguem três fases distintas: iniciação (formação do fagóforo), alongação (crescimento e fechamento) e maturação do autofagossomo de dupla membrana em um autolisossomo (LEVINE e DERECTION 2007). O estágio inicial, na formação do autofagossomo, depende da proteína VPS34 em um complexo com a proteína associada à autofagia Beclin-1. Já a alongação da membrana do fagóforo, e o fechamento do autofagossomo são processos dependentes da atividade da proteína LC3 (GHAVAMI et al. 2014). Essas proteínas também desempenham um papel chave no carregamento seletivo para os autofagossomos, além de servirem como sítio de ancoragem para proteínas adaptadoras (WILD et al. 2014). Dessa maneira, a fim de identificarmos alguma alteração na via de autofagia, analisamos, nos extratos de astrócitos WT e TgA, a expressão das proteínas LC3 e Beclin-1. Nossos resultados preliminares indicam um aumento na expressão dessas proteínas nos astrócitos TgA carenciados.

Esses resultados indicam uma relação entre o aumento de STI1 na célula e um aumento na via de autofagia. Não há na literatura trabalhos que liguem diretamente STI1 a alterações na via de autofagia, no entanto, o aumento na expressão de STI1 pode ter modificado a expressão de alguma proteína cliente do complexo Hsp90/Hsp70/STI1 que esteja ligada a essa via. No artigo de BERALDO et al. (2013) foi demonstrado que a ausência da expressão de STI1 em embriões de camundongo leva a diminuição de diversas proteínas clientes de Hsp90, como é o caso de p53, STAT3 e GRK2. Talvez o aumento na expressão de STI1 aumente a expressão, ou a

estabilidade, de alguma proteína cliente relacionada à autofagia. Uma hipótese pode ser um aumento na expressão da proteína p53. Essa proteína já foi descrita como uma reguladora da autofagia e senescência. SUI et al. (2015) demonstraram que p53 é capaz de ativar a autofagia, principalmente em situação de privação de nutrientes, permitindo a sobrevivência da célula nessas condições. Com base no exposto, seria interessante avaliar em um próximo passo a expressão de p53 nos astrócitos que superexpressam STI1.

O aumento na expressão da proteína Beclin-1 pode ser, talvez, outro exemplo, já que em um artigo de XU et al. (2011) foi demonstrado que a proteína Beclin-1 é uma proteína cliente de Hsp90. Nesse trabalho foi demonstrado que Hsp90 controla a disponibilidade de Beclin-1 à maquinaria de autofagia mantendo uma homeostase de Beclin-1. Talvez o aumento na expressão de STI1 interfira na formação do complexo Hsp90/Beclin-1, aumentando a disponibilidade de Beclin-1 e promovendo a autofagia.

Os resultados de diminuição nas proteínas envolvidas na biogênese dos MVBs e das vesículas intraluminais, e de aumento na expressão de proteínas envolvidas na via de autofagia relacionam pela primeira vez o aumento na expressão da proteína STI1 com uma alteração na secreção de VEs. Talvez a superexpressão de STI1 esteja agindo como um fator protetivo das células, em condição de privação de nutrientes, fazendo com que essas deixem de secretar VEs e entrem em autofagia, a fim de gerar nutrientes, ou remover componentes citoplasmáticos danificados.

Esses resultados, apesar de serem iniciais, dão suporte a um novo tópico que deve ser explorado pelo grupo, a fim de entender o mecanismo envolvido entre aumento na expressão de STI1, diminuição de secreção de vesículas e autofagia.

5.6 O PEPTÍDEO γ 1 DE LAMININA MEDIANTE INTERAÇÃO COM PrP^C PROTEGE DOS EFEITOS TÓXICOS DE A β O VIA mGluR5

A laminina é outro importante ligante de PrP^C cujo sítio de ligação está localizado na cadeia γ 1 (representada pelo decapeptídeo denominado γ 1). A interação entre o peptídeo γ 1 e PrP^C promove o recrutamento de mGluRs para o complexo, o que desencadeia uma cascata de transdução de sinais intracelulares que promovem um aumento na neuritogênese (BERALDO et al. 2011).

Dessa forma, fomos analisar se, assim como STI1, o peptídeo γ 1 era capaz de interferir na ligação de A β O a PrP^C, e atuar de maneira protetora aos efeitos causados por A β O. Como essa parte do trabalho faz parte de uma colaboração em andamento com o grupo do Dr. Marco Prado (Robarts Research Institute), adotamos uma metodologia complementar a do nosso colaborador, utilizando o modelo de sinaptossomos hipocampais. Os sinaptossomos são estruturas membranares obtidas pelo fracionamento subcelular deste tecido cerebral. Essas estruturas são terminais nervosos reconstituídos e contêm vesículas sinápticas, mitocôndrias, além de porções pós-sinápticas. Os sinaptossomos, por manterem as características

morfológicas e de composição química da pré-sinapse, são um modelo mais eficiente, e muito utilizado, para estudar transmissão sináptica (DUNKLEY et al. 2008).

Nossos resultados demonstram que em sinaptossomos, assim como demonstrado anteriormente nos neurônios, o tratamento com A β O é capaz de diminuir os níveis de Syp. Porém, quando o tratamento com γ 1 é realizado antes ou após a adição de A β O os níveis de Syp são recuperados. Esse efeito é dependente de PrP^C, já que em sinaptossomos de animais PrP^C *knockout* não há alteração nos níveis de Syp. Já o tratamento com peptídeo γ 1, por si só, não altera as concentrações dessa proteína.

Nossos resultados apontam para um novo e importante papel da interação de γ 1 com PrP^C, e podem proporcionar uma alternativa para modular a toxicidade induzida por A β O. Interessantemente, o peptídeo γ 1 reverte o efeito dos A β O independentemente de sua adição antes ou após os A β O. Fomos então investigar se o efeito de proteção de γ 1 via PrP^C se dá com a participação do receptor mGluR5. Nossos resultados mostram que quando tratamos os sinaptossomos com A β O, seguido do tratamento com MPEP, um inibidor de mGluR5, o peptídeo γ 1 deixa de proteger os sinaptossomos contra os efeitos de A β O. Esse resultado evidencia um papel importante de mGluR5 no efeito de proteção de γ 1 aos insultos gerados por A β O em sinaptossomos.

Partindo do princípio de que a interação física de PrP^C com mGluR5 é essencial para a transmissão de sinais neurotóxicos induzidos por A β O (HAAS et al. 2014), e de que γ 1 é capaz de proteger a célula desses

insultos, entender a interação $\gamma 1$ /PrP^C/A β O/mGluR5 poderá levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Isso por que o bloqueio completo de mGluR5 possui efeitos deletérios na função neuronal, assim, o uso de $\gamma 1$ evitaria a ativação de mGluR5 por A β /PrP^C, mas sem bloquear a função fisiológica desse receptor. Os resultados obtidos podem ter potenciais implicações clínicas para DA.

5.7 ANIMAIS TRANSGÊNICOS APP/PS1 COM CARACTERÍSTICAS PATOLÓGICAS DE DA NÃO APRESENTAM ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS NOS TESTES DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS, ESQUIVA INIBITÓRIA E NIDIFICAÇÃO

Um segundo passo no estudo do papel dos ligantes de PrP^C na proteção contra neurodegeneração da doença de Alzheimer seria testar STI1 e $\gamma 1$ em modelos animais da doença. Para isso, foram utilizados os camundongos APP/PS1 (APP^{swe}, PSEN1^{dE9})85Dbo/, que possuem inserção dos genes APP humano, contendo as mutações K595N/M596L, e presenilina-1, contendo uma deleção no éxon 9, associados à DA familiar.

Para checar a acurácia do modelo, verificamos em primeiro lugar a presença de placas amiloides no cérebro dos camundongos. Em homogenato de encéfalo de camundongos APP/PS1 de 8 e 14 meses, a presença das placas amiloides foi avaliada por ELISA com anticorpo contra o peptídeo A β 42. Altas concentrações deste último foram detectadas ainda

em regiões específicas, como hipocampo, córtex, cerebelo e bulbo olfatório e como esperado maiores concentrações foram identificadas no hipocampo seguido do córtex.

A presença do peptídeo β -amiloide também foi avaliada em cortes de cérebro de animais transgênicos APP/PS1, de 14 meses, por imunohistoquímica. Nessa idade verificou-se grande quantidade de marcação para o peptídeo β -amiloide, principalmente no córtex e hipocampo, depositados em forma de placas. A coloração com Fluoro-Jade[®]B, fluorocromo que detecta degeneração neuronal, em cortes de cérebro dos mesmos animais também mostrou coloração intensa (SCHMUED e HOPKINS 2000; DAMJANAC et al. 2007). Como esperado, uma grande quantidade de neurônios degenerados estava agrupada em estruturas semelhantes aos depósitos de β -amiloide. Deste modo, confirmamos que os animais transgênicos utilizados como modelo apresentam depósitos amiloides e neurodegeneração, características patológicas de DA.

O próximo passo foi estabelecer a adequação do modelo através de testes comportamentais. O primeiro teste utilizado foi o de reconhecimento de objetos (RO). O RO é utilizado para avaliar déficits cognitivos na memória de reconhecimento, analisando a habilidade dos animais em discriminar objetos novos ou familiares (ROSSATO et al. 2007). O protocolo utilizado foi descrito por (MYSKIW et al. 2008), sendo analisadas as memórias de curta duração (STM) (teste 2h depois do treino) e de longa duração (LTM) (teste 24h depois do treino) em animais tipo-selvagem e transgênicos APP/PS1 de

20 meses. Como esperado, tanto os animais controle como os animais transgênicos permaneceram tempos equivalentes nos dois objetos idênticos (1) apresentados durante a fase de treino. No teste de STM os animais controle permaneceram tempos equivalentes no objeto familiar (Objeto 1) e no objeto novo (Objeto 2). Já no teste de “long term memory” os animais controle apresentaram menor tempo de exploração do objeto antigo, mostrando sua capacidade de reconhecer objetos já explorados. Por sua vez, os animais transgênicos não apresentaram déficits cognitivos de memória tanto de curta duração, quanto de longa duração, permanecendo por mais tempo explorando os objetos novos (Objeto 2 e 3, respectivamente) do que o objeto familiar (Objeto 1). Esses resultados indicam que os animais transgênicos utilizados não apresentam déficit de memória no teste de reconhecimento de objetos.

Dessa forma, fomos avaliar se os animais respondiam no teste de esquila inibitória do tipo “*step down*”. Esse teste envolve a aprendizagem de uma tarefa aversiva, onde o animal aprende a relacionar a descida de uma plataforma com um leve choque aplicado nas patas. Assim, numa segunda exposição à caixa de esquila ele evita um comportamento inato de descer da plataforma para explorar a caixa. Quanto mais tempo o animal permanece na plataforma, maior será a latência de descida (IZQUIERDO e MEDINA 1997), indicando que ocorreu aprendizagem na relação entre o contexto e a ocorrência do choque (estímulo aversivo). GIMBEL et al. (2010), utilizando o mesmo modelo animal, mostraram que os animais transgênicos APP/PS1 apresentam uma pior retenção de aprendizagem na

tarefa de esquivar-se após 24h. Porém, nos nossos experimentos, tanto os animais selvagens como os animais transgênicos exibiram aprendizagem semelhante, a curto e longo prazo (120min e 24h, respectivamente).

Outro teste utilizado na análise do perfil comportamental de animais modelo de Alzheimer foi a atividade de nidificação. A construção do ninho constitui uma forma espécie-específica de interação ativa com o ambiente em busca de abrigo e controle de temperatura, sendo um dos muitos comportamentos que são importantes para a sobrevivência de um animal e sua prole (WESSON e WILSON 2011). Além disso, a construção do ninho é dependente de planejamento e organização estabelecidos pelo córtex pré-frontal (KOLB 1984). Pode-se estabelecer uma relação entre nidificação e perda de iniciativa (FRISONI et al. 1999; CHUNG e CUMMINGS 2000), observada em pacientes com Alzheimer. Em alguns modelos animais de DA como o Tg2576 (com uma mutação KM670/671NL em APP humana), APP₆₉₅SWE (mutação APPSwe juntamente com a variante A246E do gene da PS1 humana) e 3xTg-AD (triplo transgênico, com as mutações PS1/M146V, APPSwe e tauP301L), já foi demonstrado haver menor atividade de nidificação dos animais transgênicos em relação aos animais selvagens, reforçando a noção de que fatores genéticos podem contribuir para comportamentos afiliativos (FILALI e LALONDE 2009; FILALI et al 2009; WESSON e WILSON 2011; TORRES-LISTA e GIMÉNEZ-LLORT 2013). Dessa forma, avaliamos em nosso modelo de DA a atividade de construção de ninho em animais de 6 e 14 meses, porém, não observamos nenhuma diferença entre os genótipos. Alguns animais selvagens, assim

como alguns animais transgênicos, construíram um ninho organizado agrupado em um canto da gaiola, já outros animais mantiveram os papéis totalmente bagunçados, não havendo um padrão específico que diferenciasse os genótipos.

Diversos modelos animais têm sido utilizados para estudo dos domínios cognitivos afetados na DA. Dentre esses domínios, os mais abordados nos modelos são memória de referência, memória de trabalho e função executiva. Embora nenhum modelo animal reproduza totalmente a progressão das deficiências cognitivas observados na doença em humanos, os modelos animais têm sido muito importantes para os avanços no conhecimento da doença. Em uma revisão recentemente publicada por (WEBSTER et al. 2014) foram abordados dez principais modelos animais de DA e sua progressão de déficits cognitivos. É notável que para cada modelo específico o curso temporal e a progressão dos déficits cognitivos em cada domínio cognitivo podem ser diferentes.

Em nosso trabalho, utilizando o modelo de camundongos APP/PS1, analisamos os domínios memória de reconhecimento, memória de referência, além do comportamento de afiliação, através dos testes de reconhecimento de objetos, teste de esQUIVA inibitória e comportamento de nidificação, respectivamente. Na revisão de WEBSTER et al. (2014) são apresentados múltiplos trabalhos mostrando que diversos modelos de DA apresentam déficits cognitivos no teste de reconhecimento de objetos, mas de maneira surpreendente não há nenhum trabalho especificamente com o modelo APP/PS1. Da mesma maneira, diversos modelos como APP23,

3xTg-AD e inclusive o APP/PS1 apresentaram déficits na tarefa de esquila inibitória, sendo o último descrito em animais de 12 meses em um trabalho de ZHANG et al. (2011). Porém, nosso modelo não apresentou déficits cognitivos, com 12 meses, em nenhuma das atividades realizadas. Talvez esses animais venham a apresentar déficits nesses domínios com idade mais avançada. Segundo WEBSTER et al. (2013) os primeiros danos observados nos modelos de DA são na memória de trabalho espacial, seguido temporalmente por danos no aprendizado associativo e memória de referência.

Deste modo, nosso modelo animal possui as características neuropatológicas para DA, como depósitos de peptídeo β -amiloide e degeneração neuronal, porém, não apresentou déficits cognitivos nos testes comportamentais realizados. Sendo assim não foi possível realizar os experimentos com os ligantes de PrP^C, ST11 e γ 1, *in vivo*. Como alternativa seria interessante buscar novos testes para avaliar possíveis déficits cognitivos desses animais ou ainda utilizar outros modelos animais.

6 CONCLUSÕES

Os níveis celulares de Syp são inibidos pelo tratamento com A β O causado pela degradação da Syp pelo proteassomo. Sendo, portanto, a medida dos níveis de Syp uma medida fidedigna da atividade de A β O em culturas celulares.

O tratamento com STI1 recombinante em culturas primárias de neurônios hipocampais é capaz de proteger as células dos efeitos tóxicos de A β O (medidos pelos níveis de Syp) quando realizado previamente à administração de A β O, sendo esse efeito via PrP^C.

Os efeitos do complexo PrP^C-STI1 no aumento de Syp em neurônios hipocampais são via interação com α 7nAChR.

As vesículas extracelulares provenientes de astrócitos tipo selvagem e que superexpressam STI1, apesar de carregadoras de STI1 em diferentes concentrações, não foram capazes de mediar proteção contra toxicidade de A β O nas condições avaliadas neste trabalho.

Resultados inesperados forneceram indicações de que a superexpressão de STI1 pode causar diminuição na secreção de vesículas e aumento de autofagia. Apesar de não estar no escopo inicial dos objetivos deste trabalho, este achado casual deve introduzir um projeto dentro do grupo para entender o mecanismo envolvido com a relação: diminuição de secreção de vesículas e autofagia.

O peptídeo $\gamma 1$ de laminina mediante interação com PrP^C protege dos efeitos tóxicos de A β O em ensaios onde se mediu expressão de Syp em sinaptossomos.

O efeito protetor do complexo peptídeo $\gamma 1$ -PrP^C é mediado por mGluR5.

Os testes de reconhecimento de objetos, esquiva inibitória e nidificação não foram adequados para medir alterações comportamentais em camundongos APP/PS1 modelos de AD idosos e que apresentavam alterações patológicas consistentes com a doença. A limitação destes testes comportamentais impossibilitou avaliar os efeitos *in vivo* tanto de ST11 como do peptídeo $\gamma 1$ na proteção contra a toxicidade de A β O.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agostini F, Dotti CG, Pérez-Cañamás A, Ledesma MD, Benetti F, Legname G. Prion protein accumulation in lipid rafts of mouse aging brain. **PLoS One** 2013; 8:e74244.

Amadoro G, Corsetti V, Ciotti MT, et al. Endogenous A β causes cell death via early tau hyperphosphorylation. **Neurobiol Aging** 2011; 32:969-90.

Arthur CP, Stowell MH. Structure of synaptophysin: a hexameric MARVEL-domain channel protein. **Structure** 2007; 15:707-14.

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

Baixauli F, López-Otín C, Mittelbrunn M. Exosomes and autophagy: coordinated mechanisms for the maintenance of cellular fitness. **Front Immunol** 2014; 5:403.

Balducci C, Beeg M, Stravalaci M, et al. Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2010; 107:2295-300.

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.

Beraldo FH, Arantes CP, Santos TG, et al. Metabotropic glutamate receptors transduce signals for neurite outgrowth after binding of the prion protein to laminin γ 1 chain. **FASEB J** 2011; 25:265-79.

Beraldo FH, Soares IN, Goncalves DF, et al. Stress-inducible phosphoprotein 1 has unique cochaperone activity during development and regulates cellular response to ischemia via the prion protein. **FASEB J** 2013; 27:3594-607.

Bertram L, Lill CM, Tanzi RE. The genetics of Alzheimer disease: back to the future. **Neuron** 2010; 68:270-81.

Büeler 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.

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.

Calella AM, Farinelli M, Nuvolone M, et al. Prion protein and Abeta-related synaptic toxicity impairment. **EMBO Mol Med** 2010; 2:306-14.

Cattaneo A, Capsoni S, Paoletti F. Towards non invasive nerve growth factor therapies for Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis** 2008; 15:255-83.

Chang RC, Wong AK, Ng HK, Hugon J. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha (eIF2alpha) is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's disease. **Neuroreport** 2002a; 13:2429-32.

Chang RC, Suen KC, Ma CH, Elyaman W, Ng HK, Hugon J. Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha in neuronal degeneration. **J Neurochem** 2002b; 83:1215-25.

Chen J, Park CS, Tang SJ. Activity-dependent synaptic Wnt release regulates hippocampal long term potentiation. **J Biol Chem** 2006 281:11910-6.

Chen S, Yadav SP, Surewicz WK. Interaction between human prion protein and amyloid-beta (A β) oligomers: role OF N-terminal residues. **J Biol Chem** 2010; 285:26377-83.

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

Chow VW, Mattson MP, Wong PC, Gleichmann M. An overview of APP processing enzymes and products. **Neuromolecular Med** 2010; 12:1-12.

Chung E, Ji Y, Sun Y, et al. Anti-PrPC monoclonal antibody infusion as a novel treatment for cognitive deficits in an Alzheimer's disease model mouse. **BMC Neurosci** 2010; 11:130.

Chung JA, Cummings JL. Neurobehavioral and neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: characteristics and treatment. **Neurol Clin** 2000; 18:829-46.

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.

Coitinho AS, Lopes MH, Hajj GN, et al. Short-term memory formation and long-term memory consolidation are enhanced by cellular prion association to stress-inducible protein 1. **Neurobiol Dis** 2007; 26:282-90.

Daly C, Sugimori M, Moreira JE, Ziff EB, Llinás R. Synaptophysin regulates clathrin-independent endocytosis of synaptic vesicles. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2000; 97:6120-5.

Damjanac M, Rioux Bilan A, Barrier L, et al. Fluoro-Jade B staining as useful tool to identify activated microglia and astrocytes in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. **Brain Res** 2007; 1128:40-9.

Davies HA, Kelly A, Dhanrajan TM, Lynch MA, Rodríguez JJ, Stewart MG. Synaptophysin immunogold labelling of synapses decreases in dentate gyrus of the hippocampus of aged rats. **Brain Res** 2003; 986:191-5.

de Gassart A, Géminard C, Hoekstra D, Vidal M. Exosome secretion: the art of reutilizing nonrecycled proteins? **Traffic** 2004; 5:896-903.

Derksen MJ, Ward NL, Hartle KD, Ivanco TL. MAP2 and synaptophysin protein expression following motor learning suggests dynamic regulation and distinct alterations coinciding with synaptogenesis. **Neurobiol Learn Mem** 2007; 87:404-15.

Dunkley PR, Jarvie PE, Robinson PJ. A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. **Nat Protoc** 2008; 3:1718-28.

Evans GJ, Cousin MA. Tyrosine phosphorylation of synaptophysin in synaptic vesicle recycling. **Biochem Soc Trans** 2005; 33:1350-3.

Fader CM, Sánchez D, Furlán M, Colombo MI. Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in k562 cells. **Traffic** 2008; 9:230-50.

Figueiredo CP, Clarke JR, Ledo JH, et al. Memantine rescues transient cognitive impairment caused by high-molecular-weight $\text{A}\beta$ oligomers but not the persistent impairment induced by low-molecular-weight oligomers. **J Neurosci** 2013; 33:9626-34.

Filali M, Lalonde R. Age-related cognitive decline and nesting behavior in an APPswe/PS1 bigenic model of Alzheimer's disease. **Brain Res** 2009a; 1292:93-9.

Filali M, Lalonde R, Rivest S. Cognitive and non-cognitive behaviors in an APPswe/PS1 bigenic model of Alzheimer's disease. **Genes Brain Behav** 2009b; 8:143-8.

Ford MJ, Burton LJ, Morris RJ, Hall SM. Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. **Neuroscience** 2002; 113:177-92.

Freir DB, Nicoll AJ, Klyubin I, et al. Interaction between prion protein and toxic amyloid β assemblies can be therapeutically targeted at multiple sites. **Nat Commun** 2011; 2:336.

Frisoni GB, Rozzini L, Gozzetti A, et al. Behavioral syndromes in Alzheimer's disease: description and correlates. **Dement Geriatr Cogn Disord** 1999; 10:130-8.

Fuhrmann M, Bittner T, Mitteregger G, et al. Loss of the cellular prion protein affects the Ca^{2+} homeostasis in hippocampal CA1 neurons. **J Neurochem** 2006; 98:1876-85.

Fukuchi K, Accavitti-Loper MA, Kim HD, et al. Amelioration of amyloid load by anti-A β single-chain antibody in Alzheimer mouse model. **Biochem Biophys Res Commun** 2006; 344:79-86.

Février B, Raposo G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. **Curr Opin Cell Biol** 2004; 16:415-21.

Gauthier S, Molinuevo JL. Benefits of combined cholinesterase inhibitor and memantine treatment in moderate-severe Alzheimer's disease. **Alzheimers Dement** 2013; 9:326-31.

Geula C, Wu CK, Saroff D, Lorenzo A, Yuan M, Yankner BA. Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity. **Nat Med** 1998; 4:827-31.

Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, et al. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. **Prog Neurobiol** 2014; 112:24-49.

Gimbel DA, Nygaard HB, Coffey EE, et al. Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein. **J Neurosci** 2010; 30:6367-74.

Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Martins VR, Jay DG, Brentani RR. Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. **FEBS Lett** 2000a; 482:257-60.

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

Guillot-Sestier MV, Sunyach C, Ferreira ST, et al. α -Secretase-derived fragment of cellular prion, N1, protects against monomeric and oligomeric amyloid β (A β)-associated cell death. **J Biol Chem** 2012; 287:5021-32.

Haas LT, Kostylev MA, Strittmatter SM. Therapeutic molecules and endogenous ligands regulate the interaction between brain cellular prion protein (PrPC) and metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5). **J Biol Chem** 2014; 289:28460-77.

Hainfellner JA, Wanschitz J, Jellinger K, Liberski PP, Gullotta F, Budka H. Coexistence of Alzheimer-type neuropathology in Creutzfeldt-Jakob disease. **Acta Neuropathol** 1998; 96:116-22.

Hajj GN, 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.

Hajj GN, Arantes CP, Dias MV, et al. The unconventional secretion of stress-inducible protein 1 by a heterogeneous population of extracellular vesicles. **Cell Mol Life Sci** 2013; 70:3211-27.

Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science** 1992; 256:184-5.

