UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

CARACTERIZAÇÃO E IMPLICAÇÕES FISIOLÓGICAS DAS
INTERAÇÕES DA PROTEÍNA PRION CELULAR COM O SEU
RECEPTOR DE 60-66 kDa E COM A LAMININA

ADRIANA FROHLICH MERCADANTE
TESE DE DOUTORADO

ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO RENZO BRENTANI

SÃO PAULO
08/05/2000

"Caracterização e Implicações Fisiológicas das Interações da Proteína Prion Celular com o seu Receptor de 60-66 kDa e com a Laminina".

ADRIANA FROHLICH MERCADANTE

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS - ÁREA: BIOQUÍMICA.

Aprovado por:

Prof. Dr. RICARDO RENZO BRENTANI
IQ - USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. MARIA JÚLIA MANSO ALVES
IQ - USP

Profa. Dra. MARIA LUISA PAÇO LARSON
FMRP - USP

Prof. Dr. ADILSON LEITE
IB - UNICAMP

Prof. Dr. ROGER CHAMMAS
LUDWIG

SÃO PAULO
27 DE JUNHO DE 2000.

Aos meus pais, Beth e Pompilio, e ao meu irmão Caio, pelo apoio e estímulo constantes e pela carinhosa convivência.

À minha avó Catharina, pela torcida, pelas conversas agradáveis, pelos almoços, pelo carinho...

Ao Dion, pelo apoio, amor e carinho em todos os momentos.

Ao amigo Sandro José de Sousa por me apresentar a esse mundo fascinante da pesquisa, por me ensinar a pensar cientificamente, por sempre me incentivar e me ajudar (mesmo de longe) e também pela amizade carinhosa.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Ricardo R. Brentani, pela orientação, por me apontar soluções simples até mesmo para os problemas mais difíceis e pelos seus ensinamentos científicos e humanos, os quais foram essenciais para a minha formação.

À Dra. Vilma Regina Martins (à Vilma), pela orientação atenciosa diária, pela discussão dos resultados, pelas correções cuidadosas dos trabalhos, pelos diversos conselhos e ensinamentos e pela amizade.

Aos amigos Edgard Graner e Silvio Zanata, pelas intensas discussões dos resultados, pela ajuda e participação ativa em vários experimentos e pela convivência e grande amizade sempre bem-humoradas.

Aos meus queridos amigos do laboratório (sala 306): Ann, Kilzinha, Dri Freitinhas, Fátima, Rosa, Orestes e Ricardinho. Obrigada pelo apoio em todos os momentos, pelas inúmeras ajudas, pelos almoços e cafés, pelas risadas, pela amizade...

Às mais novas alunas do laboratório, Mari, Angelita, Glaucia e Michele, pelo interesse e pelo apoio desde já.

Ao Prof. Dr. Ivan Izquierdo (UFRGS) e aos seus alunos, em especial ao Roger Walz e ao Rafael Roesler, pelos resultados de memória e pela colaboração intensa e muito produtiva.

À Dra. Maria Aparecida Juliano, pela síntese dos peptídeos.

Ao Dr. Silvio Sanches Veiga (Sanchão!!!!), pelas idéias e sugestões, pelas conversas, pelo carinho e pelos "pagodes" de Caxambú.

Aos amigos do Instituto Ludwig, pelas conversas e sugestões no corredor e nas reuniões de quarta, pelos empréstimos de materiais, pela disponibilidade e auxílio, pelas bagunças nas festas de fim de ano e por tornar o ambiente de trabalho tão gostoso!

À Elis e à Anna Chris pelas sequências e pela disponibilidade a todo momento.

Aos Drs. Luis Fernando Reis e Andrew Simpson e às Dras. Luisa L. Villa e Célia Carneiro, pelas várias críticas e sugestões nas reuniões e também nos corredores.

Às amigas Regininha, Carol, Miriam e Robertinha, companheiras de divertidos congressos, pela descontração, pelo apoio e pela amizade carinhosa.