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

Huff LM, Sackett DL, Poruchynsky MS, Fojo T. Microtubule-disrupting chemotherapeutics result in enhanced proteasome-mediated degradation and disappearance of tubulin in neural cells. **Cancer Res** 2010; 70:5870-9.

Hyeon JW, Kim SY, Park JS, et al. The association between prion proteins and A β ₁₋₄₂ oligomers in cytotoxicity and apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun** 2012; 424:214-20.

Iijima K, Gatt A, Iijima-Ando K. Tau Ser262 phosphorylation is critical for A β ₄₂-induced tau toxicity in a transgenic *Drosophila* model of Alzheimer's disease. **Hum Mol Genet** 2010; 19:2947-57.

Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiol Learn Mem** 1997; 68:285-316.

Janus C, Pearson J, McLaurin J, et al. A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. **Nature** 2000; 408:979-82.

Janz R, Südhof TC, Hammer RE, Unni V, Siegelbaum SA, Bolshakov VY. Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I. **Neuron** 1999; 24:687-700.

Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. **Immunol Lett** 2006; 107:102-8.

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

Kim HS, Choi Y, Shin KY, et al. Swedish amyloid precursor protein mutation increases phosphorylation of eIF2alpha in vitro and in vivo. **J Neurosci Res** 2007; 85:1528-37.

Kim SH, Seo SW, Yoon DS, et al. Comparison of neuropsychological and FDG-PET findings between early- versus late-onset mild cognitive impairment: A five-year longitudinal study. **Dement Geriatr Cogn Disord** 2010; 29:213-23.

Klein M, Taphoorn MJ, Heimans JJ, et al. Neurobehavioral status and health-related quality of life in newly diagnosed high-grade glioma patients. **J Clin Oncol** 2001; 19:4037-47.

Kobayashi T, Beuchat MH, Lindsay M, et al. Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. **Nat Cell Biol** 1999; 1:113-8.

Kolb B. Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review. **Brain Res** 1984; 320:65-98.

Kudo W, Lee HP, Zou WQ, et al. Cellular prion protein is essential for oligomeric amyloid- β -induced neuronal cell death. **Hum Mol Genet** 2012; 21:1138-44.

Kwon SE, Chapman ER. Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons. **Neuron** 2011; 70:847-54.

Lannfelt L, Relkin NR, Siemers ER. Amyloid- β -directed immunotherapy for Alzheimer's disease. **J Intern Med** 2014; 275:284-95.

Larson M, Sherman MA, Amar F, et al. The complex PrP(c)-Fyn couples human oligomeric A β with pathological tau changes in Alzheimer's disease. **J Neurosci** 2012; 32:16857-71a.

Laurén J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW, Strittmatter SM. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. **Nature** 2009; 457:1128-32.

Levine B, Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol** 2007; 7:767-77.

Li C, Zheng J, Wang J, Gui L, Li C. An fMRI stroop task study of prefrontal cortical function in normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. **Curr Alzheimer Res** 2009; 6:525-30.

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; 88:673-728.

Longshaw VM, Dirr HW, Blatch GL, Lässle M. The in vitro phosphorylation of the co-chaperone mSTI1 by cell cycle kinases substantiates a predicted casein kinase II-p34cdc2-NLS (CcN) motif. **Biol Chem** 2000; 381:1133-8.

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.

Lässle M, Blatch GL, Kundra V, Takatori T, Zetter BR. Stress-inducible, murine protein mSTI1. Characterization of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different kinases. **J Biol Chem** 1997; 272:1876-84.

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

Martins VR, Graner E, Garcia-Abreu J, et al. Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. **Nat Med** 1997; 3:1376-82.

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

Masliah E, Mallory M, Alford M, et al. Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. **Neurology** 2001; 56:127-9.

Masliah E, Mallory M, Hansen L, DeTeresa R, Alford M, Terry R. Synaptic and neuritic alterations during the progression of Alzheimer's disease. **Neurosci Lett** 1994; 174:67-72.

Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. **J Proteomics** 2010; 73:1907-20.

McMahon HT, Bolshakov VY, Janz R, Hammer RE, Siegelbaum SA, Südhof TC. Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1996; 93:4760-4.

Mengel D, Röskam S, Neff F, et al. Naturally occurring autoantibodies interfere with β -amyloid metabolism and improve cognition in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease 24 h after single treatment. **Transl Psychiatry** 2013; 3:e236.

Morel M, Couturier J, Lafay-Chebassier C, Paccalin M, Page G. PKR, the double stranded RNA-dependent protein kinase as a critical target in Alzheimer's disease. **J Cell Mol Med** 2009; 13:1476-88

Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, et al. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. **Nature** 2000; 408:982-5.

Mouillet-Richard S, Schneider B, Pradines E, et al. Cellular prion protein signaling in serotonergic neuronal cells. **Ann N Y Acad Sci** 2007; 1096:106-19.

Mouillet-Richard S, Pietri M, Schneider B, et al. Modulation of serotonergic receptor signaling and cross-talk by prion protein. **J Biol Chem** 2005; 280:4592-601.

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

Mucke L, Masliah E, Yu GQ, et al. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. **J Neurosci** 2000; 20:4050-8.

Myskiw JC, Rossato JI, Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. On the participation of mTOR in recognition memory. **Neurobiol Learn Mem** 2008; 89:338-51.

Nicolet CM, Craig EA. Isolation and characterization of ST11, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol** 1989; 9:3638-46.

Nieznanski K, Choi JK, Chen S, Surewicz K, Surewicz WK. Soluble prion protein inhibits amyloid- β (A β) fibrillization and toxicity. **J Biol Chem** 2012; 287:33104-8.

Ostapchenko VG, Beraldo FH, Mohammad AH, et al. The prion protein ligand, stress-inducible phosphoprotein 1, regulates amyloid- β oligomer toxicity. **J Neurosci** 2013; 33:16552-64.

Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. **Nat Cell Biol** 2010; 12:19-30; sup pp 1-13.

Parkin ET, Watt NT, Hussain I, et al. Cellular prion protein regulates beta-secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2007; 104:11062-7.

Parsons CG, Danysz W, Dekundy A, Pulte I. Memantine and cholinesterase inhibitors: complementary mechanisms in the treatment of Alzheimer's disease. **Neurotox Res** 2013; 24:358-69.

Paula-Lima AC, Brito-Moreira J, Ferreira ST. Deregulation of excitatory neurotransmission underlying synapse failure in Alzheimer's disease. **J Neurochem** 2013; 126:191-202.

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

Puzzo D, Privitera L, Leznik E, et al. Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. **J Neurosci** 2008; 28:14537-45.

Pérez M, Ribe E, Rubio A, et al. Characterization of a double (amyloid precursor protein-tau) transgenic: tau phosphorylation and aggregation. **Neuroscience** 2005; 130:339-47.

Qureshi HY, Han D, MacDonald R, Paudel HK. Overexpression of 14-3-3z promotes tau phosphorylation at Ser262 and accelerates proteosomal degradation of synaptophysin in rat primary hippocampal neurons. **PLoS One** 2013; 8:e84615.

Rial D, Piermartiri TC, Duarte FS, Tasca CI, Walz R, Prediger RD. Overexpression of cellular prion protein (PrP(C)) prevents cognitive dysfunction and apoptotic neuronal cell death induced by amyloid- β ($A\beta_{1-40}$) administration in mice. **Neuroscience** 2012; 215:79-89.

Roesler R, Walz R, Quevedo J, et al. Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP(C). **Brain Res Mol Brain Res** 1999; 71:349-53.

Romberg C, Bussey TJ, Saksida LM. Paying more attention to attention: towards more comprehensive cognitive translation using mouse models of Alzheimer's disease. **Brain Res Bull** 2013; 92:49-55.

Rossato JI, Bevilaqua LR, Myskiw JC, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Learn Mem** 2007; 14:36-46.

Santos TG, Beraldo FH, Hajj GN, et al. Laminin- γ 1 chain and stress inducible protein 1 synergistically mediate PrPC-dependent axonal growth via Ca^{2+} mobilization in dorsal root ganglia neurons. **J Neurochem** 2013; 124:210-23.

Santuccione A, Sytnyk V, Leshchyns'ka I, Schachner M. Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59^{fyn} and to enhance neurite outgrowth. **J Cell Biol** 2005; 169:341-54

Schenk D, Barbour R, Dunn W, et al. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. **Nature** 1999; 400:173-7.

Schmitt U, Tanimoto N, Seeliger M, Schaeffel F, Leube RE. Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin. **Neuroscience** 2009; 162:234-43.

Schmued LC, Hopkins KJ. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. **Brain Res** 2000; 874:123-30.

Sebollela A, Freitas-Correa L, Oliveira FF, et al. Amyloid- β oligomers induce differential gene expression in adult human brain slices. **J Biol Chem** 2012; 287:7436-45.

Selkoe DJ. Biochemistry and molecular biology of amyloid beta-protein and the mechanism of Alzheimer's disease. **Handb Clin Neurol** 2008; 89:245-60.

Shankar GM, Li S, Mehta TH, et al. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. **Nat Med** 2008; 14:837-42.

Simonyi A, Schachtman TR, Christoffersen GR. Metabotropic glutamate receptor subtype 5 antagonism in learning and memory. **Eur J Pharmacol** 2010; 639:17-25.

Sui X, Fang Y, Lou H, et al. p53 suppresses stress-induced cellular senescence via regulation of autophagy under the deprivation of serum. **Mol Med Rep** 2015; 11:1214-20.

Thiele C, Hannah MJ, Fahrenholz F, Huttner WB. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. **Nat Cell Biol** 2000; 2:42-9.

Torres-Lista V, Giménez-Llort L. Impairment of nesting behaviour in 3xTg-AD mice. **Behav Brain Res** 2013; 247:153-7.

Um JW, Nygaard HB, Heiss JK, et al. Alzheimer amyloid- β oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons. **Nat Neurosci** 2012; 15:1227-35.

Um JW, Kaufman AC, Kostylev M, et al. Metabotropic glutamate receptor 5 is a coreceptor for Alzheimer $a\beta$ oligomer bound to cellular prion protein. **Neuron** 2013; 79:887-902.

Uversky VN. Mysterious oligomerization of the amyloidogenic proteins. **FEBS J** 2010; 277:2940-53.

Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? **Bioessays** 2004; 26:445-53.

Voigtländer T, Klöppel S, Birner P, et al. Marked increase of neuronal prion protein immunoreactivity in Alzheimer's disease and human prion diseases. **Acta Neuropathol** 2001; 101:417-23.

Walsh DM, Selkoe DJ. Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. **Protein Pept Lett** 2004; 11:213-28.

Wang HY, Lee DH, Davis CB, Shank RP. Amyloid peptide A β (1-42) binds selectively and with picomolar affinity to α 7 nicotinic acetylcholine receptors. **J Neurochem** 2000; 75:1155-61.

Webster SJ, Bachstetter AD, Van Eldik LJ. Comprehensive behavioral characterization of an APP/PS-1 double knock-in mouse model of Alzheimer's disease. **Alzheimers Res Ther** 2013; 5:28.

Webster SJ, Bachstetter AD, Nelson PT, Schmitt FA, Van Eldik LJ. Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. **Front Genet** 2014; 5:88.

Wesson DW, Wilson DA. Age and gene overexpression interact to abolish nesting behavior in Tg2576 amyloid precursor protein (APP) mice. **Behav Brain Res** 2011; 216:408-13.

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.

Wild P, McEwan DG, Dikic I. The LC3 interactome at a glance. **J Cell Sci** 2014; 127:3-9.

Willeumier K, Pulst SM, Schweizer FE. Proteasome inhibition triggers activity-dependent increase in the size of the recycling vesicle pool in cultured hippocampal neurons. **J Neurosci** 2006; 26:11333-41.

Wollert T, Hurley JH. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. **Nature** 2010; 464:864-9.

Xu C, Liu J, Hsu LC, Luo Y, Xiang R, Chuang TH. Functional interaction of heat shock protein 90 and Beclin 1 modulates Toll-like receptor-mediated autophagy. **FASEB J** 2011; 25:2700-10.

Younan ND, Sarell CJ, Davies P, Brown DR, Viles JH. The cellular prion protein traps Alzheimer's A β in an oligomeric form and disassembles amyloid fibers. **FASEB J** 2013; 27:1847-58.

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.

Zhang W, Hao J, Liu R, et al. Soluble A β levels correlate with cognitive deficits in the 12-month-old APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease. **Behav Brain Res** 2011; 222:342-50.

Zou WQ, Zhou X, Yuan J, Xiao X. Insoluble cellular prion protein and its association with prion and Alzheimer diseases. **Prion** 2011; 5:172-8.

**Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética no uso de Animais da
Fundação Antônio Prudente-CEUA/FAP**

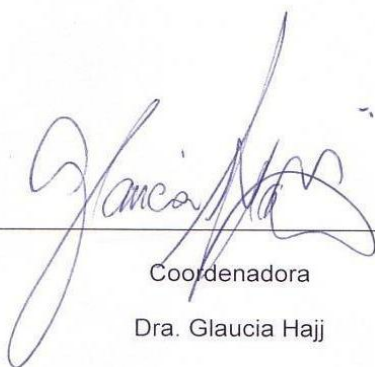


**CEUA/FAP
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA
FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE**

São Paulo, 19 de junho de 2012

Declaro para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa nº 046-10, "O papel da proteína prion celular na regulação da resposta a insulina em condições normais e na doença de Alzheimer", foi apreciado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Antonio Prudente - Hospital A.C. Camargo, em sua reunião de 12 de dezembro de 2010 .

Atenciosamente,



Coordenadora
Dra. Glauca Hajj



A.C. Camargo
Cancer Center

CEUA/FAP
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA
FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE

São Paulo, 21 de outubro de 2013.

A
Dra. Vilma Regina Martins.

Aluna: Bianca Luise Teixeira (Doutorado).

Ref. Projeto de Pesquisa nº 060/13

Título: “Interações proteína príon e seus ligantes ST11 e laminina: implicações na doença de Alzheimer e no câncer”

Prezado(a) Doutor(a):

O projeto de pesquisa acima mencionado, foi apreciado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Antonio Prudente - Hospital A.C. Camargo, em sua reunião extraordinária de 18 de outubro de 2013. Após analisarem as respostas às pendências apontadas em reunião de 20 de setembro de 2013, os membros desta comissão **aprovaram** a realização deste estudo nos moldes apresentados no formulário e projeto de pesquisa encaminhados para análise.

Atenciosamente,

Dra. Glauca N. Hajj
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

The Prion Protein Ligand, Stress-Inducible Phosphoprotein 1, Regulates Amyloid- β Oligomer Toxicity

Valeriy G. Ostapchenko,^{1,2} Flavio H. Beraldo,^{1,2} Amro H. Mohammad,^{1,3} Yu-Feng Xie,^{1,2} Pedro H. F. Hirata,^{1,5} Ana C. Magalhaes,^{1,3} Guillaume Lamour,^{6,7} Hongbin Li,⁶ Andrzej Maciejewski,⁴ Jillian C. Belrose,^{1,3} Bianca L. Teixeira,⁵ Margaret Fahnstock,⁸ Sergio T. Ferreira,⁹ Neil R. Cashman,⁷ Glauca N. M. Hajj,⁵ Michael F. Jackson,^{1,2} Wing-Yiu Choy,⁴ John F. MacDonald,^{1,2,3} Vilma R. Martins,⁵ Vania F. Prado,^{1,2,3} and Marco A. M. Prado^{1,2,3}

¹Robarts Research Institute, Departments of ²Physiology and Pharmacology, ³Anatomy and Cell Biology, and ⁴Biochemistry, The University of Western Ontario, London, Ontario, Canada N6A 5K8, ⁵Department of Molecular and Cell Biology, International Research Center, A. C. Camargo Cancer Center and National Institute for Translational Neuroscience, São Paulo, São Paulo, Brazil, 01508-010, ⁶Chemistry Department and ⁷Brain Research Center, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada V6T 1Z4, ⁸Department of Psychiatry and Behavioural Neurosciences, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada L8S 4K1, ⁹Institute of Medical Biochemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, 21941-590

In Alzheimer's disease (AD), soluble amyloid- β oligomers (A β O) trigger neurotoxic signaling, at least partially, via the cellular prion protein (PrP^C). However, it is unknown whether other ligands of PrP^C can regulate this potentially toxic interaction. Stress-inducible phosphoprotein 1 (STI1), an Hsp90 cochaperone secreted by astrocytes, binds to PrP^C in the vicinity of the A β O binding site to protect neurons against toxic stimuli. Here, we investigated a potential role of STI1 in A β O toxicity. We confirmed the specific binding of A β O and STI1 to the PrP and showed that STI1 efficiently inhibited A β O binding to PrP *in vitro* (IC₅₀ of ~70 nM) and also decreased A β O binding to cultured mouse primary hippocampal neurons. Treatment with STI1 prevented A β O-induced synaptic loss and neuronal death in mouse cultured neurons and long-term potentiation inhibition in mouse hippocampal slices. Interestingly, STI1-haploinsufficient neurons were more sensitive to A β O-induced cell death and could be rescued by treatment with recombinant STI1. Noteworthy, both A β O binding to PrP^C and PrP^C-dependent A β O toxicity were inhibited by TPR2A, the PrP^C-interacting domain of STI1. Additionally, PrP^C-STI1 engagement activated α 7 nicotinic acetylcholine receptors, which participated in neuroprotection against A β O-induced toxicity. We found an age-dependent upregulation of cortical STI1 in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of AD and in the brains of AD-affected individuals, suggesting a compensatory response. Our findings reveal a previously unrecognized role of the PrP^C ligand STI1 in protecting neurons in AD and suggest a novel pathway that may help to offset A β O-induced toxicity.

Introduction

Neuronal dysfunction in Alzheimer's disease (AD) is related to accumulation of soluble oligomers of the amyloid- β peptide (A β O; Lambert et al., 1998; Walsh et al., 2002; Ferreira and Klein, 2011; Mucke and Selkoe, 2012). Interaction of these toxic

particles with several distinct types of receptors in neurons (Wang et al., 2000; Xie et al., 2002; Laurén et al., 2009; Decker et al., 2010) triggers glutamate excitotoxicity, synaptic dysfunction, inhibition of long-term potentiation (LTP), and neuronal death (Querfurth and LaFerla, 2010; Paula-Lima et al., 2013). The exact mechanisms underlying each of these effects are not fully understood, but toxic actions of A β O seem to depend, at least in part, on the cellular prion protein (PrP^C; Laurén et al., 2009; Gimbel et al., 2010; Bate and Williams, 2011; Kudo et al., 2012).

PrP^C is a master regulator of cellular signaling (Martins et al., 2010), likely by scaffolding distinct ligands and neuronal transmembrane receptors (Linden et al., 2008; Beraldo et al., 2010, 2011; Santos et al., 2013). Interaction of A β O with the PrP^C region comprising amino acid residues 95–105 appears critical for neuronal toxicity (Laurén et al., 2009; Chung et al., 2010; Barry et al., 2011; Freir et al., 2011). Accordingly, disrupting A β O binding to PrP^C seems to alleviate PrP^C-dependent A β O toxicity. For example, antibodies targeting PrP^C prevent synaptic plasticity deficits induced by A β O (Chung et al., 2010; Barry et al., 2011; Freir et al., 2011). However, PrP^C antibodies can lead to toxicity by triggering neuronal signaling (Solforosi et al., 2004).

Received July 29, 2013; revised Sept. 3, 2013; accepted Sept. 7, 2013.

Author contributions: V.G.O., F.H.B., J.F.M., V.R.M., V.F.P., and M.A.M.P. designed research; V.G.O., F.H.B., A.H.M., Y.-F.X., P.H.F.H., A.C.M., G.L., B.L.T., and G.N.M.H. performed research; A.M., J.C.B., M.F., S.T.F., N.R.C., and W.-Y.C. contributed unpublished reagents/analytic tools; V.G.O., F.H.B., A.H.M., Y.-F.X., P.H.F.H., A.C.M., G.L., H.L., G.N.M.H., M.F.J., W.-Y.C., J.F.M., V.R.M., V.F.P., and M.A.M.P. analyzed data; V.G.O., V.F.P., and M.A.M.P. wrote the paper.

This work was supported by the Alzheimer's Association, PrioNet-Canada, Canadian Institutes of Health Research Grant MOP 93651, São Paulo State Foundation (FAPESP) Grants 2009/14027-2 (V.R.M.) and 2012/04370-4 (G.N.M.H.), National Institute for Translational Neuroscience, Canadian Foundation for Innovation, and Ontario Research Fund. A.H.M. and A.M. were recipients of Master's Program Ontario Graduate Scholarship. B.L.T. received an FAPESP fellowship. We thank PrP⁵, a PrioNet-Canada facility, and David Wishart for the gift of PrP 112-231.

The authors declare no competing interests.

Correspondence should be addressed to Dr. Marco A.M. Prado, Robarts Research Institute, 100 Perth Drive, London, Ontario, Canada N6A 5K8. E-mail: mprado@robarts.ca.

M.F. Jackson's present address: Department of Pharmacology and Therapeutics, Kleysen Institute for Advanced Medicine, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada R3E 0T6.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.3214-13.2013

Copyright © 2013 the authors 0270-6474/13/3316552-13\$15.00/0

Therefore, endogenous physiological ligands of PrP^C may provide an alternative means of modulating A β O-induced toxicity.

Stress-inducible phosphoprotein 1 (STI1) is a cochaperone secreted by astrocytes that can interact with and signal via PrP^C (Zanata et al., 2002; Lopes et al., 2005; Lima et al., 2007; Caetano et al., 2008; Roffé et al., 2010; Hajji et al., 2013). STI1 binds to PrP^C at residues 113–128 (Chiarini et al., 2002; Zanata et al., 2002), adjacent to the A β O binding site, leading to reciprocal conformational changes in both proteins (Romano et al., 2009). Extracellular STI1 forms a signaling complex with PrP^C in hippocampal neurons that promotes calcium influx through α 7 nicotinic acetylcholine receptors (α 7nAChR; Beraldo et al., 2010). This in turn triggers several signaling pathways that protect neurons from apoptosis (Lopes et al., 2005; Caetano et al., 2008; Beraldo et al., 2010; Roffé et al., 2010). Importantly, both PrP^C and α 7nAChR are recognized targets of A β peptides (Wang et al., 2000, 2009; Magdesian et al., 2005; Laurén et al., 2009; Um et al., 2012). Interestingly, recent system biology approaches have implicated differential expression of the *STI1* gene (*STIP1*) in AD (Zhang et al., 2013). Moreover, a loss-of-function STI1 mutation increases Tau toxicity in a fly model of tauopathy (Ambegaokar and Jackson, 2011).

Here, we provide evidence supporting a role for STI1-regulated pathways in AD. We find that STI1 inhibited A β O binding to PrP and to cells expressing PrP^C. In addition, toxic effects mediated by A β O could be prevented by STI1 in a PrP^C and α 7nAChR-dependent way. Our results suggest that altered levels of STI1 in individuals with AD may influence A β O-induced neuronal toxicity.

Materials and Methods

Mouse lines. Genetically modified *STI1*^{-/-} mice were generated by standard homologous recombination techniques (Prado et al., 2006), using C57BL/6j ES cells, as described previously (Beraldo et al., 2013). In mammals, elimination of STI1 causes early embryonic lethality; hence, *STI1*^{-/+} neurons were used here (Beraldo et al., 2013). *Prnp*^{-/-} mice in a C57BL/6j background were kindly donated by Dr. Frank Jirik (University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada) (Tsutsui et al., 2008). APP^{swe}/PS1^{DE9} (Jankowsky et al., 2001) and α 7nAChR^{-/-} (Orr-Urtreger et al., 1997) mice in a C57BL/6j background were obtained from The Jackson Laboratory. Procedures were conducted in accordance with approved animal use protocols at the University of Western Ontario (2008/127) and the A. C. Camargo Hospital (037/09) following Canadian Council of Animal Care and National Institutes of Health guidelines.

Preparation of proteins and peptides. Recombinant mouse PrP with an N-terminal His tag was produced in *Escherichia coli* strain BL21(DE3). For this, bacteria were transformed with pRSET/PrP plasmid DNA kindly provided by Prof. Kurt Wüthrich (ETH Zürich, Zürich, Switzerland). PrP was expressed in inclusion bodies that were solubilized in 8 M urea and 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, and purified using Ni²⁺-affinity chromatography. After that, PrP was refolded by dialysis against 10 mM NaOAc, 10 mM 2-mercaptoethanol, and 1 mM EDTA, pH 5.0, and stored for <10 d at 4°C. Recombinant mouse PrP(112–231) peptide was provided by the PrP⁵ PriNet facility (University of Alberta, Edmonton, Canada). Recombinant STI1 was produced as a (His)₆-SUMO-tag-fused protein by cloning STI1 cDNA into pE-SUMO vector (Lifesensors) and transforming *E. coli* strain BL21(DE3) with the obtained pE-SUMO-STI1 plasmid DNA. After initial purification using Ni²⁺-affinity chromatography, the (His)₆-SUMO tag was cleaved off using SUMO Pro enzyme (Lifesensors), and untagged STI1 was obtained by a second Ni²⁺-affinity purification step. Pure STI1 was stored for less than a week at 4°C or fast-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for 1–2 months. TPR2A and its 230–245 amino acid deletion variant (TPR2A Δ _{230–245}) were produced as N-terminal His-tag constructs in *E. coli* strain BL21(DE3) transformed with pDEST17 vector (Invitrogen) containing the correspondent gene. After cleavage with His-TEV protease, (His)₆ tag and the protease were removed by Ni²⁺-affinity purification, and the untagged peptides were stored for <10 d at 4°C. Quality of protein

preparations, including Hsp90 (Cayman Chemical) and lysozyme (Sigma-Aldrich), was routinely checked using 4–20% SDS-PAGE gels (Lonza) stained for protein bands with RapidStain reagent (EMD Millipore), which allows 100 ng resolution. Circular dichroism (CD) spectra measured as described previously (Ostapchenko et al., 2008) were used to assess the quality of recombinant proteins. The presence of lipopolysaccharides in protein preparations was tested using ToxinSensor Endotoxin Assay Kit (GenScript); no more than 0.2 endotoxin units (EU) of *E. coli* endotoxin equivalent was present in our preparations. A β O were prepared from A β _{1–42} peptide (rPeptide) similarly to a previously described procedure (Caetano et al., 2011). Briefly, the peptide was monomerized in hexafluoroisopropanol, dried in a SpeedVac centrifuge, restored in DMSO to 1 mM solution, and diluted in PBS (CD and LTP experiments) or F-12 medium (all other experiments) to the final concentration of 100 μ M (hereafter monomer concentration used as A β O concentration). After incubation for 24 h at 4°C, A β O were cleared by centrifugation when needed and either used immediately or stored at -80°C for no more than a few weeks. Peptide preparation quality was checked by several methods. Western blot with 6E10 (1:2000; Covance) antibody was done by a standard technique after peptide separation on 13.5% Tris-tricine SDS-PAGE and electrotransfer to polyvinylidene difluoride membrane. CD spectra were obtained from 25 μ M A β O using a J810 spectropolarimeter (Jasco) equipped with a 1 mm cuvette, with five scans averaged for each resulting spectra. Size-exchange chromatography was done using ÄKTA-FPLC (GE Healthcare) equipped with a Superdex 75 column (GE Healthcare) following the procedure described previously (Larson et al., 2012). For atomic force microscopy (AFM), A β O preparations were diluted to 0.1 μ M, deposited on a freshly cleaved piece of mica for 10 min, and dried under a nitrogen stream. Images were acquired in tapping mode using a Cypher AFM (Asylum Research) mounted with silicon tips (AC160TS; from Olympus; nominal spring constant of 40 N/m). Section analyses were performed using the AFM software to determine the height of the species imaged. Their corresponding molecular weight was determined via a calibration curve describing the AFM heights of proteins of known molecular weight. Scrambled A β _{1–42} peptide (rPeptide) was prepared following the same procedure as for the A β O preparation.

Surface plasmon resonance. Surface plasmon resonance (SPR) experiments were performed using the Biacore X system (GE Healthcare) equipped with either a nitrilotriacetic acid (NTA) or CM5 sensor chip. The NTA chip was first charged with nickel ions and then uniformly covered with either PrP or STI1 bearing (His)₆ tags with SPR signal of ~10,000 resonance units (RU). The CM5 chip was prepared by a standard amine-coupling procedure (Fischer, 2010). All ligands were injected in 25 mM HEPES, 150 mM NaCl, and 10 mM imidazole, pH 7.0, at 5 μ l/min, and on-kinetics were registered for 6 min. After each injection, off-kinetics were followed for 2 min. The chip surface was regenerated between injections by a short injection of 10 mM HCl. SPR curves for STI1 and A β O binding to PrP were analyzed using a simple bimolecular binding model with GraphPad Software Prism linear (for initial binding rates), exponential decay (for off-kinetics), and “one-site binding” (to determine RU_{max} and K_D from the Langmuir equation for the STI1-PrP complex) regressions (Balducci et al., 2010).

A β O binding to cells. HEK293T cells were transfected with pH-sensitive GFP-PrP^C vector (pHFP-PrP^C) using a modified calcium phosphate method as described previously (Caetano et al., 2011). pHFP-PrP^C was generated on the basis of pEGFP-PrP^C vector (Lee et al., 2001) with GFP nucleotide sequence exchanged for that of pHFP (pHluorin; Miesenbock et al., 1998). Fluorescent A β O were prepared from HiLyte Fluor 555-tagged A β _{1–42} (Anaspec) following the procedure described above. Three hundred nanomolar HiLyte Fluor 555-A β O alone or mixed with 500 nM STI1 or 1000 nM TPR2A were added to cultures for 15 min, after which cells were washed with Krebs-Ringer-HEPES (KRH) buffer (in mM: 50 HEPES, 115 NaCl, 5.9 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, and 10 glucose, pH 7.4) and immediately imaged on a LSM510 confocal microscope (Carl Zeiss) equipped with a 63 \times /1.4 numerical aperture (NA) oil-immersion objective. Data were collected from at least eight images taken for each treatment in three independent experiments. Bound HiLyte Fluor 555-A β O was quantified for at least 20 cells for each experimental condition as mean fluorescence per cell area and normalized to nontransfected cells using NIH ImageJ software.

Primary cultures of hippocampal neurons from E17 mouse embryos were obtained as described previously (Beraldo et al., 2013). Neuronal cultures hereafter were derived from embryos of either sex. Cultures were maintained on poly-lysine-coated coverslips in Neurobasal medium with 2% B-27 supplement (Invitrogen). On day 4, cytosine arabinoside (2 μ M; Sigma) was added to prevent astrocyte growth. Half of the culture medium was changed every 2–3 days. On day 15, neurons were treated for 15 min with 200 nM A β O alone or mixed with 500 nM ST11, washed with KRH buffer (in mM: 125 NaCl, 5 KCl, 5 HEPES, 2.6 MgSO₄, and 10 glucose, pH 7.2). For γ -tubulin and A β O immunostaining, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min, permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS for 5 min, and blocked with 5% BSA (Sigma) in PBS for 1 h. After that, coverslips were incubated with anti- γ -tubulin (1:500; Abcam) and 6E10 (against amyloid- β 1–16 epitope; 1:350; Covance) antibodies overnight at 4°C, followed by secondary Alexa Fluor-488 (for γ -tubulin) and Alexa Fluor-633 (for A β O) antibodies (Invitrogen) for 1 h at 4°C. For colocalization analysis, the PrP antibody 8H4 (epitope 145–180; Abcam) and 6E10 antibodies were labeled with Alexa Fluor-488 and Alexa Fluor-633, respectively, using Zenon Mouse Labeling Kit (Invitrogen). Briefly, 1 μ g of each primary antibody was incubated at room temperature for 5 min with 5 μ l of the corresponding Zenon coupling reagent, after which the reaction was stopped by 5 min incubation with the blocking reagent. Labeled antibodies were diluted immediately in KRH buffer (1:350 for both antibodies), added to neurons treated with A β O, A β O/ST11, or vehicle, as described above, and incubated for 30 min at 37°C. Subsequently, cultures were washed with KRH buffer and imaged on an LSM510 confocal microscope equipped with a 63 \times /1.4 NA oil-immersion objective or a SP5 II confocal microscope (Leica) equipped with a 63 \times /1.47 NA oil-immersion objective. A β O, γ -tubulin, and PrP^C were quantified in at least three independent experiments. At least five Z-stack images were taken randomly from each coverslip representing a single treatment of neurons derived from a single embryo, and the corresponding fluorescence was integrated using NIH ImageJ software. Neurites from at least 20 cells were analyzed with cell bodies excluded from the quantification. A β O–PrP^C colocalization was determined as percentage of A β O fluorescence volume colocalized with PrP^C fluorescence using the NIH ImageJ colocalization plug-in.

Expression of synaptophysin. For these experiments, primary cultured hippocampal neurons were obtained as indicated previously (Roffé et al., 2013). Cytosine β -D-arabinofuranoside at 1 μ M was added on day 2, and cultures were maintained with no media replacement. On day 20, cells that were preincubated with or without 100 nM ST11 for 30 min and were treated with 500 nM A β O for 1 or 4 h unless otherwise indicated. For Western blots, cells were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris-Cl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, and 0.1% SDS) and analyzed by SDS-PAGE, followed by transfer to PVDF membrane and blotting with anti-synaptophysin (1:10,000; Santa Cruz Biotechnologies) and anti-GAPDH (1:1000; Sigma) antibodies. For immunofluorescence, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min, permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 5 min, and blocked with 5% BSA (Sigma) in PBS for 1 h. Anti-synaptophysin (1:100; Santa Cruz Biotechnologies) diluted in 1% BSA in PBS was added for 1 h, followed by anti-mouse Alexa Fluor-488 (1:1000; Invitrogen) for 1 h. Twenty images were analyzed per experiment with the NIH ImageJ histogram tool in at least three independent experiments for each experimental treatment, using a Nikon TE2000 microscope in epifluorescence mode. Images taken from cells labeled with secondary antibody only were used to set the threshold for the experiment. Cell bodies were excluded from the analysis.

Electrophysiology in hippocampal tissue slices. Field EPSPs (fEPSPs) were recorded from hippocampal slices derived from wild-type mice that were between 21- and 30 d-old as described previously (Martyn et al., 2012). Slices were pretreated for 15–30 min with or without 0.5 or 1 μ M ST11, followed by 30–60 min treatment with vehicle or 1 μ M A β O. No difference was observed between these two time points and protein concentrations used, and, therefore, the results of these experiments were pooled together.

Cell death and viability assays for A β O. Neuronal cultures (1 \times 10⁵ cells per 16 mm dish) were prepared as described previously (Beraldo et

al., 2013). On day 11, neurons were treated with different proteins or peptides for 48 h. Cell death was evaluated using the LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells (Invitrogen) as per the instructions of the manufacturer. Eight images from random fields containing at least 300 cells were taken for each experimental treatment of neurons prepared from at least five embryos on an LSM-510 confocal microscope equipped with 10 \times /0.45 NA objective and appropriate filters. Live (calcein-stained, green channel) and dead (ethidium-stained, red channel) cell counting was done using NIH ImageJ Cell Counter plug-in and calculated as percentage of dead cells [(number dead cells / (number of dead cells + viable cells) \times 100)]. For the lactate dehydrogenase (LDH) release assay, neuronal cultures were prepared in the same way but using phenol red-free medium. LDH release in cultured media was analyzed with LDH Activity Assay kit (Sigma) following the instructions of the manufacturer. For this, cultured media (400 μ l in a 16 mm dish) were concentrated to 100 μ l using Nanosep 10K centrifugal devices (Pall Life Sciences) and mixed with 200 μ l of LDH substrate mix. After 30 min incubation, LDH activity was measured by OD₄₅₀ on an iMark Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad) and normalized to total protein concentration in the samples.

Cell death and viability assay for staurosporine. Neuronal cultures (1 \times 10⁵ cells per 16 mm dish) from wild-type or α 7nAChR^{-/-} mice were prepared as described above. Primary hippocampal neurons were treated with staurosporine (50 nM) in the presence or absence of 1 μ M ST11 for 16 h as described previously (Beraldo et al., 2010). The cell death assay was performed using LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit as described above. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay (Sigma) was conducted according to the protocol of the manufacturer. MTT stock solution (5 mg/ml) was added to hippocampal neurons as 1/10 of the culture medium volume and incubated for 4 h. After that, the medium was removed, and cells were solubilized with isopropanol/0.1 N HCl, after which absorbance of reduced dye was measured at 570 nm with background subtraction at 650 nm.

Calcium signaling. Primary hippocampal neurons were obtained as described for experiments with A β O binding, and calcium imaging was performed as described previously (Beraldo et al., 2010), by loading neurons with either 10 μ M fura-2 AM for 40 min or 5 μ M Fluo-4 AM (Invitrogen) for 30 min at 37°C in Neurobasal medium supplemented with 1 mM CaCl₂. For fura-2 AM experiments, data acquisition was performed using a DMI6000 B microscope (Leica) equipped with a 40 \times /0.75 NA dry objective and 340 nm/380 nm (excitation) and 510 nm (emission) filters. Fluorescence ratio (340/380) was normalized using Leica AF6000 software. For Fluo-4 AM, data acquisition was performed on an LSM-510 confocal microscope with excitation at 488 nm and emission at 505–530 nm. Fluorescence was normalized as F₁/F₀ (in which F₁ is maximal fluorescence and F₀ is basal fluorescence). For each experimental condition, at least three different neuronal cultures from independent pups were used, and 30–40 cells were analyzed.

Human postmortem brain tissue. Parietal cortical tissues from age- and sex-matched controls (n = 6, 3 females and 3 males) and AD-affected individuals (n = 6, 3 females and 3 males) were provided by the Institute for Brain Aging and Dementia Tissue Repository/University of California, Irvine. AD diagnosis was confirmed by pathological and clinical criteria (McKhann et al., 1984; Khachaturian, 1985; Michalski and Fahnstock, 2003). Cortical samples were homogenized in RIPA buffer supplemented with protease inhibitor cocktail III (Calbiochem). ST11 levels were analyzed by SDS-PAGE, followed by Western blot analysis with anti-recombinant mouse ST11 antibody raised in rabbits (Zanata et al., 2002; Beraldo et al., 2013; purified IgG, 0.2 μ g/ml, generated by Bethyl Laboratories) using β -actin levels as a control.

Mouse brain tissue. Cortical tissues from APP^{swE}/PS1^{dE9} or wild-type control male mice were collected and homogenized in RIPA buffer as described above. ST11 levels were analyzed by SDS-PAGE, followed by Western blot analysis with rabbit anti-ST11 antibody (Zanata et al., 2002; Beraldo et al., 2013) using β -actin levels as a control.

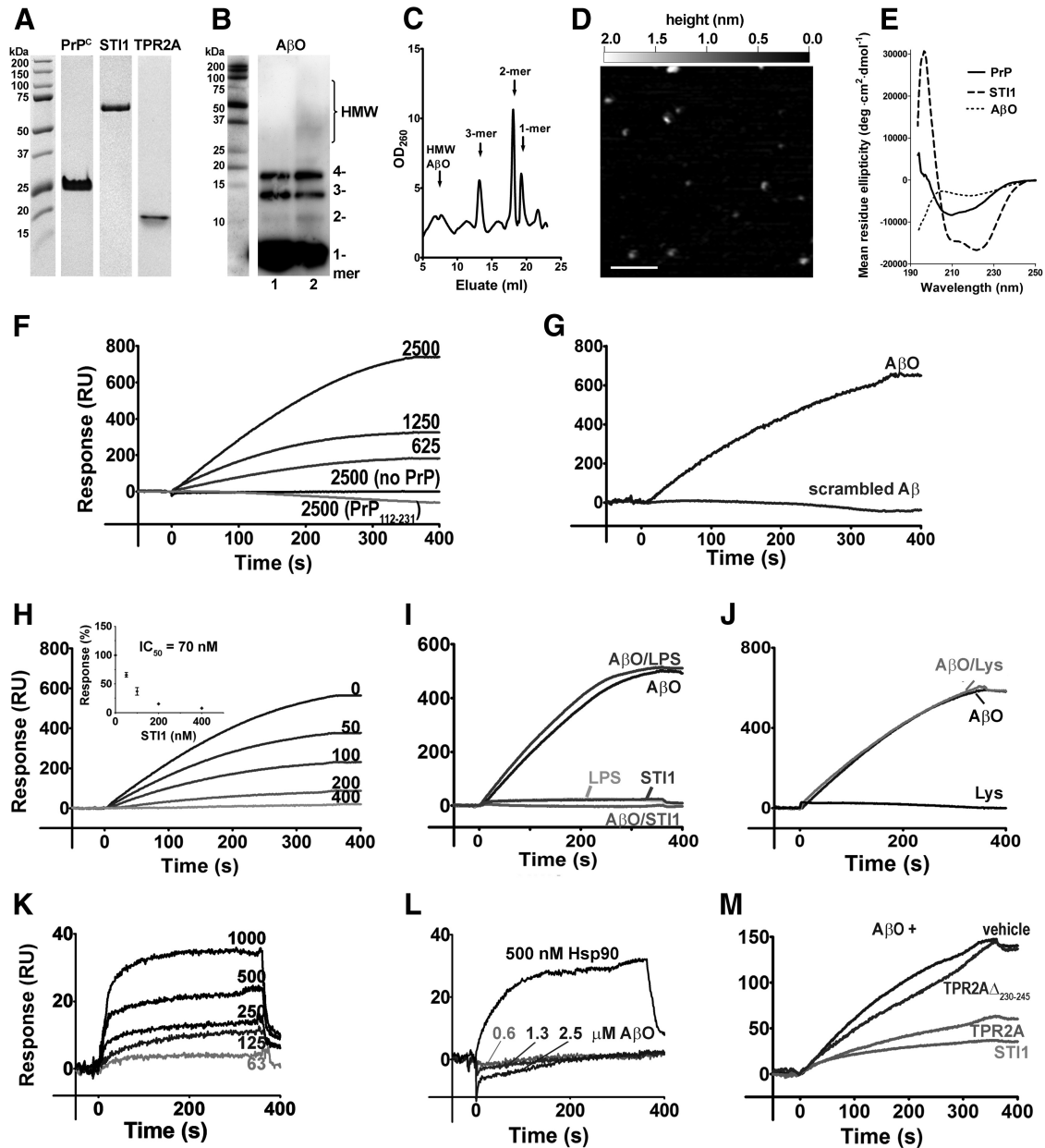


Figure 1. SPR studies of A β O binding to PrP. **A–E**, Characterization of protein and peptide preparations performed as described in Materials and Methods. **A**, SDS-PAGE analysis of recombinant proteins. **B**, Western blot of A β O preparation with 6E10 antibody. Lane 1, Freshly prepared A β O; lane 2, 1 μ M A β O after 48 h incubation in Neurobasal medium/2% B-27 at 37°C. **C**, Size-exchange chromatogram of A β O; peaks for A β _{1–42} monomers, dimers, and trimers and HMW aggregates are shown by arrows. **D**, A representative AFM image of A β O preparations showing monomers (~0.3 nm high), dimers/trimers/tetramers (0.6–1.0 nm high), and a few HMW aggregates (>1 nm high). Scale bar, 100 nm. **E**, CD spectra of recombinant proteins and A β O. **F–M**, SPR kinetics. **F**, Binding of A β O (nanomolar) to full-length PrP and to its N-terminal mutant PrP(112–231) on an NTA chip. **G**, Binding of scrambled A β and A β O (both 2.5 μ M) to PrP. **H**, Binding of A β O (2.5 μ M) to PrP in the presence of increasing concentrations of ST11 (nanomolar). Inset shows an inhibition curve for A β O binding to PrP obtained in multiple experiments (errors are smaller than symbols). **I**, Similar to **H**, but experiments were done in the presence of 0.2 EU *E. coli* endotoxin (amount detected in recombinant ST11). **J**, Similar to **H**, but experiments were done in the presence of 500 nM lysozyme. **K**, Binding of ST11 (nanomolar) to PrP immobilized on a CM5 chip. **L**, Binding of A β O and Hsp90 to ST11 immobilized on a CM5 chip. **M**, Effects of TPR2A (1 μ M) and TPR2A Δ _{230–245} (1 μ M) on A β O (2.5 μ M) binding to PrP. SPR data are representative of at least three independent experiments.

Results

ST11 prevents A β O binding to PrP^C

A β O and ST11 bind to adjacent regions of PrP^C, to residues 95–105 (Laurén et al., 2009) and 113–128, respectively (Zanata et al., 2002). To determine whether binding of these two PrP^C ligands can occur simultaneously or whether they are mutually exclusive, we used SPR. We optimized standard procedures to obtain highly pure recombinant proteins (>95% according to SDS-PAGE analysis; Fig. 1A) and to produce well defined A β O with substantial presence of low-order oligomers (Townsend et

al., 2006; Hung et al., 2008; Larson et al., 2012; Figueiredo et al., 2013). Western blot analysis of A β O preparations showed 5–10% low-molecular-weight oligomers (2-, 3-, 4-mers) along with small amounts of higher-molecular-weight (HMW) components but no fibrils (Fig. 1B). Importantly, the size-exclusion chromatography profile of these oligomers was similar to that of AD brain-derived amyloid- β species (Larson et al., 2012) and contained peaks corresponding to monomers, dimers, and trimers, with small amounts of HMW A β O (Fig. 1C). AFM analysis confirmed the abundance of low-order oligomers in our A β O prep-

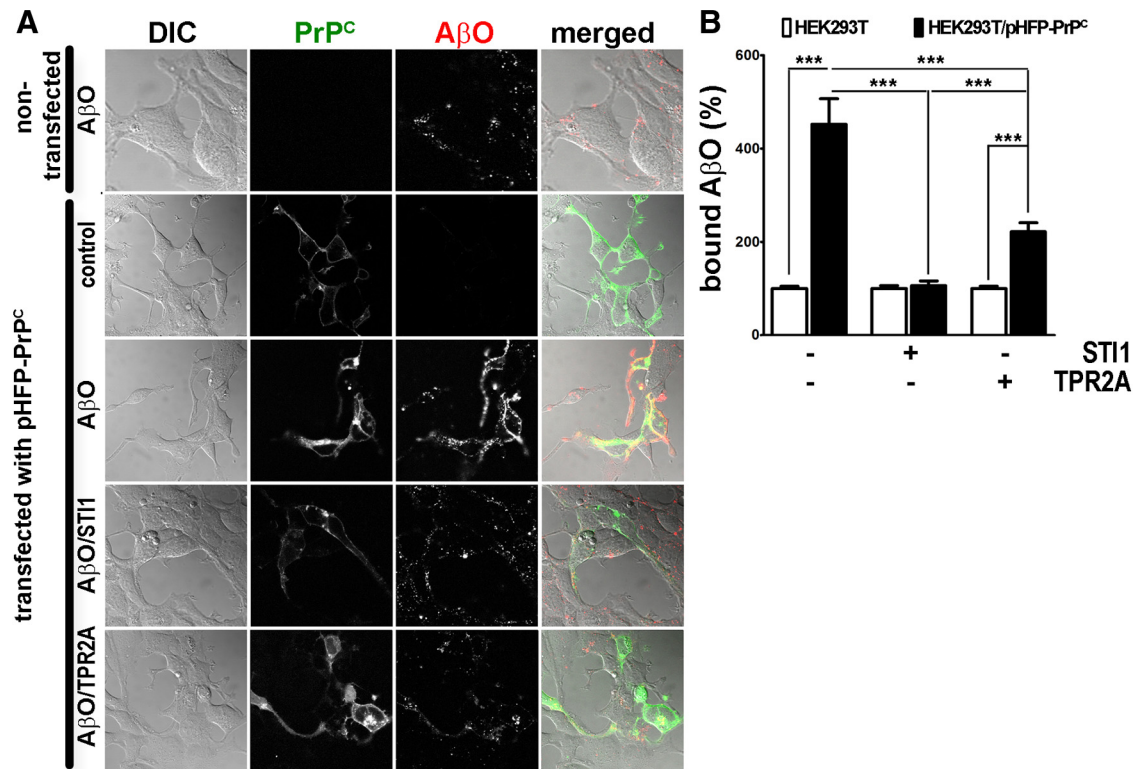


Figure 2. STI1 and TPR2A inhibit A β O binding to HEK293T cells expressing pHFP-PrP^C. **A**, Representative images of HEK293T cells in differential interference contrast (DIC) channel (column 1), green channel (pHFP fluorescence, column 2), red channel (HiLyte Fluor 555-A β O fluorescence, column 3), and merged (column 4). Row 1 shows nontransfected cells, and rows 2–5 show cells transfected with pHFP-PrP^C in the absence (row 2) or presence (row 3) of A β O, A β O premixed with 500 nM STI1 (row 4) or 1 μ M TPR2A (row 5). **B**, Quantification of data from **A**. Total A β O bound to pHFP-PrP^C-transfected cells was normalized by cell size and by the amount of A β O bound to nontransfected cells. Data collected from at least 20 cells in three independent experiments were analyzed with one-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test. ****p* < 0.001.

ation, represented as 0.3–1 nm high round dots and a small amount of larger dots with their height (>1 nm) corresponding to HMW A β O (Fig. 1D). In addition, CD measurements demonstrated β -sheet structure in oligomer preparations and showed characteristic spectra for recombinant PrP (Ostapchenko et al., 2008) and STI1 (Romano et al., 2009; Fig. 1E).

Initial experiments demonstrated that A β O binds specifically to PrP in a dose-dependent manner (Fig. 1F, G). We used a simple bimolecular binding model to analyze SPR data and estimate kinetic constants of A β O-PrP binding. Considering that dimers and trimers, the main PrP-binding species in this preparation, represent ~9% of the A β O in our preparation, we estimated $K_D = 15$ nM, with $k_{on} = 3500$ M⁻¹ s⁻¹ and $k_{off} = 5.4 \times 10^{-5}$ s⁻¹, which is consistent with previous studies (Balducci et al., 2010). Of note, approximating off-kinetics with exponential decay gave a high error estimate in the k_{off} measurement (~50%), probably attributable to the fact that SPR signal noise and thermal drift magnitude were of the same order as the total SPR signal change during off-kinetics. Consequently, the calculated K_D , as k_{off}/k_{on} , fell in the range of 7–30 nM. PrP lacking the N-terminal region [PrP(112–231)] was unable to interact with A β O (Fig. 1F). As a control, scrambled A β did not bind to full-length PrP (Fig. 1G).