Ao Fernando e à Carol (de novo!), por terem se lembrado de mim, me chamando para conhecer o Instituto (foi assim que tudo começou...).

Ao Seu Eudes, por mostrar sempre o lado bom da vida, pelo exemplo de pessoa e pelos inúmeros consertos, junto com o Seu Sampa. "Maravilha!!!"

Aos queridos Chambinho, Isabel e Tia Conceição, pela disponibilidade, pelas conversas e pelo carinho.

À Zilinha, pelo carinho e por tornar os nossos dias mais divertidos com suas histórias.

Ao Lionel, pelas várias figuras e pelas risadas.

Ao pessoal da Administração do Instituto Ludwig e à Lourdes Cardoso, que sempre foram extremamente prestativos.

Ao Eric, ao Victor e à Daniela, pelos empréstimos e por serem sempre tão solícitos e atenciosos.

À Mirinha, pelos seus cuidados e carinho durante todos esses anos e pela sua ótima companhia.

À família Glasberg, sempre presente em todos os momentos, pelo apoio e pela convivência maravilhosa durante esses vários anos.

Aos meus amigos e familiares, pelo apoio carinhoso e pela torcida.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	3
ABREVIACÕES	4
1. INTRODUÇÃO	6
1.1 PRIONS	7
1.2 A DESCOBERTA DA PROTEÍNA PRION	9
1.3 O GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA PRION CELULAR E SUA EXPRESSÃO	10
1.4 A PROTEÍNA PRION CELULAR (PrP _c)	13
A) Estrutura	13
B) Função	13
1.5 O MECANISMO DE PROPAGAÇÃO DOS PRIONS	15
A) A conversão PrP _c →PrP ^{Sc}	15
B) A hipótese de um vírus "scrapie"	19
1.6 ESTUDOS EM ANIMAIS TRANSGÊNICOS E A BARREIRA ESPÉCIE ESPECÍFICA	19
1.7 DOENÇAS CAUSADAS POR PRIONS	20
A) Em animais	21
B) Em homens	23
1.8 POSSÍVEIS ROTAS DE ACESSO DO PrP ^{Sc} AO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	26
1.9 LIGANTES DE PrP _c	27
1.10 O RECEPTOR DE 60-66 kDa	29
1.11 AS PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR E O PROCESSO DE AMILOIDOGENESE	33
1.12 A LAMININA (LN)	34
1.13 PRODUÇÃO DE PrP _c RECOMBINANTE EM SISTEMA HETERÓLOGO	38
2.OBJETIVOS	44
3. MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 PRODUÇÃO DE PrP _c MURINO RECOMBINANTE EM SISTEMA HETERÓLOGO (<u>E.coli</u>)	45
A) Sistema de expressão GST	45