Recombinant STI1 impaired the binding of A β O to immobilized PrP with an IC₅₀ of ~70 nM (Fig. 1H). To ensure absence of nonspecific effects, we determined the binding of A β O premixed with either lipopolysaccharide (amount equivalent to that present in 500 nM recombinant STI1; Fig. 1I) or an irrelevant protein (500 nM lysozyme; Fig. 1J) to PrP. Neither of them altered A β O binding to PrP. STI1 showed dose-dependent binding to

PrP (Fig. 1K) with $K_D = 550 \pm 150$ nM, $k_{on} = 2.0 \pm 0.6 \times 10^5$ M⁻¹ s⁻¹, and $k_{off} = 11.0 \pm 0.6 \times 10^{-2}$ s⁻¹. The measured K_D value is in the same order of magnitude of values determined using different methodologies (Zanata et al., 2002; Romano et al., 2009). A β O did not interact directly with STI1, although STI1 was able to interact with Hsp90 as a positive control under the same conditions (Fig. 1L). The TPR2A domain of STI1 (containing PrP^C binding motif amino acids 230–245) decreased binding of A β O to PrP (IC₅₀ of ~300 nM), whereas TPR2A $\Delta_{230-245}$, which lacks the PrP binding site, had no effect (Fig. 1M). Together, these results suggest that STI1 interferes with A β O-PrP binding by impairing A β O binding to PrP and not because of a direct interaction between STI1 and A β O.

STI1 prevents A β O binding to cells expressing PrP^C

To investigate whether STI1 affects A β O binding to PrP^C on membranes of living cells, we initially used HEK293T cells. A β O bound only marginally to nontransfected cells, whereas HEK293T cells expressing pHFP-PrP^C displayed abundant coating with A β O (Fig. 2A, B). In the presence of 500 nM STI1, A β O binding to pHFP-PrP^C-transfected HEK293T cells was significantly decreased (Fig. 2A, B). TPR2A (1 μ M) also decreased A β O binding to cells (Fig. 2A, B).

In cultured hippocampal neurons, A β O binding showed a punctate pattern mainly localized to neurites (Fig. 3A, C) as described previously (De Felice et al., 2007, 2009). As observed in HEK293T cells, A β O binding to hippocampal neurons in culture was significantly decreased by STI1 when compared with cells treated with vehicle (Fig. 3A–D). Additionally, colocalization

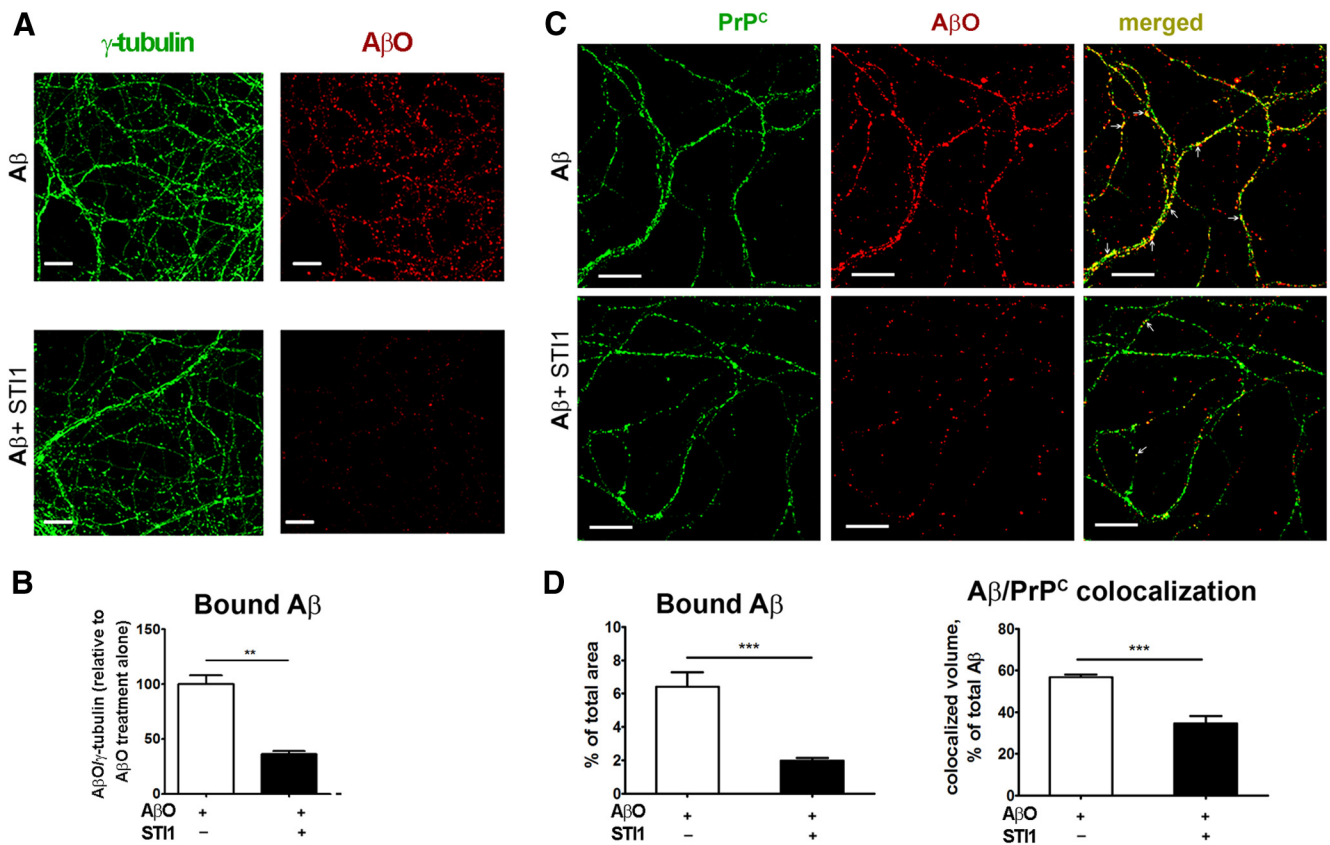


Figure 3. ST11 decreases A β O binding to PrP^C in hippocampal neuronal cultures. **A**, Representative images showing γ -tubulin (left column) and A β O (right column) staining of 15 d *in vitro* neurons treated with A β O (top row) or A β O/ST11 mix (bottom row) as described in Materials and Methods. **B**, Quantification of **A**. The amount of bound A β O was normalized by γ -tubulin levels and presented relative to the treatment with A β O alone. **C**, Representative images showing PrP^C (left column), A β O (middle column), and merged (right column) staining of 15 d *in vitro* neurons treated with A β O (top row) or A β O/ST11 mix (bottom row) as described in Materials and Methods. White arrows indicate colocalized staining. **D**, Quantification of **C**. Bound A β O was quantified as percentage of image area. Colocalization with PrP^C was quantified as described in Materials and Methods. Scale bars, 10 μ m. Data were collected from at least three independent experiments from neurites of at least 25 cells for each condition and analyzed with Student's *t* test. ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

analysis indicated that ~50% of A β O puncta were colocalized with PrP^C (Fig. 3C,D). In the presence of ST11, colocalization between A β O puncta and PrP^C was significantly decreased in hippocampal neurons (Fig. 3C,D).

ST11 prevents A β O-induced synaptic loss

A β O treatment of human brain tissue downregulates several genes involved in synaptic transmission, including synaptophysin (Sebollela et al., 2012). Moreover, A β O elicit PrP^C-dependent synaptic loss (Um et al., 2012). Treatment of hippocampal neurons in culture with A β O for 60 min led to a decrease in synaptophysin levels (Fig. 4A–C). In contrast, exposure of hippocampal neurons to ST11 (100 nM) increased the levels of synaptophysin (Fig. 4B,C). In the presence of ST11, the toxic effect of A β O on synaptophysin levels was prevented (Fig. 4B,C). Importantly, neither A β O or ST11 altered the levels of synaptophysin in hippocampal neurons cultured from *Prnp*^{-/-} embryos (Fig. 4D), indicating that these effects of A β O and ST11 depend on the presence of PrP^C.

ST11 rescues A β O-induced inhibition of LTP in hippocampal slices

It has been shown that impairment of LTP in hippocampal slices by A β O is mediated by PrP^C (Laurén et al., 2009; Barry et al., 2011; Freir et al., 2011). Our results indicate that A β O, but not a preparation of scrambled A β , decreased LTP at Schaffer collater-

al–CA1 synapses (Fig. 5A, B). When slices were previously treated with ST11 (0.5–1 μ M), before being exposed to A β O (1 μ M), no decrease in LTP was observed, suggesting that treatment with ST11 prevents A β O-induced LTP inhibition (Fig. 5C,D). Interleaved recordings from control slices treated with A β O alone confirmed the neurotoxic potency of A β O in these experiments, whereas ST11 alone did not modify LTP (data not shown).

ST11 protects neurons against cellular injury induced by A β O

It has been shown that A β O cause neuronal cell death in a PrP^C-dependent manner (Resenberger et al., 2011; Kudo et al., 2012). Corroborating this observation, we showed that wild-type but not *Prnp*^{-/-} cultured hippocampal neurons displayed decreased viability, measured using the LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity assay, when exposed to 1 μ M A β O for 48 h (Fig. 6A). Of note, incubation of A β O in culture medium did not produce measurable amounts of fibrils or prefibrillar aggregates (Fig. 1B), arguing that the observed toxicity is caused by low-molecular-weight A β species. Next, we checked whether levels of endogenous ST11 could influence the neurotoxic effect of A β O. *ST11*^{-/+} neurons, shown previously to have 50% of wild-type ST11 protein levels (Beraldo et al., 2013), presented increased sensitivity to A β O exposure (Fig. 6B–D). Treatment of cultured neurons with ST11 prevented the toxic effects of A β O in both ST11 mutant and wild-type neurons (Fig. 6B,D). Neither ST11 by itself nor scrambled A β had any effect on neuronal viability (Fig. 6B,D). More-

over, treatment of cultured neurons with TPR2A, the PrP^C binding domain of ST11, also decreased the toxicity of A β Os (Fig. 6E). We also used LDH release as an indicator of cell death. Treatment with recombinant ST11 rescued neuronal death induced by A β Os in both genotypes, confirming the results obtained with the LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity assay (Fig. 6F). In these experiments A β O-induced LDH release appeared higher in *ST11*^{-/+} neurons, but this difference failed to reach statistical significance (Fig. 6F). Together, our results indicate that ST11 decreases the binding of A β Os to PrP^C and prevents several toxic activities of A β Os in hippocampal neurons.

ST11 induces intracellular Ca²⁺ increase and neuronal protection via α 7nAChRs

We demonstrated previously that PrP^C forms a biochemical and functional complex with α 7nAChRs and that signaling and neuronal protection by ST11 was blocked by α -bungarotoxin, a selective α 7nAChR-specific antagonist (Beraldo et al., 2010). A β _{1–42} has been shown to interact with α 7nAChRs (Wang et al., 2000; Magdesian et al., 2005; Snyder et al., 2005), which is thought to play an important role in AD (Hernandez and Dineley, 2012). To test whether neuroprotection by ST11 might involve α 7nAChRs, we cultured neurons from *\alpha*7nAChR^{-/-} mice and investigated the effect of ST11. We used neurons labeled with either fura-2 or Fluo-4 in independent experiments and found that Ca²⁺ increase induced by ST11 was abolished in *\alpha*7nAChR^{-/-} neurons (Fig. 7A–E). Moreover, the TPR2A peptide also increased intracellular Ca²⁺ in an α 7nAChR-dependent way.

Neuroprotection by ST11 against apoptosis induced by staurosporine (100 nM) was observed in wild-type neurons but not in *\alpha*7nAChR^{-/-} neurons, as determined by either the MTT reduction assay or the LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity assay (Fig. 7F, G). Similarly to wild-type neurons, A β Os induced ~15–20% increase in cell death in *\alpha*7nAChR^{-/-} neurons; surprisingly, however, addition of ST11 did not rescue those neurons from A β O-induced cell death (Fig. 7H). Of note, *\alpha*7nAChR^{-/-} neuronal cultures showed an increased background level of cell death [\sim 40 vs \sim 20% for wild-type neurons (Fig. 6B)], suggesting that expression of α 7nAChR is important for cell viability in neuronal cultures.

ST11 levels are increased in AD

ST11 is part of the cellular stress response, and we showed recently that ST11 knock-out cells are less resilient to stress (Beraldo et al., 2013). Moreover, network analysis suggests that *ST11*, the ST11 gene, may be a critical biological node for regulation of the unfolded protein response in AD cerebral cortex (Zhang et al., 2013). To determine whether ST11 levels change in AD, we first performed analysis of the APP^{swe}/PS1^{dE9} transgenic mouse model. These experiments revealed a 50% increase in cortical ST11 levels in 12-month-old APP^{swe}/PS1^{dE9} but not in

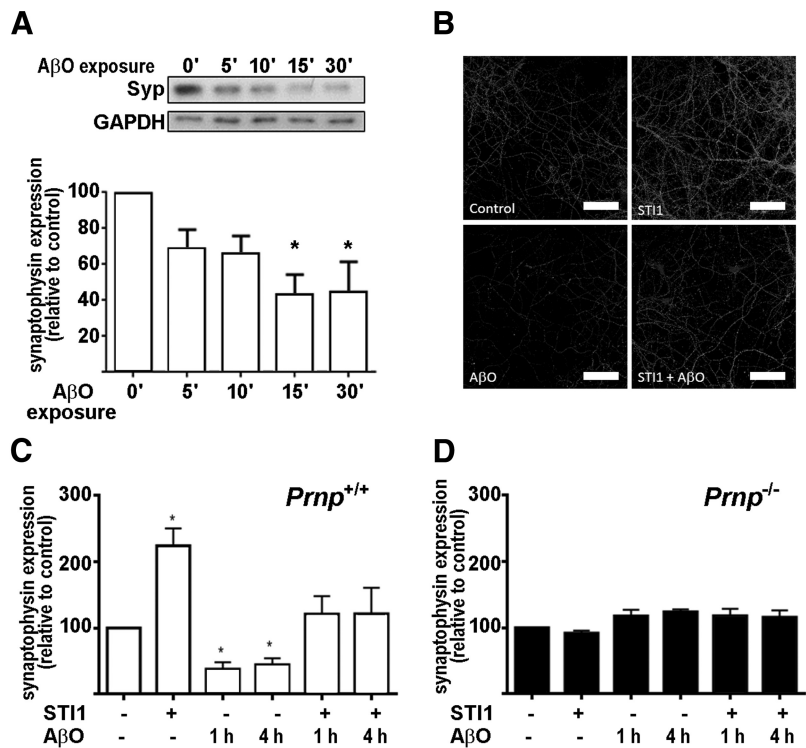


Figure 4. Synaptophysin levels in neurons treated with A β Os and ST11. *A*, Synaptophysin level in cultured hippocampal wild-type neurons before and after 5, 10, 15, and 30 min treatment with 500 nM A β Os. Cells were lysed, and Western blots against synaptophysin (Syp) and GAPDH were performed. *B*, Representative images for wild-type (*Prnp*^{+/+}) neuronal cultures treated with A β Os (500 nM, 1 h), ST11 (100 nM, 30 min), or both (100 nM ST11 for 30 min, followed by 500 nM A β Os for 1 h) and immunolabeled against synaptophysin. Scale bars, 10 μ m. *C*, Quantification of *B*. *D*, The same as *C* but for *Prnp*^{-/-} neuronal cultures. At least three independent experiments were done for each condition. Data were collected from 20 images containing neurites from at least 60 cells for each experiment and analyzed with one-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test. **p* < 0.05.

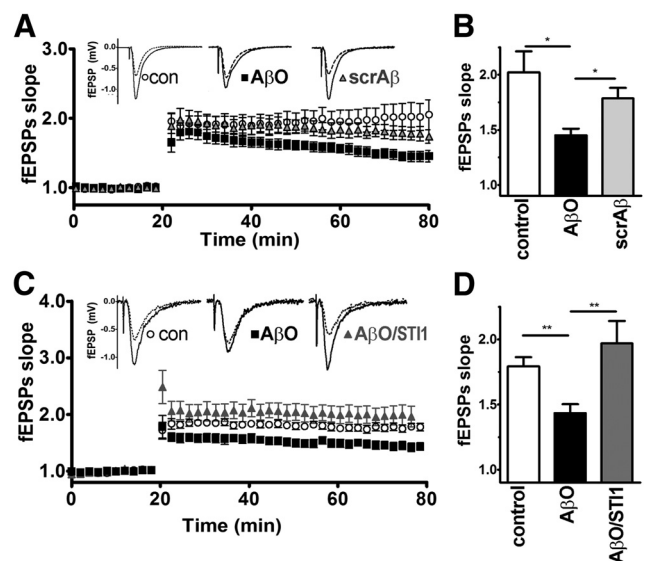


Figure 5. LTP measurements in hippocampal slices. *A*, LTP in mouse hippocampal slices, treated with A β O or scrambled A β as described in Materials and Methods. fEPSPs were recorded for 60 min after LTP induction. Inset shows typical pre-high-frequency stimulation (pre-HFS, dotted line) and post-HFS (solid lines) fEPSP traces. *B*, Bar graph summarizing averaged fEPSP slope values recorded at the endpoint (i.e., 80 min) of *A*. *C*, The same as *A* but treated with A β Os alone or with ST11. *D*, Bar graph summarizing averaged fEPSP slope values recorded at the endpoint (i.e., 80 min) of *C*. fEPSP slopes are presented as mean \pm SEM of at least five slices, relative to preinduction values, and analyzed by one-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test. **p* < 0.05, ***p* < 0.01.

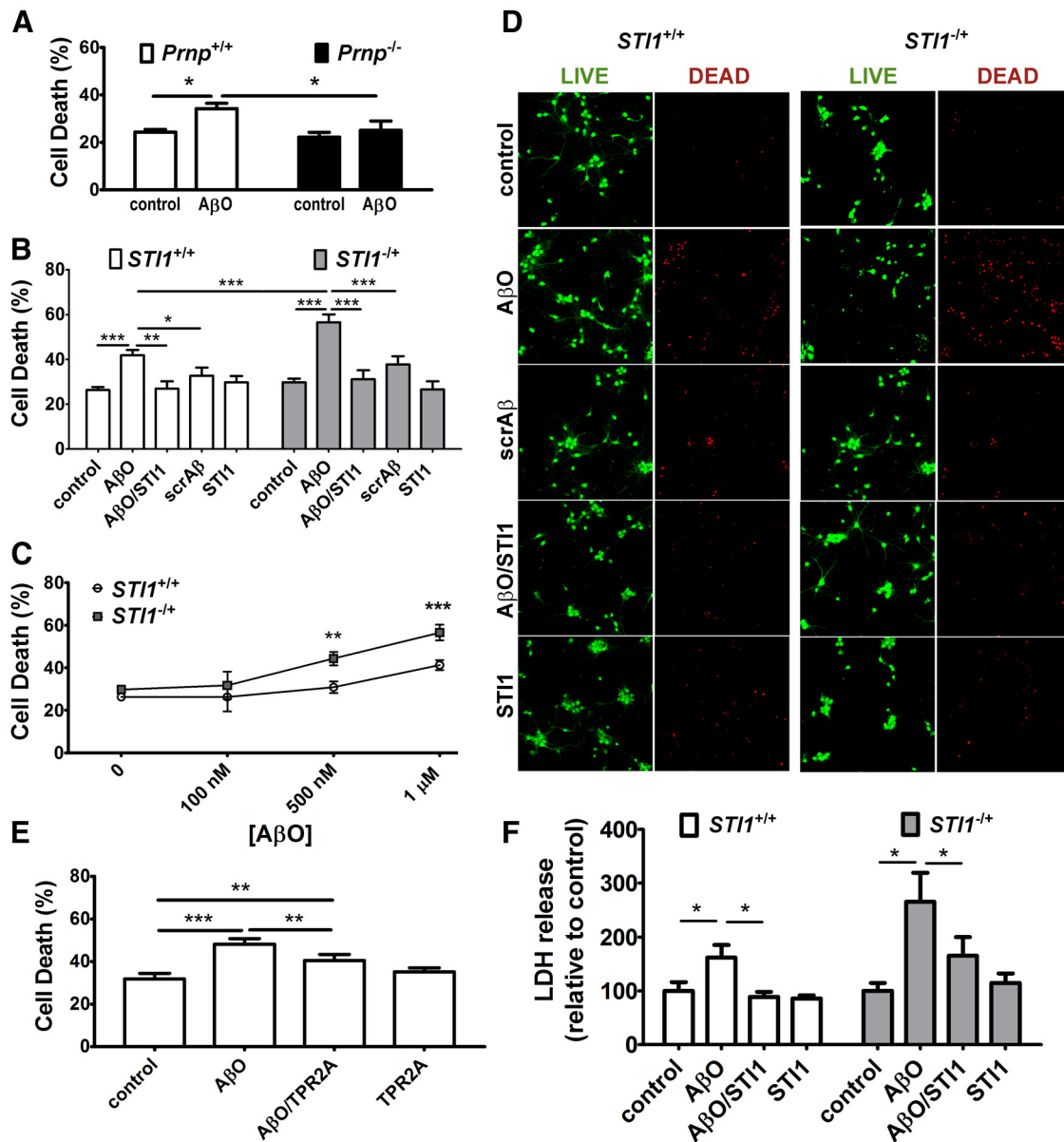


Figure 6. ST11 and TPR2A effect on A β O-induced cell death in hippocampal neurons. **A–E**, LIVE/DEAD assay. **A**, Comparison of cell death in *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{-/-} neuronal cultures after 48 h treatment with 1 μ M A β O. **B**, Comparison of cell death in *ST11*^{+/+} and *ST11*^{-/-} neurons after 48 h treatment with 1 μ M scrambled A β , 1 μ M A β O, 1 μ M ST11, or 1 μ M A β O/1 μ M ST11 mix. **C**, The same as in **B** but only for different concentrations of A β O. **D**, Representative images for **B**. Left two columns, Live (green) and dead (red) *ST11*^{+/+} neurons, nontreated (top row) or treated with 1 μ M A β O, 1 μ M A β O/1 μ M ST11, 1 μ M scrambled A β , or 1 μ M ST11 (rows 2–5, respectively); right two columns, the same for *ST11*^{-/-} neurons. **E**, Comparison of cell death in wild-type neuronal cultures after 48 h treatment with 1 μ M A β O, 1 μ M TPR2A, or their mix. **F**, LDH release in *ST11*^{+/+} and *ST11*^{-/-} neuronal cultures after 48 h treatment with 1 μ M A β O, 1 μ M ST11, or their mix. At least five independent experiments were done for each genotype and condition. Experiments with different genotypes were analyzed by two-way ANOVA, followed by Bonferroni's *post hoc* test, and within the same genotype by one-way ANOVA, followed by Tukey's *post hoc* test. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

9-month-old mice compared with wild-type controls (Fig. 8A, B). Importantly, ST11 levels were also increased in AD brains when compared with age-matched controls (cohorts described in Table 1; Michalski and Fahnstock, 2003; Fig. 8C).

Discussion

Here we show that the PrP^C ligand ST11 prevents deficits of synaptic plasticity and increased neuronal death induced by toxic A β O species. Mechanistically, both interference with A β O binding to neurons and α 7nAChR activation play a role in neuroprotection induced by ST11. Our data also demonstrate that ST11 levels are increased in AD. Although the biological significance of this change in ST11 levels is not understood, it is possible that,

without this compensatory response, toxic effects of A β O could be more prominent. These results open a novel avenue in AD research indicating that endogenous PrP^C ligands can regulate toxicity by A β O.

ST11 interferes with the A β O–PrP^C interaction

A β O have been shown to interact with several synaptic molecules (Ferreira and Klein, 2011), but its interaction with PrP^C is one of the best characterized. Despite initial controversy (Balducci et al., 2010; Benilova and De Strooper, 2010; Kessels et al., 2010), a number of observations supported the notion that interaction of A β O with PrP^C activates toxic signaling in neurons (Laurén et al., 2009; Gimbel et al., 2010; Bate and Williams, 2011;

Resenberger et al., 2011; Kudo et al., 2012; Um et al., 2012). We used well characterized synthetic A β Os (Fig. 1) to mimic the effects of toxic AD-related A β species. In our conditions, A β O preparations typically contained \sim 7% trimers and \sim 2% dimers, in addition to tetramers and small levels of higher-order oligomers. Dimers and trimers are thought to be among the most toxic assemblies of A β (Townsend et al., 2006; Hung et al., 2008; Figueiredo et al., 2013) and have been shown to bind PrP^C and to induce PrP^C-dependent toxic effects (Larson et al., 2012).

We confirmed the specificity of A β O binding to purified PrP using SPR and also demonstrated that expression of PrP^C in cells increased A β O binding substantially. These results are consistent with several other publications showing interaction between A β Os from different sources and PrP^C both *in vitro* and *in vivo* (Laurén et al., 2009; Balducci et al., 2010; Chen et al., 2010; Kessels et al., 2010; Larson et al., 2012). The A β O–PrP^C complex is poorly understood at the molecular and structural levels, and its formation, based on SPR kinetic curves, is not likely to be a one-step process. It appears to start with a relatively slow binding phase with k_{on} of just $3500 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, but then the two proteins associate tightly (k_{off} of $\sim 5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$), resulting in a high-affinity complex with K_D of $\sim 15 \text{ nM}$. Therefore, it is reasonable to hypothesize that binding occurs in more than one step, and the initial lower-affinity interaction is followed by a rearrangement step leading to formation of a strong complex. Of note, the K_D for on-chip ST11 binding to PrP (550 nM) is higher than that observed for A β Os, but its initial binding rate ($k_{on} = 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) is much faster, suggesting the possibility that ST11 could prevent the formation of this hypothetical initial low-affinity A β O–PrP^C complex. The molecular mechanism of this competition is probably related to the adjacent binding sites for ST11 and A β O on the PrP^C N-terminal domain. Thus, binding of ST11 (or the TPR2A domain of ST11, which contains the motif responsible for ST11 binding to PrP) to amino acid residues 113–128 on PrP possibly makes adjacent regions sterically unavailable to other ligands. This could explain why TPR2A alone, a less bulky molecule compared with ST11, shows weaker inhibition of A β O binding to PrP. Alternatively, conformational changes on PrP induced by ST11 (Romano et al., 2009) could also affect the interactions between PrP and A β O.

ST11 prevents toxic effects of A β Os

Interaction of A β Os with neurons leads to multiple neurotoxic effects, and although the underlying mechanisms have not been completely delineated, NMDA receptor-mediated excitotoxic-

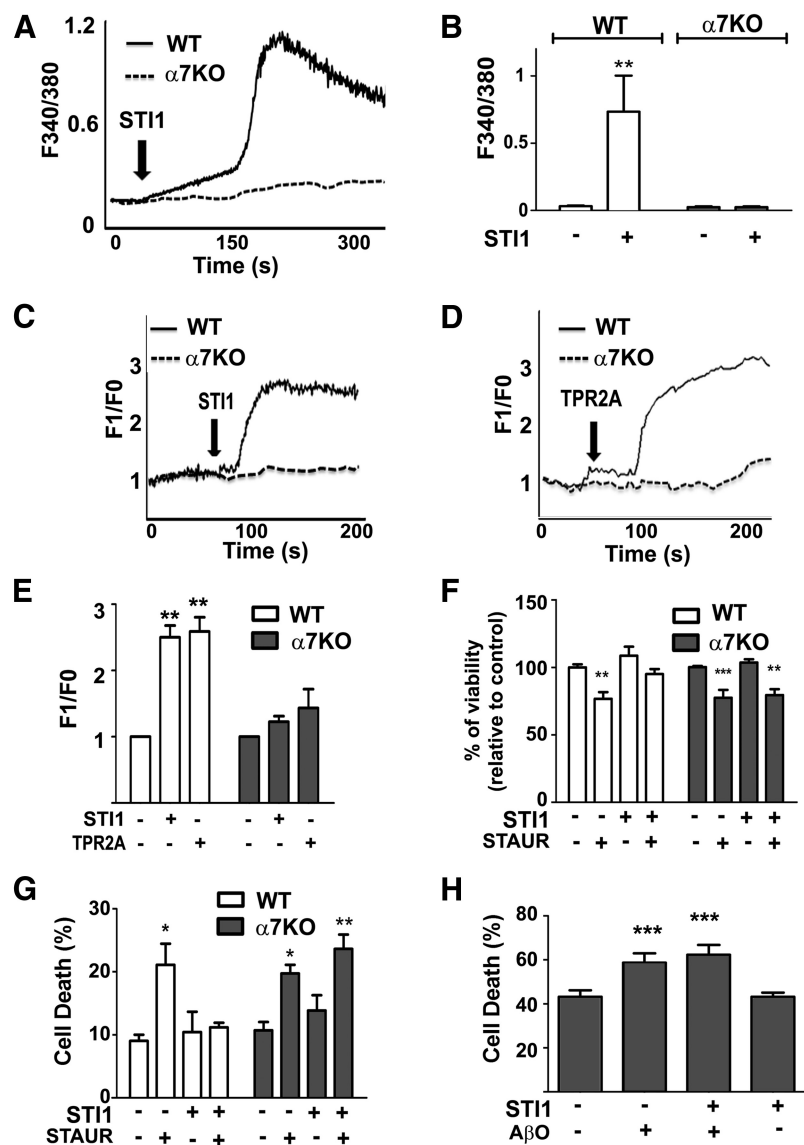


Figure 7. ST11 neuroprotection and effect on intracellular calcium in wild-type (WT) and $\alpha 7nAChR^{-/-}$ ($\alpha 7KO$) neurons. **A**, Representative kinetics of intracellular calcium levels in wild-type and $\alpha 7nAChR^{-/-}$ hippocampal neurons treated with ST11. Intracellular Ca^{2+} was measured by fura-2 AM fluorescence as described in Materials and Methods. **B**, Calcium levels from **A** averaged from at least 30 cells. **C**, The same as **A** but measured with Fluo-4 AM fluorescence as described in Materials and Methods. **D**, The same as **C** but neurons were treated with TPR2A. **E**, Calcium levels from **C** and **D** averaged from at least 30 cells. **F**, MTT assay of cell viability in wild-type and $\alpha 7nAChR^{-/-}$ neuronal cultures, treated for 16 h with 50 nM staurosporine, 1 μM ST11, or their mix, as described in Materials and Methods. **G**, The same as in **F** but measured by LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity assay, as described in Materials and Methods. Data represent four independent experiments analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$. **H**, Comparison of cell death in $\alpha 7nAChR^{-/-}$ neuronal cultures after 48 h treatment with 1 μM A β O, 1 μM ST11, or their mix, measured by LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity assay. Neuronal cultures were obtained from 13 independent embryos, and the data were analyzed by one-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test. *** $p < 0.0001$.

ity and abnormal activation of Fyn kinase have been implicated (Larson et al., 2012; Um et al., 2012). Abnormal activation of NMDAR and Fyn kinase seem to connect toxic actions of A β Os to altered Tau function (Ittner et al., 2010). PrP^C seems to interact directly with NMDA receptors and to regulate their desensitization by providing a source of copper, which can be disrupted by increased A β_{1-42} (You et al., 2012). In agreement with these toxic effects, A β Os disrupt synaptic plasticity, including LTP, which has been shown to be an effect dependent on PrP^C (Laurén et al., 2009; Barry et al., 2011; Freir et al., 2011). We found that, in neuronal cultures, A β Os decreased the levels of the presynaptic marker synaptophysin, similar to findings in A β O-treated hu-

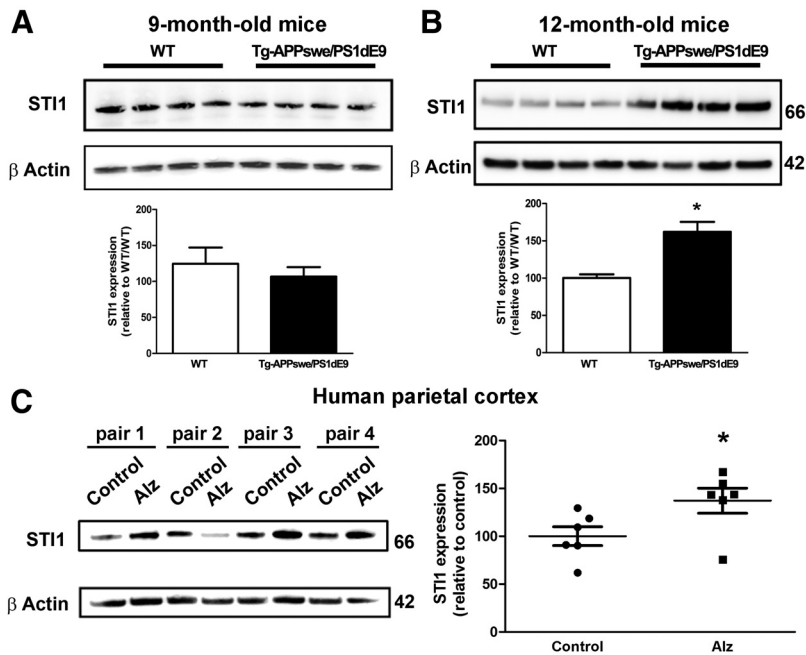


Figure 8. STI1 levels in APPsw/PS1dE9 mice and AD brains. **A**, Comparison of STI1 levels in 9-month-old APPsw/PS1dE9 and wild-type (WT) mice by Western blot. **B**, Similar analysis for 12-month-old mice. Data collected from at least six animals were normalized by actin levels and analyzed by Student's *t* test. **p* < 0.05. **C**, Comparison of STI1 levels in AD (Alz) and age-matched control brains. Data were collected from three male and three female AD brains and age-matched control brains, normalized by β -actin levels and analyzed by Student's *t* test. **p* < 0.05.

Table 1. Human parietal cortex samples

Diagnosis	Age	PMI	Sex
Pair 1			F
Control	82	7.25	
AD	82	3.00	
Pair 2			F
Control	87	6.50	
AD	88	4.25	
Pair 3			M
Control	64	4.50	
AD	66	3.00	
Pair 4			M
Control	78	6.00	
AD	79	2.75	
Pair 5			M
Control	80	7.00	
AD	80	2.75	
Pair 6			F
Control	93	8.00	
AD	79	3.25	

Samples were taken from control and AD postmortem brains with indicated postmortem interval (PMI, hours) and age and sex matched in pairs (except for pair 6) for Western blot analysis of STI1 levels.

man cortical slices (Sebollela et al., 2012). Conversely, STI1 increased immunoreactivity for synaptophysin, consistent with its known effect of increasing neuronal protein synthesis (Roffé et al., 2010). Additionally, STI1 was able to protect hippocampal neurons from the toxic effect of A β O on synaptophysin levels. Importantly, the effects of both STI1 and A β O on synaptophysin levels were lost in cultures from PrP^C-null mice, indicating that PrP^C is involved in these signaling pathways. Moreover, STI1 prevented inhibition of LTP induced by A β O. These results suggest that increased extracellular levels of STI1, a PrP^C ligand that is secreted by astrocytes (Beraldo et al., 2013; Hajj et al., 2013), can mitigate A β O-mediated synaptic toxicity.

We also showed that neurons haploinsufficient for STI1 are more sensitive to A β O-induced cell death, a result consistent with our recent findings that cells are less resilient in the absence of STI1 (Beraldo et al., 2013). Hence, the differential expression of STI1 in AD brains may have physiological significance. Interestingly, flies harboring an STI1 mutation showed increased toxicity in a model of tauopathy (Ambegaokar and Jackson, 2011), suggesting that STI1 may be a critical regulator of distinct pathological signatures in AD. The increased neuronal death induced by A β O in STI1-mutant hippocampal neurons could be prevented by extracellular recombinant STI1. We showed previously that extracellular recombinant STI1 reproduces the effect of secreted STI1 (Caetano et al., 2008). Moreover, the TPR2A STI1 domain, which lacks cochaperone activity because it is unable to bind both Hsp90 and Hsp70 (Brinker et al., 2002), could also prevent A β O-mediated neuronal death, suggesting that the neuroprotective effects of STI1 may not be related to a cochaperone mechanism.

Mechanism for prevention of A β O-mediated toxicity

Although STI1 decreases the binding of A β O to PrP^C *in vitro*, it is also possible that the protein could regulate A β O-mediated toxicity by activating neuroprotective signaling pathways (Lopes et al., 2005; Caetano et al., 2008; Beraldo et al., 2010; Roffé et al., 2010). We found that STI1-mediated Ca²⁺ influx was abolished in neurons from α 7nAChR-null mice and that STI1-mediated neuroprotection is impaired in these mutants. Importantly, prevention of A β O-induced neuronal death by STI1 was not observed in α 7nAChR-null neurons. This result suggests that, in the presence of STI1, residual A β O complexes with PrP^C or other targets may still initiate toxic responses. Nonetheless, STI1 activation of the PrP^C/ α 7nAChR pathway seems to prevent these effects. Together, these results argue that decrease of A β O interaction with PrP^C in addition to activation of α 7nAChR-mediated neuroprotection pathways may participate in the effects of STI1.

Our work is consistent with previous studies showing neuroprotective roles of α 7nAChR in AD (Dineley et al., 2001; Hernandez et al., 2010; Shen et al., 2010). Indeed, A β actions via α 7nAChRs may also affect hippocampal LTP (Gu and Yakel, 2011), and genetic depletion of α 7nAChRs in an early-stage AD mouse model exacerbated cognitive deficits and septohippocampal pathology (Hernandez et al., 2010). Interestingly, higher concentrations or chronic exposure to A β O appears to corrupt α 7nAChR function, which can be prevented by intervening small molecules (Wang et al., 2009, 2012) or by genetic depletion of α 7nAChR (Dziewczapolski et al., 2009). It remains to be determined whether biasing signaling via PrP^C/ α 7nAChR by further increasing STI1 levels could be used to prevent the toxic actions of A β O *in vivo*.

Conclusion

Our studies suggest the possibility that STI1 may influence toxic responses to A β oligomers in AD. Increased levels of STI1 ob-

served in AD brain may exert a protective role, although this obviously cannot prevent toxicity in advanced disease. It is possible that higher levels of ST11 are part of a compensatory response that may mitigate toxicity. Future experiments using tissue-specific elimination of ST11 may help to clarify this issue.

ST11 is a cochaperone known to interact with Hsp90 and Hsp70 to facilitate client transfer (Southworth and Agard, 2011). Our experiments in neurons support the importance of extracellular ST11 in protection against A β O toxicity; however, we cannot completely exclude that intracellular ST11 may also participate in cellular resilience in this condition (Beraldo et al., 2013). Increased chaperone activity may also play a role in protection against prolonged A β O exposure (Resenberger et al., 2012), which induces oxidative stress (De Felice et al., 2007) and mitochondrial damage in neurons (Paula-Lima et al., 2011), leading to increased load of misfolded proteins (Li et al., 2009). Interestingly, we showed recently that, after 9 months of age, APP/Ps1dE9 mice seem to present increased oxidative stress, revealed by increased PrP^C β processing (Ostapchenko et al., 2013). Our present findings describe a novel neuroprotective role for the PrP^C ligand ST11, which added to recent systems biology reports (Ambegaokar and Jackson, 2011; Zhang et al., 2013), implicates ST11 in distinct aspects of AD.

References

- Ambegaokar SS, Jackson GR (2011) Functional genomic screen and network analysis reveal novel modifiers of tauopathy dissociated from tau phosphorylation. *Hum Mol Genet* 20:4947–4977. [CrossRef Medline](#)
- Balducci C, Beeg M, Stravalaci M, Bastone A, Sclip A, Biasini E, Tapella L, Colombo L, Manzoni C, Borsello T, Chiesa R, Gobbi M, Salmona M, 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. [CrossRef Medline](#)
- Barry AE, Klyubin I, Mc Donald JM, Mably AJ, Farrell MA, Scott M, Walsh DM, Rowan MJ (2011) Alzheimer's disease brain-derived amyloid- β -mediated inhibition of LTP *in vivo* is prevented by immunotargeting cellular prion protein. *J Neurosci* 31:7259–7263. [CrossRef Medline](#)
- Bate C, Williams A (2011) Amyloid-beta-induced synapse damage is mediated via cross-linkage of cellular prion proteins. *J Biol Chem* 286:37955–37963. [CrossRef Medline](#)
- Benilova I, De Strooper B (2010) Prion protein in Alzheimer's pathogenesis: a hot and controversial issue. *EMBO Mol Med* 2:289–290. [CrossRef Medline](#)
- Beraldo FH, Soares IN, Goncalves DF, Fan J, Thomas AA, Santos TG, Mohammad AH, Roffé M, Calder MD, Nikolova S, Hajj GN, Guimaraes AL, Massensini AR, Welch I, Betts DH, Gros R, Drangova M, Watson AJ, Bartha R, Prado VF, et al. (2013) Stress-inducible phosphoprotein 1 has unique cochaperone activity during development and regulates cellular response to ischemia via the prion protein. *FASEB J* 27:3594–3607. [CrossRef Medline](#)
- Beraldo FH, Arantes CP, Santos TG, Queiroz NG, Young K, Rylett RJ, Markus RP, Prado MA, Martins VR (2010) Role of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in calcium signaling induced by prion protein interaction with stress-inducible protein 1. *J Biol Chem* 285:36542–36550. [CrossRef Medline](#)
- Beraldo FH, Arantes CP, Santos TG, Machado CF, Roffé M, Hajj GN, Lee KS, Magalhães AC, Caetano FA, Mancini GL, Lopes MH, Américo TA, Magdesian MH, Ferguson SS, Linden R, Prado MA, Martins VR (2011) Metabotropic glutamate receptors transduce signals for neurite outgrowth after binding of the prion protein to laminin gamma1 chain. *FASEB J* 25:265–279. [CrossRef Medline](#)
- Brinker A, Scheufler C, Von Der Mulbe F, Fleckenstein B, Herrmann C, Jung G, Moarefi I, Hartl FU (2002) Ligand discrimination by TPR domains. Relevance and selectivity of EEVD-recognition in Hsp70 x Hop x Hsp90 complexes. *J Biol Chem* 277:19265–19275. [CrossRef Medline](#)
- Caetano FA, Lopes MH, Hajj GN, Machado CF, Pinto Arantes C, Magalhães AC, Vieira Mde P, Américo TA, Massensini AR, Priola SA, Vorberg I, Gomez MV, Linden R, Prado VF, Martins VR, Prado MA (2008) Endocytosis of prion protein is required for ERK1/2 signaling induced by stress-inducible protein 1. *J Neurosci* 28:6691–6702. [CrossRef Medline](#)
- Caetano FA, Beraldo FH, Hajj GN, Guimaraes AL, Jürgensen S, Wasilewska-Sampaio AP, Hirata PH, Souza I, Machado CF, Wong DY, De Felice FG, Ferreira ST, Prado VF, Rylett RJ, Martins VR, Prado MA (2011) Amyloid-beta oligomers increase the localization of prion protein at the cell surface. *J Neurochem* 117:538–553. [CrossRef Medline](#)
- Chen S, Yadav SP, Surewicz WK (2010) Interaction between human prion protein and amyloid-beta (A β) oligomers: role of N-terminal residues. *J Biol Chem* 285:26377–26383. [CrossRef Medline](#)
- Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R (2002) Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J* 21:3317–3326. [CrossRef Medline](#)
- Chung E, Ji Y, Sun Y, Kascsak RJ, Kascsak RB, Mehta PD, Strittmatter SM, Wisniewski T (2010) Anti-PrPc monoclonal antibody infusion as a novel treatment for cognitive deficits in an Alzheimer's disease model mouse. *BMC Neurosci* 11:130. [CrossRef Medline](#)
- Decker H, Jürgensen S, Adrover MF, Brito-Moreira J, Bomfim TR, Klein WL, Epstein AL, De Felice FG, Jerusalinsky D, Ferreira ST (2010) N-methyl-D-aspartate receptors are required for synaptic targeting of Alzheimer's toxic amyloid-beta peptide oligomers. *J Neurochem* 115:1520–1529. [CrossRef Medline](#)
- De Felice FG, Velasco PT, Lambert MP, Viola K, Fernandez SJ, Ferreira ST, Klein WL (2007) Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J Biol Chem* 282:11590–11601. [CrossRef Medline](#)
- De Felice FG, Vieira MN, Bomfim TR, Decker H, Velasco PT, Lambert MP, Viola KL, Zhao WQ, Ferreira ST, Klein WL (2009) Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: insulin signaling prevents the pathogenic binding of Abeta oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:1971–1976. [CrossRef Medline](#)
- Dineley KT, Westerman M, Bui D, Bell K, Ashe KH, Sweatt JD (2001) β -Amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal α 7 nicotinic acetylcholine receptors: *in vitro* and *in vivo* mechanisms related to Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21:4125–4133. [CrossRef Medline](#)
- Dziewczapolski G, Glogowski CM, Maslah E, Heinemann SF (2009) Deletion of the α 7 nicotinic acetylcholine receptor gene improves cognitive deficits and synaptic pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 29:8805–8815. [CrossRef Medline](#)
- Ferreira ST, Klein WL (2011) The Abeta oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. *Neurobiol Learn Mem* 96:529–543. [CrossRef Medline](#)
- Figueiredo CP, Clarke JR, Ledo JH, Ribeiro FC, Costa CV, Melo HM, Mota-Sales AP, Saraiva LM, Klein WL, Sebollela A, De Felice FG, Ferreira ST (2013) Memantine rescues transient cognitive impairment caused by high-molecular-weight abeta oligomers but not the persistent impairment induced by low-molecular-weight oligomers. *J Neurosci* 33:9626–9634. [CrossRef Medline](#)
- Fischer MJ (2010) Amine coupling through EDC/NHS: a practical approach. *Methods Mol Biol* 627:55–73. [CrossRef Medline](#)
- Freir DB, Nicoll AJ, Klyubin I, Panico S, Mc Donald JM, Risse E, Asante EA, Farrow MA, Sessions RB, Saibil HR, Clarke AR, Rowan MJ, Walsh DM, Collinge J (2011) Interaction between prion protein and toxic amyloid beta assemblies can be therapeutically targeted at multiple sites. *Nat Commun* 2:336. [CrossRef Medline](#)
- Gimbel DA, Nygaard HB, Coffey EE, Gunther EC, Laurén J, Gimbel ZA, Strittmatter SM (2010) Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein. *J Neurosci* 30:6367–6374. [CrossRef Medline](#)
- Gu Z, Yakel JL (2011) Timing-dependent septal cholinergic induction of dynamic hippocampal synaptic plasticity. *Neuron* 71:155–165. [CrossRef Medline](#)
- Hajj GN, Arantes CP, Dias MV, Roffé M, Costa-Silva B, Lopes MH, Porto-Carreiro I, Rabachini T, Lima FR, Beraldo FH, Prado MM, Linden R, Martins VR (2013) The unconventional secretion of stress-inducible protein 1 by a heterogeneous population of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* 70:3211–3227. [CrossRef Medline](#)
- Hernandez CM, Dineley KT (2012) α 7 nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease: neuroprotective, neurotrophic or both? *Curr Drug Targets* 13:613–622. [CrossRef Medline](#)