<u>Extração de DNA de cérebro de camundongo</u>	45
<u>Amplificação do gene que codifica PrPc de camundongo</u>	45
<u>Coloração pela prata</u>	46
<u>Digestão com enzimas de restrição</u>	46
<u>Reação de ligação</u>	47
<u>Transformação dos produtos das ligações</u>	47
<u>Sequenciamento</u>	47
<u>Expressão e purificação de PrPc-GST em <i>E.coli</i> DH5α (conforme WEISS e cols., 1995)</u>	48
<u>"Western blot" com GST-PrPc</u>	48
<u>Digestão com proteinase K</u>	49
<u>Eluição de GST-PrPc da glutathiona-Sepharose com glutathiona reduzida livre</u>	49
<u>Digestão de GST-PrPc com trombina</u>	49
B) Sistema de expressão baseado na cauda de histidinas	50
<u>Expressão e purificação de His₆-PrPc em bactéria (conforme ZAHN e cols., 1997)</u>	50
<u>"Western blot" com His₆-PrPc</u>	50
3.2 CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO PrPc/RECEPTOR	51
<u>Peptídeo complementar e imunização dos camundongos</u>	51
<u>"Western blots" em extratos total e de membrana de cérebro de camundongo</u>	51
<u>Ensaio de ligação entre GST-PrPc e extratos contendo o receptor de 60-66 kDa</u>	52
<u>Ensaio de citometria de fluxo</u>	53
3.3 CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO PrPc/LAMININA	53
<u>Ensaio de ligação entre laminina e GST-PrPc separado eletroforéticamente ("LN-overlay assay")</u>	53
<u>Marcação de laminina com iodo 125</u>	54
<u>Curva de ligação entre laminina marcada e GST-PrPc</u>	54
<u>Ensaio de competição da ligação entre laminina e GST-PrPc com peptídeos específicos</u>	54
<u>Ensaio de ligação usando ¹²⁵I His₆-PrPc</u>	55
<u>Experimento de esquiva inibitória</u>	56
4. RESULTADOS	58
4.1 QUANTO À PRODUÇÃO DE PrPc EM SISTEMA HETERÓLOGO	58
A) Através do sistema GST	58
B) Através do sistema de expressão baseado na cauda de histidinas	64
4.2 QUANTO À INTERAÇÃO PrPc/RECEPTOR	68
4.3 QUANTO À INTERAÇÃO PrPc/LAMININA	72
5. DISCUSSÃO	83
5.1 PRODUÇÃO DE PrPc EM SISTEMA HETERÓLOGO	83
5.2 EVIDÊNCIAS DA INTERAÇÃO ENTRE O PrPc E O SEU RECEPTOR DE 60-66 kDa	86
5.3 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO PrPc/LAMININA	90
5.4 PrPc E SUAS INTERAÇÕES: FORMAÇÃO DE UM COMPLEXO MULTIPROTÉICO?	98
6. CONCLUSÕES	99

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
CURRICULUM VITAE	117
ANEXOS	119

RESUMO

Prions são definidos como partículas protéicas infecciosas compostas, quase que exclusivamente, por uma proteína conhecida como prion *scrapie* (PrP^{sc}). O envolvimento dessas partículas na etiologia de doenças neurodegenerativas, tanto em homens como em animais, já está bem determinado. Acredita-se que o PrP^{sc} seja sintetizado através de modificações pós-traducionais que ocorreriam na isoforma celular da proteína prion (PrP^c), uma glicoproteína expressa constitutivamente na superfície de vários tipos celulares, principalmente de neurônios, ancorada na membrana plasmática por glicosil-fosfatidil inositol (GPI). Apesar de ser uma molécula conservada em várias espécies, a função de PrP^c ainda permanece desconhecida. Interessados nos possíveis papéis fisiológicos desempenhados pelo PrP^c, decidimos investigar certas interações que o PrP^c poderia realizar com outras moléculas, na tentativa de se encontrar pistas sobre a função dessa proteína em células normais. Assim, nosso grupo identificou e vem caracterizando duas interações nas quais o PrP^c está envolvido: com o seu receptor de 60-66 kDa e com a principal proteína não colagênica da matriz extracelular, a laminina (LN). Grande parte da caracterização dessas duas interações vem sendo desenvolvida graças ao uso de PrP^c recombinante produzido em sistema heterólogo (em *E.coli*). O trabalho em questão trata principalmente da produção de PrP^c recombinantes em sistema heterólogo e a utilização destes como importantes ferramentas para a melhor caracterização das interações identificadas.

Alguns trabalhos na literatura vinham sugerindo a existência de um receptor para prions. Através da teoria da hidropaticidade complementar dos aminoácidos, nosso grupo foi capaz de identificar uma proteína de 60-66 kDa como sendo esse provável receptor. Ensaios de ligação *in vitro* utilizando PrP^c recombinante, ou PrP^c nativo (ancorado na superfície de células) confirmaram que a forma desse receptor presente na membrana (de 66 kDa) é capaz de se ligar ao PrP^c.