- Hernandez CM, Kayed R, Zheng H, Sweatt JD, Dineley KT (2010) Loss of $\alpha 7$ nicotinic receptors enhances β -amyloid oligomer accumulation, exacerbating early-stage cognitive decline and septohippocampal pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 30:2442–2453. [CrossRef Medline](#)
- Hung LW, Ciccotosto GD, Giannakis E, Tew DJ, Perez K, Masters CL, Cappai R, Wade JD, Barnham KJ (2008) Amyloid- β peptide (A β) neurotoxicity is modulated by the rate of peptide aggregation: A β dimers and trimers correlate with neurotoxicity. *J Neurosci* 28:11950–11958. [CrossRef Medline](#)
- Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, van Eersel J, Wölfing H, Chieng BC, Christie MJ, Napier IA, Eckert A, Staufenbiel M, Hardeman E, Götz J (2010) Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* 142:387–397. [CrossRef Medline](#)
- Jankowsky JL, Slunt HH, Ratovitski T, Jenkins NA, Copeland NG, Borchelt DR (2001) Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomol Eng* 17:157–165. [CrossRef Medline](#)
- Kessels HW, Nguyen LN, Nabavi S, Malinow R (2010) The prion protein as a receptor for amyloid-beta. *Nature* 466:E3–E4; discussion E4–E5. [CrossRef Medline](#)
- Khachaturian ZS (1985) Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 42:1097–1105. [CrossRef Medline](#)
- Kudo W, Lee HP, Zou WQ, Wang X, Perry G, Zhu X, Smith MA, Petersen RB, Lee HG (2012) Cellular prion protein is essential for oligomeric amyloid-beta-induced neuronal cell death. *Hum Mol Genet* 21:1138–1144. [CrossRef Medline](#)
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1–42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6448–6453. [CrossRef Medline](#)
- Larson M, Sherman MA, Amar F, Nuvolone M, Schneider JA, Bennett DA, Aguzzi A, Lesné SE (2012) The complex PrP(c)-Fyn couples human oligomeric Abeta with pathological tau changes in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 32:16857–16871a. [CrossRef Medline](#)
- Laurén J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW, Strittmatter SM (2009) Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* 457:1128–1132. [CrossRef Medline](#)
- Lee KS, Magalhães AC, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Prado MA (2001) Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. *J Neurochem* 79:79–87. [CrossRef Medline](#)
- Li S, Hong S, Shepardson NE, Walsh DM, Shankar GM, Selkoe D (2009) Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron* 62:788–801. [CrossRef Medline](#)
- 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. [CrossRef Medline](#)
- Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR (2008) Physiology of the prion protein. *Physiol Rev* 88:673–728. [CrossRef Medline](#)
- 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 neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *J Neurosci* 25:11330–11339. [CrossRef Medline](#)
- Magdesian MH, Nery AA, Martins AH, Juliano MA, Juliano L, Ulrich H, Ferreira ST (2005) Peptide blockers of the inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by amyloid beta. *J Biol Chem* 280:31085–31090. [CrossRef Medline](#)
- Martins VR, Beraldo FH, Hajj GN, Lopes MH, Lee KS, Prado MA, Linden R (2010) Prion protein: orchestrating neurotrophic activities. *Curr Issues Mol Biol* 12:63–86. [Medline](#)
- Martyn AC, De Jaeger X, Magalhães AC, Kesarwani R, Gonçalves DF, Raulic S, Guzman MS, Jackson MF, Izquierdo I, Macdonald JF, Prado MA, Prado VF (2012) Elimination of the vesicular acetylcholine transporter in the forebrain causes hyperactivity and deficits in spatial memory and long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:17651–17656. [CrossRef Medline](#)
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34:939–944. [CrossRef Medline](#)
- Michalski B, Fahnstock M (2003) Pro-brain-derived neurotrophic factor is decreased in parietal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 111:148–154. [CrossRef Medline](#)
- Miesenböck G, De Angelis DA, Rothman JE (1998) Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 394:192–195. [CrossRef Medline](#)
- Mucke L, Selkoe DJ (2012) Neurotoxicity of amyloid beta-protein: synaptic and network dysfunction. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006338. [CrossRef Medline](#)
- Orr-Urtreger A, Göldner FM, Saeki M, Lorenzo I, Goldberg L, De Biasi M, Dani JA, Patrick JW, Beaudet AL (1997) Mice deficient in the $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor lack α -bungarotoxin binding sites and hippocampal fast nicotinic currents. *J Neurosci* 17:9165–9171. [Medline](#)
- Ostapchenko VG, Makarava N, Savtchenko R, Baskakov IV (2008) The polybasic N-terminal region of the prion protein controls the physical properties of both the cellular and fibrillar forms of PrP. *J Mol Biol* 383:1210–1224. [CrossRef Medline](#)
- Ostapchenko VG, Beraldo FH, Guimaraes AL, Mishra S, Guzman M, Fan J, Martins VR, Prado VF, Prado MA (2013) Increased prion protein processing and expression of metabotropic glutamate receptor 1 in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurochem*. Advance online publication. Retrieved September 12, 2013. doi:10.1111/jnc.12296. [CrossRef Medline](#)
- Paula-Lima AC, Adasme T, SanMartín C, Sebollela A, Hetz C, Carrasco MA, Ferreira ST, Hidalgo C (2011) Amyloid beta-peptide oligomers stimulate RyR-mediated Ca²⁺ release inducing mitochondrial fragmentation in hippocampal neurons and prevent RyR-mediated dendritic spine remodeling produced by BDNF. *Antioxid Redox Signal* 14:1209–1223. [CrossRef Medline](#)
- Paula-Lima AC, Brito-Moreira J, Ferreira ST (2013) Deregulation of excitatory neurotransmission underlying synapse failure in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 126:191–202. [CrossRef Medline](#)
- Prado VF, Martins-Silva C, de Castro BM, Lima RF, Barros DM, Amaral E, Ramsey AJ, Sotnikova TD, Ramirez MR, Kim HG, Rossato JI, Koenen J, Quan H, Cota VR, Moraes MF, Gomez MV, Guatimosim C, Wetzel WC, Kushmerick C, Pereira GS, Gainetdinov RR, Izquierdo I, Caron MG, Prado MA (2006) Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. *Neuron* 51:601–612. [CrossRef Medline](#)
- Querfurth HW, LaFerla FM (2010) Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 362:329–344. [CrossRef Medline](#)
- Resenberger UK, Harmeier A, Woerner AC, Goodman JL, Müller V, Krishnan R, Vabulas RM, Kretzschmar HA, Lindquist S, Hartl FU, Multhaup G, Winklhofer KF, Tatzelt J (2011) The cellular prion protein mediates neurotoxic signalling of beta-sheet-rich conformers independent of prion replication. *EMBO J* 30:2057–2070. [CrossRef Medline](#)
- Resenberger UK, Müller V, Munter LM, Baier M, Multhaup G, Wilson MR, Winklhofer KF, Tatzelt J (2012) The heat shock response is modulated by and interferes with toxic effects of scrapie prion protein and amyloid beta. *J Biol Chem* 287:43765–43776. [CrossRef Medline](#)
- Roffé M, Beraldo FH, Bester R, Nunziante M, Bach C, Mancini G, Gilch S, Vorberg I, Castilho BA, Martins VR, Hajj GN (2010) Prion protein interaction with stress-inducible protein 1 enhances neuronal protein synthesis via mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:13147–13152. [CrossRef Medline](#)
- Roffé M, Hajj GN, Azevedo HF, Alves VS, Castilho BA (2013) IMPACT is a developmentally regulated protein in neurons that opposes the eukaryotic initiation factor 2alpha kinase GCN2 in the modulation of neurite outgrowth. *J Biol Chem* 288:10860–10869. [CrossRef Medline](#)
- Romano SA, Cordeiro Y, Lima LM, Lopes MH, Silva JL, Foguel D, Linden R (2009) Reciprocal remodeling upon binding of the prion protein to its signaling partner hop/ST11. *FASEB J* 23:4308–4316. [CrossRef Medline](#)
- Santos TG, Beraldo FH, Hajj GN, Lopes MH, Roffé M, Lupinacci FC, Ostapchenko VG, Prado VF, Prado MA, Martins VR (2013) Laminin-gamma1 chain and stress inducible protein 1 synergistically mediate PrPC-dependent axonal growth via Ca²⁺ mobilization in dorsal root ganglia neurons. *J Neurochem* 124:210–223. [CrossRef Medline](#)

- Sebellela A, Freitas-Correa L, Oliveira FF, Paula-Lima AC, Saraiva LM, Martins SM, Mota LD, Torres C, Alves-Leon S, de Souza JM, Carraro DM, Brentani H, De Felice FG, Ferreira ST (2012) Amyloid-beta oligomers induce differential gene expression in adult human brain slices. *J Biol Chem* 287:7436–7445. [CrossRef Medline](#)
- Shen H, Kihara T, Hongo H, Wu X, Kem WR, Shimohama S, Akaike A, Niidome T, Sugimoto H (2010) Neuroprotection by donepezil against glutamate excitotoxicity involves stimulation of α 7 nicotinic receptors and internalization of NMDA receptors. *Br J Pharmacol* 161:127–139. [CrossRef Medline](#)
- Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P (2005) Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci* 8:1051–1058. [CrossRef Medline](#)
- Solfrosi L, Criado JR, McGavern DB, Wirz S, Sánchez-Alavez M, Sugama S, DeGiorgio LA, Volpe BT, Wiseman E, Abalos G, Masliah E, Gildea D, Oldstone MB, Conti B, Williamson RA (2004) Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo. *Science* 303:1514–1516. [CrossRef Medline](#)
- Southworth DR, Agard DA (2011) Client-loading conformation of the Hsp90 molecular chaperone revealed in the cryo-EM structure of the human Hsp90:Hop complex. *Mol Cell* 42:771–781. [CrossRef Medline](#)
- Townsend M, Shankar GM, Mehta T, Walsh DM, Selkoe DJ (2006) Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. *J Physiol* 572:477–492. [CrossRef Medline](#)
- Tsutsui S, Hahn JN, Johnson TA, Ali Z, Jirik FR (2008) Absence of the cellular prion protein exacerbates and prolongs neuroinflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* 173:1029–1041. [CrossRef Medline](#)
- Um JW, Nygaard HB, Heiss JK, Kostylev MA, Stagi M, Vortmeyer A, Wisniewski T, Gunther EC, Strittmatter SM (2012) Alzheimer amyloid-beta oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons. *Nat Neurosci* 15:1227–1235. [CrossRef Medline](#)
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416:535–539. [CrossRef Medline](#)
- Wang HY, Lee DH, D'Andrea MR, Peterson PA, Shank RP, Reitz AB (2000) beta-Amyloid(1–42) binds to α 7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem* 275:5626–5632. [CrossRef Medline](#)
- Wang HY, Stucky A, Liu J, Shen C, Trocme-Thibierge C, Morain P (2009) Dissociating β -amyloid from α 7 nicotinic acetylcholine receptor by a novel therapeutic agent, S 24795, normalizes α 7 nicotinic acetylcholine and NMDA receptor function in Alzheimer's disease brain. *J Neurosci* 29:10961–10973. [CrossRef Medline](#)
- Wang HY, Bakshi K, Frankfurt M, Stucky A, Gøberdhan M, Shah SM, Burns LH (2012) Reducing amyloid-related Alzheimer's disease pathogenesis by a small molecule targeting filamin A. *J Neurosci* 32:9773–9784. [CrossRef Medline](#)
- Xie L, Helmerhorst E, Taddei K, Plewright B, Van Bronswijk W, Martins R (2002) Alzheimer's β -amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *J Neurosci* 22:RC221(1–5). [Medline](#)
- You H, Tsutsui S, Hameed S, Kannanayakal TJ, Chen L, Xia P, Engbers JD, Lipton SA, Stys PK, Zamponi GW (2012) Abeta neurotoxicity depends on interactions between copper ions, prion protein, and N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:1737–1742. [CrossRef Medline](#)
- 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. [CrossRef Medline](#)
- Zhang B, Gaiteri C, Bodea LG, Wang Z, McElwee J, Podtelezhnikov AA, Zhang C, Xie T, Tran L, Dobrin R, Fluder E, Clurman B, Melquist S, Narayanan M, Suver C, Shah H, Mahajan M, Gillis T, Mysore J, MacDonald ME, et al. (2013) Integrated systems approach identifies genetic nodes and networks in late-onset Alzheimer's disease. *Cell* 153:707–720. [CrossRef Medline](#)

Anexo 3 - PrP^C regulates endocytic trafficking essential for biogenesis of extracellular vesicles

Marcos V.S. Dias, Bianca L. Teixeira, Camila Arantes, Martín Roffé, Bruna R. Rodrigues, Glaucia N. M. Hajj* and Vilma R. Martins*
International Research Center, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil.
National Institute of Oncogenomics, INCITO.

* - These authors contributed equally to this work.

To whom correspondence should be addressed:

Vilma Regina Martins

International Research Center, A.C. Camargo Cancer Center, Rua Taguá 440,
01508-010 São Paulo, Brazil.

Phone: 55-11- 2189-5000 ext.2977

Fax: 55-11-21895152

e-mail: vmartins@cipe.accamargo.org.br

Abstract

Extracellular vesicles (EVs) are membrane surrounded structures released by cells that function in signaling and transfer of membrane and/or cargo molecules. The majority of EVs are intraluminal vesicles (ILVs) formed in multivesicular bodies (MVBs). After endocytosis, proteins and lipids are incorporated into ILVs of MVBs and delivered to lysosomes for digestion or to the plasma membrane, which leads to release of the vesicles to the extracellular environment. We have previously demonstrated that *Prnp*^{0/0} astrocytes have a defect in producing secreted factors that support neuronal survival and differentiation. Herein, we demonstrate that PrP^C knockout cells secrete lower amounts of EVs than wild-type cells, while the re-expression of PrP^C restores the EV secretion. The absence of PrP^C leads to a defect in caveolin mediated endocytosis and trafficking of EGF-EGFR to the late endosome/multivesicular bodies (LE/MVB) is delayed. Additionally, electron microscopy demonstrated that *Prnp*^{0/0} cells have MVBs without intraluminal vesicles and *Prnp*^{0/0} cells shown lower levels of LBPA (an ILV marker). Consistent with an alteration in endocytic pathways, PrP^C knockout cells present an accumulation of immature autophagosomes. Our study highlights a novel pathway controlling ILV budding and EVs biogenesis and identifies an unexpected role for PrP^C in endosomal trafficking.

Introduction

The cellular prion protein (PrP^C) is a glycoprotein attached to the membrane surface of cells through a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor (Stahl et al., 1987). Its major conformational change and conversion into an abnormal form (PrP^{Sc}) has been associated with the generation of prions, the infectious agents of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) (Prusiner, 1984). Although the precise role of PrP^{Sc} in the neurodegeneration process that leads to the disease is not known, many physiological functions of PrP^C on the nervous system have been unraveled. PrP^C has been involved in many cellular functions (HAJJ et al. 2010 – book chapter) such as neuroprotection against cellular and systemic insults (McLennan et al., 2004, Lopes et al., 2005, HAJJ et al. 2007), cell signaling (Roffé et al 2010), neuritogenesis (Graner et al., 2000), neuronal plasticity and excitability, memory formation and consolidation (Coitinho et al., 2006) and more recently, in synaptic vesicle transmission (Robinson et al., 2014).

The expression of PrP^C is most abundantly detected in neuronal cells, but it has also been observed in non-neuronal cells (Manson et al., 1992, Hajj et al. 2009). In astrocytes, PrP^C modulates survival and differentiation via the PKA and ERK1/2 pathways (Arantes et al., 2009). Some studies have been conducted to address the role for PrP^C in neuron-astrocytes communication. For instance, it has been shown that glutamate uptake from astrocytes is dependent on PrP^C expression, which may influence neuronal survival (Brown and Mohn, 1999).

Some of the functions associated to PrP^C in neurons are triggered by its interaction with the co-chaperone Stress Inducible protein 1 (STI1). STI1 secreted by astrocytes mediates PrP^C-dependent neuronal survival (Lima et al., 2007) and induces proliferation of glioma cells (Lopes et al., 2014). Astrocytes secrete STI1 among a heterogeneous population of multivesicular body-derived extracellular vesicles (EVs), containing classical exosome markers (Hajj et al., 2013).

The cellular secretion of EVs in CNS represents a remarkable system for biomolecule transfer, which is increasingly becoming established as a general mode of cell-to-cell communication. Extracellular vesicles are classified based on their biogenesis in three main classes: exosomes, microvesicles and apoptotic bodies. In contrast to microvesicles, which are generated by budding from the plasma membrane, exosomes are derived from the endolysosomal pathway (Andaloussi et al., 2013). The biogenesis of exosomes and the sorting of proteins in these class of EVs is not totally understood. The biogenesis of exosomes starts by invagination and budding from the limiting membrane of late endosomes generating vesicle-laden endosomes, referred to as multivesicular bodies (MVBs) (Fevrier and Raposo, 2004). The resulting intraluminal vesicles (ILVs) serve as device to deliver proteins to the lysosome for degradation or alternatively the ILVs can be secreted as exosomes by MVB fusion to the plasma membrane (Bobrie et al., 2011; Raposo and Stoorvogel, 2013).

The components of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT) are involved in MVB and ILV biogenesis. The first complex that binds the cargo on endosomes is ESCRT-0 and with the help of the ESCRTs-I, -II, and -III, the cargo accumulates on the endosomal membrane. At the end of the sorting, an AAA-type ATPase, VPS4, disrupts the ESCRT complexes, and the membrane with its accumulated cargo is invaginated into the maturing endosome (Wollert and Hurley, 2010 ; Hurley and Hanson, 2010). MVBs can fuse with the plasma membrane releasing ILVs as exosomes or be targeted to degradation by fusion with

autophagosomes and lysosomes (Lamb et al, 2013). Indeed, the maturation of autophagosomes requires ESCRT function, as ablation of proteins from these complexes leads to the accumulation of immature autophagosomes and causes neurodegeneration (Lee et al., 2008, Rusten and Stenmark, 2009).

We have previously demonstrated that *Prnp*^{0/0} astrocytes have a defect in producing secreted factors that support neuronal survival and differentiation (Lima et al., 2009). In this work, we demonstrated that this diminished release of survival factors is due to a reduced ability of PrP^C knockout cells to secrete EVs. The reduction in EV secretion was caused by the influence of PrP^C on endocytic pathways, such as the reduction of caveolin mediated internalization, the presence of MVS devoid of ILVs and accumulation of immature autophagosomes. These data supports an unpredicted function for PrP^C with major implications in cellular communication.

Material and Methods

Reagents

All culture media components, lipofectamine, Transferrin-Alexa594, EGF-Alex488, Vybrant Alexa-Fluor-488 Lipid Raft labeling kit and Draq5 were purchased from Invitrogen-Life Technologies. [9,10-3H] myristic acid was purchased from PerkinElmer. Superose 12 prep grade was from GE Healthcare and the Amicon concentrator was from Millipore. A polyclonal antibody against recombinant mouse PrPC was produced in PrPC-null (*Prnp*0/0) mice (Chiarini et al, 2002) (dilution 1/500). Polyclonal anti-ST11 antibodies raised in rabbit were produced by Bethyl Laboratories (dilution 1/8000). Other antibodies were from commercial sources and were used as recommended by the manufacturers. Antibodies directed against LBPA were from Echelon Biosciences Inc (dilution 1/250), Tubulin and VPS4a from Sigma-Aldrich (dilution 1/10,000 and 1/1000 respectively), EGFR from Novacastra (dilution 1/1000), Flotilin-1, Tsg101, Rab5, Rab7, Lamp-1 and Vps36 from ABCAM (dilution 1/1000, 1/500, 1/100, 1/100, 1/250 and 1/1000 respectively), anti-human transferrin receptor from Zymed Laboratories (dilution 1/1000), Anti-phospho-ERK1/2 and anti-total ERK1/2 from Cell Signaling (dilution 1/1000). Goat anti-mouse Alexa Fluor 488, goat anti-rabbit Alexa Fluor 488, goat anti-mouse Alexa Fluor 546, goat-anti-rabbit Alex Fluor 546, goat-anti rat Alexa Fluor 488 and goat anti-rat Alexa Fluor 546 from Invitrogen (dilution 1/1000). Plasmids GFP-PrPC, GFP-PrPC-Δ1-22 and GFP-PrPC-Δ105-128 were constructed as previously described (Lee et al,

2001). Plasmids PrPC-3F4 and *N-PrPC-3F4 were constructed as previously described (Sunyach et al, 2003).

Animals

The Principles of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health publication number 85-23, 1996) was strictly followed in all experiments. The experiments were approved by the local animal care and use committee at the A.C. Camargo Cancer Center. Experiments were performed with two independent lines of PrPC-null animals designated in this study as Prnp0/0 (Zrchl) (Bueler et al., 1992) or Prnp^{-/-} (Npu) (Manson et al., 1994) and their respective wild-type controls, Prnp^{+/+} (Zrchl) and Prnp wt/wt (Npu). Zrchl Prnp0/0 mice were provided by Dr. C. Weissmann (Scripps Florida, Jupiter, FL) (Bueler et al., 1992), and the wild-type control mice (Zrchl Prnp^{+/+}) were generated by crossing F1 descendants from 129/SV and C57BL/6J mating. PrPC-null mice (Prnp^{-/-}) were provided by Drs. Bruce Chesebro and Richard Race (Rocky Mountain Laboratories, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, MT) and are descendants from the Npu line (Manson et al., 1994). The Prnp^{-/-} mice were backcrossed to C57BL/10 mice for at least eight generations as previously described (Lima et al., 2007).

Primary cortical astrocyte cultures

Astrocyte primary cultures were prepared as previously described (Lima et al., 2007) from the cerebral hemispheres of embryonic day 17 (E17) wild-type and PrPC-null mice. Briefly, single cell suspensions were obtained by dissociating cerebral hemispheres in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with glucose (33 mM), glutamine, penicillin/streptomycin and sodium bicarbonate (3 mM). Cells were plated on pre-coated poly-L-lysine plates and grown in DMEM enriched with 10% FCS. The medium was changed every 2 days. For transfection experiments, confluent astrocytes were transfected using 10 μ g of lipofectamine and 5 μ g of DNA in OPTIMEM (Invitrogen). After 4h, the medium was changed to DMEM enriched with 10% FCS.

Primary hippocampal neuronal cultures

Primary hippocampal cultures were prepared as previously described (Lopes et al., 2005). Briefly, the hippocampal structure was dissected in HBSS and treated with trypsin (0.06%) in HBSS for 20 min at 37°C. The protease was inactivated with 10%

fetal calf serum (FCS) in Neurobasal medium for 5 min. After three washes with HBSS, cells were mechanically dissociated in Neurobasal medium containing B-27 supplement, glutamine (2mM), penicillin/streptomycin (100µg/ml). Cells (106) were plated onto 35mm plates coated with 5 µg/ml poly-L-lysine.

Preparation of Astrocyte Conditioned Media and Fractionation

Prior to experiments, FCS was centrifuged for 16 hours at 100,000 xg to remove endogenous EVs. CM was prepared as previously described (Lima et al., 2007). Confluent astrocytes grown in 100mm culture dishes were washed 3 times with phosphate-buffered saline (PBS) and covered with serum-free medium for 48h. The conditioned medium (CM) was collected on ice and pre-cleared from all cell debris by sequential filtering (0,22µm) and centrifugation (1,500 xg for 10 min, 4,500 xg for 10 minutes and 10,000 xg for 60 minutes). Fractionation was performed by sequential ultracentrifugation at 100,000 xg for 1h, 2h and 16h, in a SW40Ti rotor (Beckman-Coulter).

For fractionation by gel filtration chromatography, CM was 10-fold concentrated in an Amicon concentrator (Millipore). One milliliter of concentrated CM was fractionated by gel filtration using a 50 cm column packed with Superose 12 prep grade with a 3,000-kDa exclusion (GE). Thirty fractions of 3,5ml each were collected and analyzed.

Silver Staining

Fractionated CM was subjected to SDS-PAGE and the gel was silver stained. Briefly, gel was fixed in 50% methanol and stained in 0.8% AgNO₃, 1.4% NH₄OH and 0.0756% NaOH. Color was developed with 0.005% citric acid and 0.05% formaldehyde and the reaction was blocked by the addition 45% methanol and 10% acetic acid.

Lipid analysis

For lipid formation, 60% confluent astrocytes were labeled with 1µCi/ml of miristic acid [3H]. After 72h, cells were washed 3 times with PBS and covered with serum-free medium for 48h. CM was fractionated by gel filtration chromatography. Lipids were extracted from the fractions by chlorophorm-methanol (1:1), dried, resuspended in 100µl chlorophorm and transferred to scintillation vials for [3H]

incorporation measure using a Beckmann Coulter LS6500 multipurpose Scintillation counter.

ERK phosphorylation

Primary hippocampal cell cultures (106 cells) from either Prnp^{+/+} or Prnp^{0/0} were plated on dishes pretreated with poly-L-lysine. The cells were stimulated with 10-fold concentrated CM or CM fractions from ultracentrifugation. After 30 seconds, the cells were rinsed once with ice-cold PBS and lysed in Laemmli buffer. For assaying ERK1/2 phosphorylation, cell extracts were subject to SDS-PAGE, followed by immunoblotting with anti-phospho-ERK1/2 and anti-total ERK1/2 antibodies (Cell Signaling). The bands obtained after x-ray film exposure to the membranes were analyzed by densitometric scanning and quantified using the Scion (Frederick, MD) Image software. Values represent the ratio between phospho-ERK (p42 plus p44) and total ERK (p42 plus p44) for each sample. Untreated Prnp^{+/+} or Prnp^{0/0} values were set as 1.0, and the others are relative to it.

EVs analysis and quantification

Conditioned medium was centrifuged for 16 hours at 100,000 xg to isolate EVs, the pellet was resuspended in 1 mL of PBS and the number of particles and particle size was counted by a nanoparticle tracking analysis device (Nanosight LM20, coupled to a CCD camera and a laser emitting a 60-mW beam at 405-nm wavelength). The acquisitions were performed in five records of 60 s using the following parameters: shutter of 604, gain of 100, and threshold of 10. At least 1,000 particles were tracked in each sample.

Small interfering RNA transfection

To silence PrPC, wild type astrocytes were transfected with small interfering RNA (siRNA) using a non-specific siRNA as control. The target sequences in the mouse PrPC gene was GGUUUUUGGUUGCUGGGCTT. As a negative control for siRNA, an RNA sequence scramble (5'UGUUGUUGGCGUUUGUGGCTT3') was used. Astrocytes were seeded on 100 mm plates and at the time of transfection, the cells were 70–90% confluent and 200 pmol of RNA duplexes were transfected using lipofectamine 2000 reagent according to the manufacturer's instructions. To evaluate the specific silencing of PrPC, after 24 h of transfection, total cell lysates

from siRNA transfected or not transfected cells were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-PrPC and anti- α -tubulin antibodies.

Isolation of serum EVs from mice

The mice were bled by cardiac puncture, the blood samples were allowed to clot. To obtain the serum platelet free, the blood was centrifuged twice at 1500 g for 15 min at room temperature. The sera were further centrifuged at 10 000 g for 30 min at 4° to remove cell debris, followed by an ultracentrifugation at 100 000 g for 2 hr. The pellet fraction was resuspended in PBS and washed once. The pellet fraction was ultimately collected and resuspended in PBS.

Electron microscopy

Astrocytes obtained from primary cultures were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer, pH 7.2, for 2 hours at room temperature, post-fixed in 1% osmium tetroxide + 0.8% potassium ferricyanide + 5mM calcium chloride in 0.1M cacodylate buffer, pH 7.2, on ice for 1 hour and blockstained (fixed) with 1% uranyl acetate in maleate buffer at 4°C for 1 hour. After dehydration in a graded series in ethanol at 4°C, samples were infiltrated in ethanol/epon mixtures and polymerized in pure epon at 60°C for 48 hours. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and observed in a Zeiss EM 900 transmission electron microscope.

Isolation of lipid rafts

Primary astrocytes were lysed for 10 minutes in cold in TNE (10mM Tris HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, and 5 mM EDTA) buffer with 1% Triton X-100, protease and phosphatase inhibitors. The solution after lysis was centrifuged at 1300 g for 5 minutes. 1ml of the cleared supernatant was mixed with 85% sucrose in TNE buffer and layered at the bottom of a Beckman 12 ml centrifuge tube. The lysate was overlaid with 4 ml of 35% sucrose in TNE buffer and finally with 4 ml of 5% sucrose in TNE buffer. The samples were centrifuged in a SW41 rotor at 39,000 rpm for 18h at 4°C. At the end of the run, 1ml fractions were collected from the top of the gradient and proteins were precipitated with TCA 15%. The samples were subjected to a reducing 4–12% gradient SDS PAGE and western blotting analysis.

Transferrin Uptake

Primary astrocytes grown on coverslips were washed and pre-incubated with serum free DMEM for 2 hrs. Cells were then incubated with 5 µg/ml of Alexa594 conjugated transferrin (Molecular Probes) in serum-free medium for 1 hr at 4°C. Cells were then shifted to 37°C for 5 and 15min, washed with PBS twice and fixed in 4% formaldehyde. For quantitative analysis, the fluorescence stained area of internalized transferrin was measured using ImageJ software (n = 100 cells).

CTxB uptake assay and quantification

Lipid raft labeling was performed using the Vybrant Alexa-Fluor-488 Lipid Raft labeling kit using the manufacturer's protocol (Invitrogen). Briefly, live cells were washed with ice-cold PBS, labeled with Alexa-Fluor-488-conjugated Ctx-B, and cross-linked with anti-Ctx-B antibody in serum-free medium for 15 minutes at 4°C. Cells were then shifted to 37°C for 10,30,45 and 60 minutes washed with PBS twice and fixed in 4% formaldehyde, nuclei stained with Draq5 and mounted on slides before imaging with a Leica SP5 confocal system. For quantitative analysis, the fluorescence stained area of internalized transferrin was measured using ImageJ software (n = 100 cells).

EGFR degradation assay.

Primary astrocytes were incubated in serum-free DMEM medium for 2 hours prior to incubation with 100 ng/ml EGF (Sigma) diluted in serum-free DMEM medium on ice for 30 min. A control plate was incubated in serum-free DMEM medium in the absence of EGF. At the end of the incubation, the unbound ligand was removed by washing, warm serum-free DMEM medium was added, and the cells were incubated at 37°C for the indicated times. To stop endocytic processing, the cells were chilled and lysates were prepared in buffer containing protease inhibitors. The lysates were subjected to immunoblotting to assay for the EGFR.

To fluorescence approach primary astrocytes cells were cultured on coverslips in 24-well plates and incubated for 2 h in serum-free DMEM medium. The cells were chilled on ice and incubated with 2 µg/ml EGF conjugated to Alexa 488 (Invitrogen) for 1 h. Unbound ligand was washed off, and the plates were shifted to 37°C to initiate endocytosis. At indicated times, the cells were removed, fixed in 4% paraformaldehyde, and stained for LAMP1 using specific antibody.

Immunofluorescence staining and confocal microscopy

Cultured cells on glass coverslips were fixed with 4% PFA for 20 min at room temperature, washed in PBS and then incubated with the indicated antibodies with PBS containing 0,5% BSA. Coverslips were mounted using Fluor-Save reagent (Calbiochem). All fluorescent images were acquired on a Leica TCS SP5 confocal microscope. Confocal images were analysed using ImageJ and Photoshop software.

Results

PrP^C knockout astrocytes have reduced EV secretion and stimulation of neuronal ERK1/2

Since *Prnp*^{0/0} astrocytes have a defect in producing secreted factors that support neuronal survival and differentiation (Lima et al., 2009), we evaluated if this could be due to a decrease in EV production or release. We first analyzed the number of particles in the CM from wild-type or *Prnp*^{0/0} astrocytes by nanoparticle tracking analysis (NTA). We observed that CM from *Prnp*^{0/0} astrocytes has approximately 4 times less particles than wild-type CM (Fig 1a). Additionally, acetylcholinesterase activity, a marker commonly associated to the presence of exosomes (Johnstone et al., 1989), was also decreased in *Prnp*^{0/0} CM (Fig 1b).

We further characterized the reduced presence of EVs in *Prnp*^{0/0} CM by biochemical separation of different components of the CM. EVs were isolated by sequential centrifugation of astrocyte conditioned media (CM) at 100,000 xg for 1, 2 and 16h (Hajj et al 2013) and the presence of markers commonly found on exosomes fractions was evaluated. We observed a reduction on the presence of the transferrin receptor (TfR), Heat Shock Protein of 90kDa (HSP90) and Heat Shock Protein of 70kDa (HSP70) on all fractions from *Prnp*^{0/0} (Fig 1c). The total protein content in ultracentrifugation pellets and supernatant was also evaluated by silver stained SDS-PAGE. While not much can be observed in fractions from 1 and 2 hours of centrifugation, after 16 hours of centrifugation the protein content in pellets and supernatant of CM from wild-type astrocytes is much higher than in CM from *Prnp*^{0/0} cells (Fig. 1d).

We also evaluated CM of cells from both genotypes for the presence of [3H]-myristic acid, a lipid precursor that is incorporated into biological membranes. Astrocytes were labeled by cell incubation with [3H]-myristic acid for 24 hours. Cells were washed and the media was conditioned for 48 hours. The media was then

separated by gel filtration chromatography, which is able to isolate three populations of EVs based on size (Hajj et al 2013). The analysis of lipid content in CM derived from wild-type and *Prnp*^{0/0} astrocytes showed that lipids were observed in fractions: 1-2, 5-6 and 11-12. However, the lipid amount was reduced approximately 20 fold in CM from *Prnp*^{0/0} astrocytes (Fig. 1e). Together, these results indicate that astrocytes from *Prnp*^{0/0} astrocytes secrete fewer EVs.

One of the biological functions attributed to EVs from astrocytes was the ability of activating ERK1/2 signaling in neurons (Hajj et al 2013). To address if despite presenting a reduced number of EVs, CM from *Prnp*^{0/0} astrocytes still possesses biological activity, neuronal ERK1/2 activation was evaluated. CM from wild-type astrocytes was able to induce neuronal ERK1/2 activation, while CM from *Prnp*^{0/0} astrocytes was not. However, 5 times more CM from *Prnp*^{0/0} astrocytes was able to induce ERK1/2 activation in a similar manner of that presented by CM from wild-type astrocytes (Fig. 1f). To identify if the reduced ERK1/2 activation could be due to a reduction in a specific EV subpopulation, pellets from CM centrifugation for 1,2 and 16 hrs were tested for the ability to stimulate ERK1/2 in neurons. Both pellets and soluble fractions of CM from *Prnp*^{0/0} astrocytes were unable to induce neuronal ERK1/2 activation (Fig 1g). These results indicate that a reduced activity of CM from *Prnp*^{0/0} astrocytes could be attributed to the decreased release of both soluble factors and vesicles.

Modulation of PrP^C alters EV secretion

To examine the effect of PrP^C on EVs secretion, CM of several cell types was measured by NTA. In PrP^C knockout astrocytes, independently on the genetic background (ZurichI *Prnp*^{0/0} and EdinburghI *Prnp*^{-/-}), we observed a decreased number of vesicles, whereas in astrocytes overexpressing PrP^C (from TG20 mice) the number of vesicles in CM is considerably higher than that from wild-type cells (Fig 2a). Our analysis showed no significant differences in size of EVs (Supplementary Figure 1A). To demonstrate that the effect of PrP^C in the release of EVs is a mechanism independent of cell type, we also measured the EVs in CM from primary embryonic fibroblasts (PMEF) obtained from wild-type, *Prnp*^{0/0} and Tg20 mice. Again, the CM from *Prnp*^{0/0} cells has less EVs when compared to CM from WT and TG20 cells (Figure 2B).

Additionally to secretion by cell cultures, EVs can also be detected in body fluids, including blood. We collected blood plasma from above mentioned animals

and evaluated the number of circulating EVs. We also found a significant decrease in the number of circulating vesicles in the plasma of *Prnp*^{0/0} animals (Figure 2C). Taken together our data point to a relationship between the PrP^C expression and the number of secreted EVs.

To demonstrate that the effect of decreasing EVs secretion is PrP^C dependent, we performed experiments knocking down PrP^C expression by siRNA (Supplementary Fig 1B) or reintroducing PrP^C in *Prnp*^{0/0} astrocytes. PrP^C knockdown decreased EV secretion (Fig. 2D), whereas PrP^C reintroduction was capable of restoring the secretion of EVs to near wild-type levels (Figure 2E). A PrPC mutant that is correctly inserted into the plasma membrane but is not capable of being endocytosed (Harris et al , 2003) (*N- PrP-3F4) was also capable of restoring EVs secretion (Fig. 2E). The transfection of *Prnp*^{0/0} astrocytes with PrPC in a different expression vector (GFP) showed the same result in restoring EVs secretion (Figure 2F). The same result was obtained by transfecting the PrP^C mutant Δ 105 -128, which lacks a hydrophobic region important to prion pathogenesis. On the other hand, targeting PrP^C to the cytosol by deleting its amino-terminal leader peptide (which targets PrPc to the endoplasmic reticulum and to the secretory pathway) (PrP^C Δ 1 -22) did not restore EV secretion (Figure 2F). These results demonstrate that the PrP^C protein is important for the modulation of EV secretion and to perform this function the protein must be inserted into the plasma membrane.

PrPC alters caveolin internalization

The presence of lipid raft-like domains in the EVs suggests that rafts may participate in the sorting of EVs proteins (Fevrier et al. 2004; Porto-Carreiro et al. 2005; Vella et al. 2007). Since PrPC has been suggested to be a lipid raft organizer (Linden et al physiol reviews), we questioned whether PrPC could control the traffic of lipid rafts from the plasma membrane to MVBs. Endocytosis of lipid raft components can occur via clathrin-dependent and -independent pathways (Zurzolo et al.,2009). We first examined the clathrin-dependent endocytosis and recycling of Transferrin (Tf). Cells were pulse-labeled with fluorescent Tf for 1 h at 4°C to prevent uptake, washed, and shifted to 37°C to allow uptake and recycling for 5 and 15 minutes. We did not observed any significant difference among wild type and *Prnp* 0/0 astrocytes cells (Figure 3A).

We then examined the uptake of cholera toxin (CTxB), which uses internalization by caveolae, membrane invaginations originating from

oligomerization of caveolins that are considered to be specialized raft domains (Parton and Simons, 2007). Cells were incubated with Alexa488-conjugated cholera toxin B subunit (Alexa488-CtxB) on ice for 30 min, and transferred to 37°C for 0, 10, 30, 45 and 60 min. We observed that Alexa488-CtxB bound to the plasma membrane and was internalized to punctate endosomal structures (Figure 3B). However, much more CtxB was internalized by wild-type than by *Prnp* 0/0 cells (Figure 3B). Additionally, in wild-type astrocytes, CtxB was further transported to the perinuclear region, whereas in *Prnp* 0/0 cells CtxB remained near the cell periphery. The lipid raft composition as observed by flotilin-1 distribution was the same in wild-type and *Prnp*0/0 cells (Supplementary figure 2A). Our results demonstrate that in the absence of PrPC, caveolae dependent trafficking is impaired, reducing the cargo input for MVB formation.

In the endocytic pathway, MVBs form from early endosomes and fuse with late endosomes or lysosomes (Gruenberg and Stenmark, 2004; Katzmann et al., 2002). We therefore studied the effect of PrPC absence on endocytic compartments distribution using the early-endosomal marker Rab5 and the late-endosomal marker Rab7. In both cells, early endosomes were dispersed throughout the cell in very similar levels (Figure 3C). Late endosomes were localized to the perinuclear region also in very similar levels in both cells (Figure 3C).

PrPC regulates endocytic pathways associated with MVB formation

Since the majority of EVs released by astrocytes are derived from ILVs of MVBs (Hajj et al), we used transmission electron microscopy to examine the ultrastructural morphology of MVBs in both WT and *Prnp*^{0/0} astrocytes. Multivesicular structures with the characteristic MVB morphology were found in wild-type cells (Figure 4A left panels). By contrast, in *Prnp*^{0/0} cells the MVBs did not contain intraluminal vesicles (Figure 4A, right panels). We further analyzed the distribution of the lysobisphosphatidic acid (LBPA), which is incorporated into the intraluminal vesicles of MVBs ([Kobayashi et al., 1998](#); Wherrett and Huterer, 1972). We labeled astrocytes with anti-LBPA antibody and analyzed cells by confocal microscopy. Wild-type cells show a subcellular distribution of LBPA staining in puncta pattern especially in perinuclear area, while in *Prnp*^{0/0} cells very little staining was observed. When *Prnp*^{0/0} cells were transfected to restore PrPC expression, we could see a recovery of LBPA staining in the perinuclear area (Figure 4B). Expression levels of ESCRT proteins involved in MVB sorting, such as

Flotilin-1, Tsg101, Vps36 and Vps4 by western blotting were not altered between wild-type and Prnp 0/0 cells (Supplementary figure 2B).

To clarify the functional specificity of PrP^C in MVB formation, we observed EGFR trafficking, which is classically targeted to ILVs/MVBs before its lysosomal degradation. WT or *Prnp*^{0/0} cells were stimulated with EGF for 30 minutes and either lysed immediately or after 30, 60, 120 and 180 minutes. The amounts of EGF receptors were measured by western blotting. Our experiments showed that, in *Prnp*^{0/0} cells, the degradation of EGFR induced by EGF stimulation was reduced compared with wild-type cells (Figure 4C). The same result was obtained when the cells were incubated with Alexa488-EGF and the degradation of the fluorescent tagged EGF was visualized by confocal microscopy. As shown in Figure 4D, *Prnp*^{0/0} cells retain most part of Alexa488-EGF even after 180 minutes of incubation. These experiments indicate that PrPC has an impact on ILV budding in endosomes to form MVB and support a role for PrPC in EV biogenesis.

PrPC deregulates autophagy and lysosomal degradation

Since EGFR internalization is delayed in Prnp0/0 cells, we sought to verify lysosomal activity in these cells. The lysosomal marker LAMP-1 was dispersed widely throughout wild-type cells (Fig. 5A, left panel), whereas lysosomes in Prnp0/0 cells were larger and aggregated in the perinuclear region (Figure 5A, right panel).

The lysosomal marker LAMP-1 was also colocalized with EGFR. In wild-type cells, EGF (green) colocalized to lysosomes (red) by 60 min of endocytosis. In contrast, most of the EGF colocalize with LAMP-1 in Prnp^{0/0} cells after 120 min (Figure 5B). These results indicate that the trafficking of EGFR to lysosomes is delayed in the absence of PrP^C. Taken together, these data indicate that PrP^C knockout impairs the post-internalization degradation of EGFR and suggests that PrP^C might also function in late endosomal trafficking of towards lysosomes.

Lysosomal degradation can also impact autophagy pathways. We thus evaluated autophagy status by electron microscopy and observed an increased number of autophagosomes in Prnp0/0 cells. Additionally, Prnp0/0 cells also show an accumulation of autophagosomes, visualized by LC3II puncta, that is further increased in serum starvation or rapamycin, treatments that increase autophagy rates (Figure 5D).

In summary, all the results presented here support new intracellular roles for PrP^C as a regulator of endocytic pathways, specifically ILV formation and EVs biogenesis.

DISCUSSION

Glial cells actively participate in brain development and function, thus the communication between neurons and glia is essential (Allen and Barres, 2009). Glial cells release a heterogeneous population of EVs (Hajj et al, 2013), raising the possibility that communication mediated by EVs is a common mechanism in the CNS. The role of PrP^C upon protein secretion by astrocytes has important implications, particularly to neuronal survival and differentiation. Conditioned media from PrPC-null astrocytes was not able to induce neuronal survival and differentiation (Lima et al., 2007). Data presented here can explain this effect by the absence of secretion of neurotrophic proteins associated to EVs. In fact, our results shown that EVs derived from PrP^C-null mice were incapable to activate ERK1/2 signaling in neurons.

The role of EVs in neuroprotection is evidenced by the fact that they are involved in the regeneration of peripheral nerves and repair of neuronal injuries (reviewed by Kalani et al, 2014). Additionally, glial cells may release synapsin in EVs in response to stressful conditions such as oxidative stress, and/or ischemia, modulating neuronal outgrowth and neuron–glia interactions (Wang et al, 2011). Interestingly, PrPc-null mice are more susceptible to neuronal loss after experimental brain injury (Hoshino et al, 2003), which could be associated with failure to release EVs.

PrP^C function on EV secretion is not cell-type specific, since fibroblasts and even blood from PrP^C-null mice display decreased EVs. Since blood is a physiological fluid for EVs circulation in the body, suggesting a role for EVs in cell–cell or organ–organ communications, the systemic effects of EVs reduction in circulation of Prnp0/0 animals needs to be explored.

Our results demonstrated that PrP^C should be localized at plasma membrane to induce EVs biogenesis, as knockout cells re-expressing PrP lacking signal peptide (Δ 1-22) this effect was not observed. The role of plasma membrane proteins in the EVs formation has been recently explored. Baietti et al, 2012 shown that syndecans, which are transmembrane heparan sulphate proteoglycans (HS), could bind the cytoplasmatic soluble protein syntenin which in turn connects syndecans to

ALIX, an auxiliary component of the ESCRT machinery that supports endosomal membrane budding (Baietti et al, 2012). In fact, PrP^C has several heparin-binding sites both in the N-terminal unstructured region and in the PrP27–30 core (Warner et al, 2002) (Schonberger et al, 2003).

Another possible mechanism of PrP^C controlling EV formation is by its association with lipid rafts. Published data suggests that PrP^C might act as a lipid rafts organizer due to its ability to connect several membrane receptors, modulating their activity (Linden R., et al., 2008). PrPc also interacts with lipid rafts proteins involved in endocytosis, such as as Flotilin-1 (Ren et al, 2013) and caveolin-1 (Shi et al, 2013). EVs are enriched in proteins that associate with lipid rafts (Wubbolts et al., 2003). For example, association of AnxA2 to lipid rafts is followed by its transport along the endocytic pathway and incorporation in ILVs (Valapala and Vishwanatha,2011). Our results demonstrate that in the absence of PrP^C, there is a deficiency in the endocytosis of Cholera toxin, which is lipid-raft mediated. The absence of PrPc also affected ILV formation, with the presence of empty MVBs, reduced amounts of LBPA and reduced EGF degradation. In fact, interference with the function of Hrs or components of ESCRT-I has been shown to inhibit EGF or EGFR degradation (Babst et al, 2000; Chin et al, 2001; Bishop et al, 2002; Urbe et al, 2003; Bache et al, 2004). These evidences suggest that PrP^C could modulate EV formation by an essential role in the lipid raft dependent endocytic pathway.

Alterations in endocytic pathways triggered by the absence of PrPc also produced remarkable effect in lysosomes and autophagosomes. It has been reported that when MVB formation is hampered, immature autophagosomes do not fuse with lysosomes and accumulate in the cytosol (Lamb et al., 2007). Accordingly, accumulation of immature autophagosomes is observed in PrPc knockout cells. Interestingly, autophagosome accumulation is observed neurodegenerative disorders that have a dysfunction in endolysosomal traffic (Barbieri et al., 2011 , Settembre et al., 2008).

In summary, our findings indicate new functions for PrP^C protein controlling the vesicular trafficking involved in MVB formation. This unpredicted function of PrP^C may have important implications upon neuroprotection, neuronal differentiation and also in prion diseases, where the release of PrP^{Sc} in EVs is important for prion spread.

Acknowledgments: FAPESP grants to VRM (XXXXX) and GNMH (2012/04370-4) are gratefully acknowledged. MVSD, BLT, BRR and MR received fellowships from FAPESP.

Figure Legends

Figure 1 - a: Indicated astrocyte CM was collected after 48 hours of serum free growth and centrifuged at 100.000g for 16 hours. The pellets were resuspended in PBS and the concentration of EVs was measured by Nanosight LM-10. **b:** Indicated astrocyte CM was collected after 48 hours of serum free growth and centrifuged at 100.000g for 16 hours. The released EVs were collected and EV-associated AChE was measured. **c:** CM was sequentially ultracentrifugated for 1, 2 and 16 hours, and the fractions and supernatant were separated by SDS-PAGE followed by immunoblots for Transferin Receptor (TfR), Hsp90, Hsp70, and PrPc. **d:** CM was centrifuged for 1, 2 and 16h and the fractions (pellet and supernatant) were submitted to SDS-PAGE followed by silver staining. **e:** Semi confluent wild type and *Prnp^{0/0}* astrocytes cultures were labeled with miristic acid-T[H]3, a lipidic precursor. After 3 days, the cells were washed with PBS and the medium was conditioned. After 48hs the CM was separated through gel filtration and the lipids were extracted by methanol-clorophorm. The fractions were then counted by scintillation. **f:** Hippocampal neurons were treated with *Prnp0/0* CM pellet, *Prnp0/0* CM pellet in a concentration five times higher or with *Prnp0/0* CM pellet in association with recombinant PrPC. ERK phosphorylation was measured through immunoblotting assays using antibodies against phospho- ERK and ERK (p44/p42). Immunoblots were quantified by densitometry. The control was set as 1 and values represent the percentage thereof. Statistical analysis were tested by single mean Student's t-test ($p < 0,01$). **g:** *Prnp0/0* CM was centrifuged for 1, 2 and 16h and the fractions (pellet and super) were added to hippocampal neurons. Cells were lysed and immunoblotted against phospho-ERK1/2 and ERK1/2. Immunoblots were quantified by densitometry. The control was set as 1 and values represent the percentage thereof. Statistical analysis were tested by single mean Student's t-test ($p < 0,01$).

Figure 2 - Indicated astrocyte CM was collected after 48 hours of serum free growth and centrifuged at 100.000g for 16 hours. The pellets were resuspended in PBS and the concentration of EVs was measured by Nanosight LM-10. Quantification (A) of EVs in astrocyte CM *Prnp + / +*, *Prnp 0/0* and TG20 (ZurichI) and quantification of

EVs in astrocyte CM *Prnp* + / + and *Prnp* - / - (EdinburghI). (B) - Quantification of EVs in CM from primary fibroblast cultures *Prnp* + / +, *Prnp* 0/0 and TG20. (C)- Quantification of EVs in astrocyte CM *Prnp* + / + and *Prnp* + / + silenced for expression of PrPC with irrelevant RNAi or RNAi. (D) Quantification of EVs in the purified plasma from the whole blood of animals *Prnp* + / +, *Prnp* 0/0 and TG20. (E) Quantification of EVs in astrocyte CM from *Prnp* +/+, *Prnp* 0/0 and *Prnp* 0/0 cells transfected with the following plasmids: pcDNA3, 3F4-PrP and, * N-3F4-PrP. (F) - Quantification of EVs in astrocyte CM *Prnp* +/+, *Prnp* 0/0 and *Prnp* 0/0 transfected with the following plasmids: GFP-PrP, PrP-GFP-Δ1-22, PrP-GFP-Δ105-128. Statistical analyses were done by ANOVA followed by Tukey's post hoc test. (p<0.05).

Figure 3 – (A) *Prnp* +/+ and *Prnp* 0/0 astrocytes were incubated for 30 min on ice in medium with 50 µg/ml Tf-Alexa-545 before warming up to 37 °C for different time points. The amount of internalized transferrin was determined by confocal microscopy analysis. The images were taken and stained area was analyzed by ImageJ software. Scale bar,10 µm. **(B)** - *Prnp* +/+ and *Prnp* 0/0 astrocytes cells were washed twice with serum-free medium and incubated with CTxB labeled with Alexa Fluor 488 (1 µg/ml) at 37°C for the indicated periods. The uptake was stopped at the indicated time points, and then the cells were fixed and observed with a confocal microscope. The images were taken and stained area was analyzed by ImageJ software. Scale bar,10 µm. Statistical analyses were done by ANOVA followed by Tukey's post hoc test. (p<0.05). **(C)** - Localization of endocytic organelle markers Rab5 (early endosome) and Rab7 (late endosome) in wild-type and *Prnp* 0/0 astrocytes. Scale bar :30 µm.

Figure 4 – (A) - Electron micrographs of ultrathin sections of wild type and *Prnp* 0/0 cells. Arrows showed the MVBs details. **(B)** – Lysobisphosphatidic acid (LBPA) distribution in *Prnp* +/+, *Prnp* 0/0 and *Prnp* 0/0 + PrPC cells. The cells were analyzed by confocal fluorescence microscopy with anti-LBPA (green) and Draq5 (nucleus, blue). Upper panels representative images of stained cells. Scale bar 30 µm. Lower panels - zooms are × 2.5. **(C)** - Wild type and *Prnp* 0/0 cells were starved for 2 h and treated with EGF (100 ng/ml) as indicated. Cell lysates were analysed by western blotting. **(D)** - Representative single-plane confocal images of wild type and *Prnp* 0/0

cells incubated with Alexa 488-EGF on ice and then transferred to 37°C for 30,60,120 and 180 min to internalize Alexa 488-EGF. Scale bars: 50 µm.

Figure 5 – (A) – Localization of lysosomal marker Lamp-1 in wild-type and *Prnp*^{0/0} astrocytes. Upper panels, representative images. Scale bar:30 µm Lower panels - zooms are × 2.5. **(B)**- fixed wild type and *Prnp*^{0/0} cells prepared as described in figure 4D were stained with the lysosomal marker LAMP-1 (green).Scale bars: 5 µm. **(C)** - Electron micrographs of ultrathin sections of wild type and *Prnp*^{0/0} cells. There is an increase in double-membrane autophagosomes in knockout cells. **(D)** - Wild type and *Prnp*^{0/0} cells were transfected with GFP-LC3 plasmid. After transfection, the cells were incubated for 48 h in growth medium and then changed in medium without serum or rapamycin 100nM, the GFP-LC3 puncta were then detected using fluorescence microscopy. Scale bars, 10 µm.

Supplementary Figure 1 – (A) - Indicated astrocyte CM was collected after 48 hours of serum free growth and centrifuged at 100.000g for 16 hours. The pellets were resuspended in PBS and the size of EVs was measured by Nanosight LM-10. **(B)** – Astrocyte cells were transfected with RNAi for gene silencing of PrP^C or irrelevant RNAi as control. Cells were lysed and proteins subjected to SDS-PAGE followed by western blot against PrP^C antibody.

Supplementary Figure 2 – (A) - *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} astrocytes cultures were solubilized in a buffer containing 0.5% Triton. The lysates were then subjected to flotation sucrose density gradient centrifugation to separate cholesterol-rich detergent-insoluble membranes (enriched in lipid raft markers) from detergent-soluble proteins. An equal volume of each fraction was analyzed by Western blotting with antibodies against Prion protein (PrP^C), Flotilin-1 and transferrin receptor (TfR). **(B)** - Western blot analyze from expression levels of proteins Flotilin-1, Tsg101, Vps36 and Vps4 in *Prnp*^{+/+} and *Prnp*^{0/0} astrocytes.

References

Arantes C, Nomizo R, Lopes MH, Hajj GN, Lima FR, Martins VR. Prion protein and its ligand stress inducible protein 1 regulate astrocyte development. *Glia*. 2009 Oct;57(13):1439-49

Brown DR, Mohn CM. Astrocytic glutamate uptake and prion protein expression. *Glia*. 1999 Feb 1;25(3):282-92.

Coitinho AS, Freitas AR, Lopes MH, Hajj GN, Roesler R, Walz R, Rossato JI, Cammarota M, Izquierdo I, Martins VR, Brentani RR. The interaction between prion protein and laminin modulates memory consolidation. *Eur J Neurosci*. 2006 Dec;24(11):3255-64.

Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Forlenza OV, Cabral AL, Veiga SS, Juliano MA, Roesler R, Walz R, Minetti A, Izquierdo I, Martins VR, Brentani RR. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Brain Res Mol Brain Res*. 2000 Mar 10;76(1):85-92.

Hajj GN, Lopes MH, Mercadante AF, Veiga SS, da Silveira RB, Santos TG, Ribeiro KC, Juliano MA, Jacchieri SG, Zanata SM, Martins VR. Cellular prion protein interaction with vitronectin supports axonal growth and is compensated by integrins. *J Cell Sci*. 2007 Jun 1;120(Pt 11):1915-26.

Hajj GN, Arantes CP, Dias MV, Roffé M, Costa-Silva B, Lopes MH, Porto-Carreiro I, Rabachini T, Lima FR, Beraldo FH, Prado MA, Linden R, Martins VR. The unconventional secretion of stress-inducible protein 1 by a heterogeneous population of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*. 2013 Sep;70(17):3211-27.

Hajj GN, Santos TG, Cook ZS, Martins VR. Developmental expression of prion protein and its ligands stress-inducible protein 1 and vitronectin. *J Comp Neurol*. 2009 Nov 20;517(3):371-84.

Lamb CA, Dooley HC, Tooze SA. Endocytosis and autophagy: Shared machinery for degradation. *Bioessays*. 2013 Jan;35(1):34-45.

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 Dec;103(6):2164-76.

Lopes MH, Hajj GN, Muras AG, Mancini GL, Castro RM, Ribeiro KC, Brentani RR, Linden R, Martins VR. Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *J Neurosci*. 2005 Dec 7;25(49):11330-9.

Manson J, West JD, Thomson V, McBride P, Kaufman MH, Hope J. The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development*. 1992 May;115(1):117-22.

McLennan NF, Brennan PM, McNeill A, Davies I, Fotheringham A, Rennison KA, Ritchie D, Brannan F, Head MW, Ironside JW, Williams A, Bell JE. Prion protein accumulation and neuroprotection in hypoxic brain damage. *Am J Pathol*. 2004 Jul;165(1):227-35.

Prusiner SB. Prions and neurodegenerative diseases. *N Engl J Med*. 1987 Dec 17;317(25):1571-81. Review.

Robinson SW, Nugent ML, Dinsdale D, Steinert JR. Prion protein facilitates synaptic vesicle release by enhancing release probability. *Hum Mol Genet*. 2014 Sep 1;23(17):4581-96.

Roffé M, Beraldo FH, Bester R, Nunziante M, Bach C, Mancini G, Gilch S, Vorberg I, Castilho BA, Martins VR, Hajj GN. Prion protein interaction with stress-inducible protein 1 enhances neuronal protein synthesis via mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jul 20;107(29):13147-52.

Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell*. 1987 Oct 23;51(2):229-40.

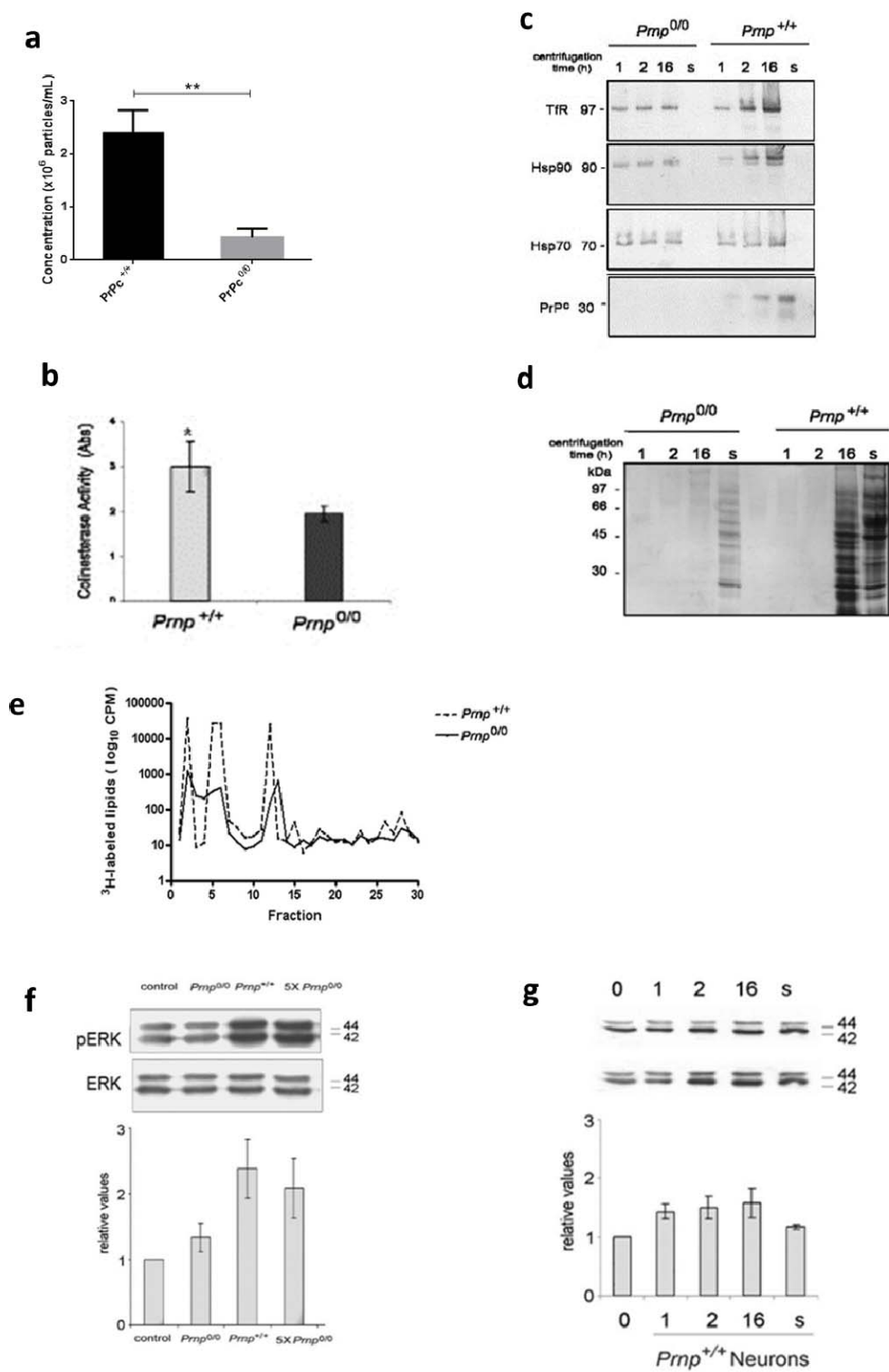


FIGURE 1

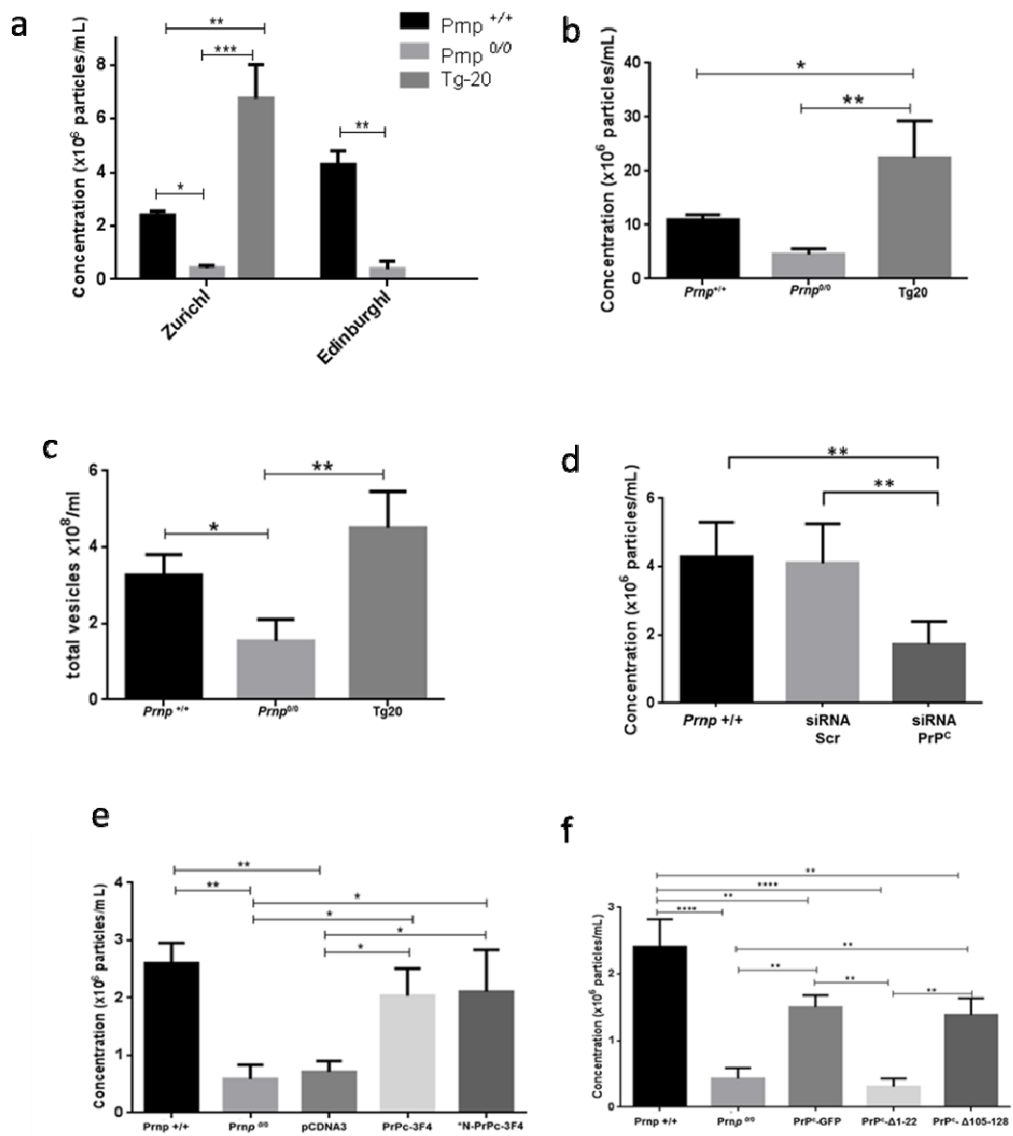


FIGURE 2

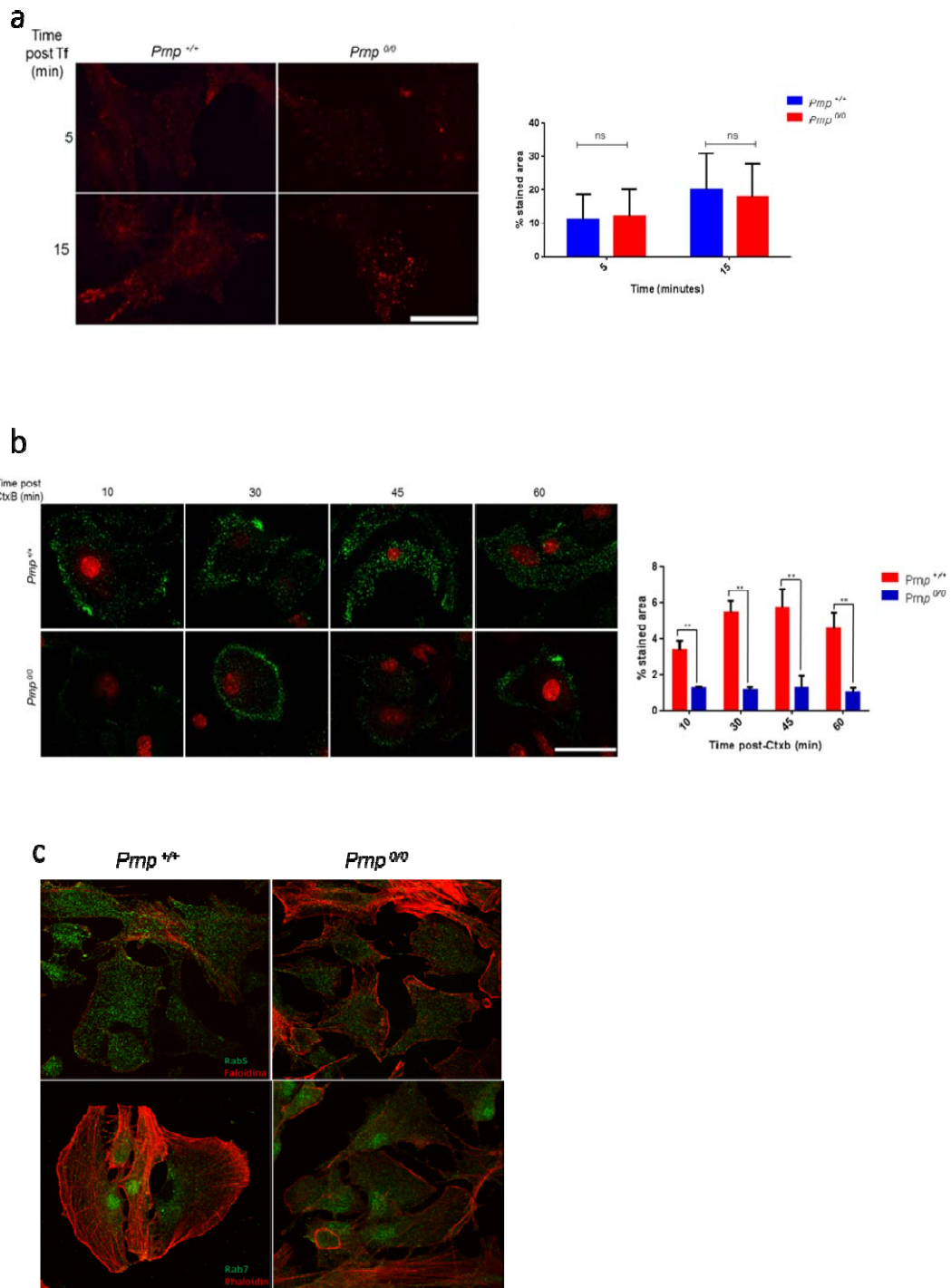


FIGURE 3

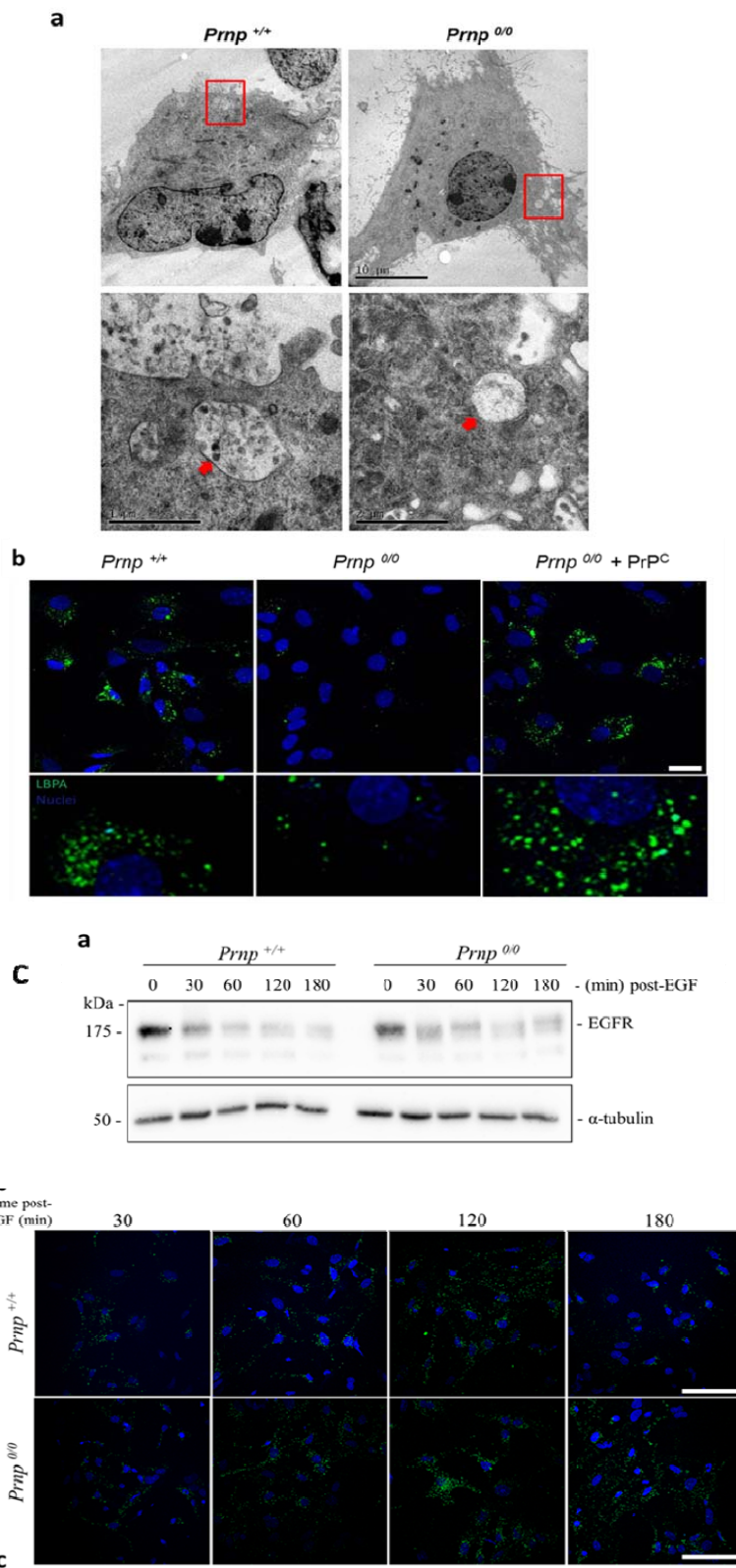


FIGURE 4

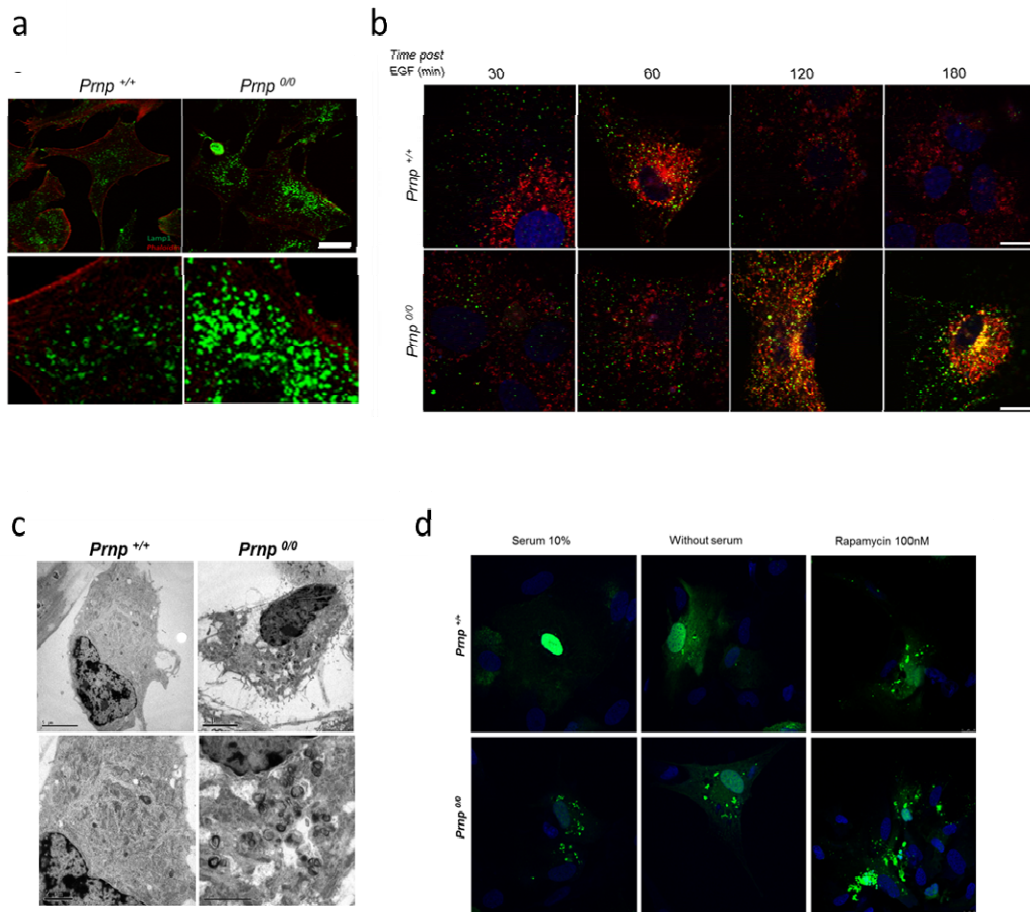
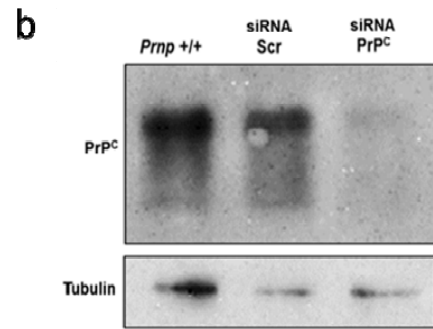
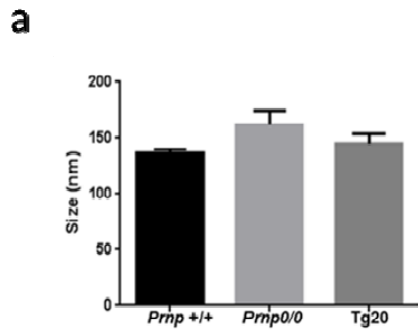
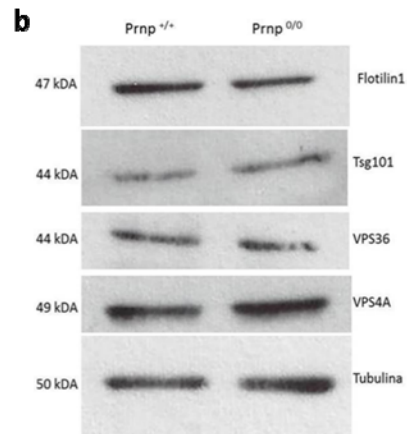
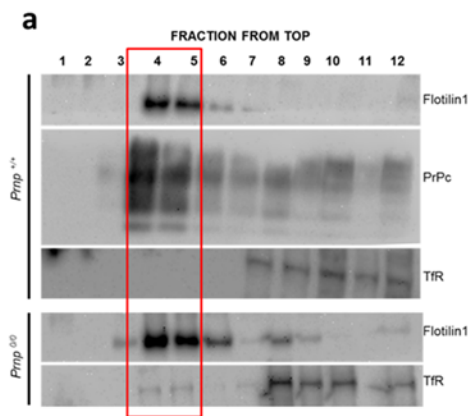


FIGURE 5



Supplementary 1



Supplementary 2