Com a ajuda de PrP^c recombinante foi também foi possível verificar uma ligação específica, saturável e de alta afinidade (K_d da ordem de 10^{-8} M) entre PrP^c e a LN. Através de ensaios de competição, utilizando peptídeos sintéticos correspondentes a domínios da LN já bem caracterizados e de funções estabelecidas, fomos capazes de

mapear o sítio dessa molécula que se liga ao PrPc. A sequência identificada (RNIAEIIKDI) encontra-se na região C-terminal da cadeia $\gamma 1$ da LN e, como demonstrado na literatura, esse domínio é responsável por estimular tanto a adesão celular, quanto o crescimento de neuritos em neurônios de cerebelo em cultura primária. De fato, resultados obtidos pelo nosso grupo indicam que a interação PrPc/LN participa no processo de neuritogênese.

Experimentos de esquiva inibitória, realizados em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Ivan Izquierdo (UFRGS) indicaram que a ligação PrPc/LN também desempenha um importante papel nos processos de memória e aprendizado.

ABSTRACT

Prions are defined as proteinaceous infectious particles that mediate the pathogenesis of certain neurodegenerative diseases, in humans and in animals. The prion particle is composed largely, if not entirely, by PrP^{Sc} (prion scrapie), a posttranslationally modified isoform of the cellular host-encoded prion protein (PrP^C). PrP^C is a glycosyl-phosphatidylinositol anchored protein that is constitutively expressed by several cell types, mainly on neuronal cell surface. However, the physiological role of this conserved protein remains unclear. Interested in this normal function of PrP^C, our group decided to investigate some interactions that PrP^C could be done with other molecules in order to find some clues about it. We have been identified and characterized two interactions that PrP^C is involved: with its putative 60-66 kDa receptor and with laminin. In order to better characterize these interactions it was necessary to produce purified PrP^C. In this work we will report the expression and the purification of mouse PrP^C protein in heterologous system and its use as important tools to investigate the PrP^C interactions.

A specific cell surface receptor for PrP^C has been predicted. Using the concept of complementary hydropathy, our group has identified a 60-66 kDa membrane protein in mouse brain, which seems to be a putative PrP^C receptor. *In vitro* binding assays using recombinant and native PrP^C were able to confirm that the membrane receptor (66 kDa) binds PrP^C.

Recombinant PrP^C was also useful to demonstrate a specific and high affinity (K_d around 10^{-8} M) interaction between PrP^C and laminin. In an attempt to map the PrP^C binding site in this molecule, laminin peptides with established physiological functions were used in competition binding assays. A peptide derived from C-terminal γ -1 chain of mouse laminin, RNIAEIIKDI, was the only one that was able to block the binding of laminin to PrP^C, suggesting that this region comprises the PrP^C binding site. It was reported in the literature that this peptide simulates the neurite outgrowth and cellular adhesion. In collaboration with Dr. Izquierdo's group (UFRGS) we demonstrated that the interaction characterized between this laminin's domain and PrP^C is involved in the neuritogenesis process, as well as in learning and memory.

ABREVIACÕES

AD - Doença de Alzheimer
APP - proteína precursora de amilóide
BCIP - 5-bromo-4-cloro-3 indolil fosfato
BSA - albumina sérica bovina
CAM - molécula de adesão celular
Ci - Curie
CJD - doença de Creutzfeldt-Jakob
cpm - contagem por minuto
DNA - ácido desoxirribonucléico
DTT - ditioneitol
D.O. - densidade óptica
Da - dalton
ECM - matriz extracelular
EDTA - ácido etilenodiaminatetracético
EHS - "Engelbreth-Holm-Swarm"
FFI - insônia familiar fatal
FITC - isotiocianato de fluoresceína
GSS - doença de Gerstmann-Straussler Scheinker
GST - glutationa-S-transferase
HEPES - hidroxietil-piperazina-N-2-etano-sulfônico
IPTG - β -D-tiogalactopiranosídeo de isopropila
LN - laminina
mRNA - RNA mensageiro
NBT - "nitro blue tetrazolium"
pb - pares de bases
PCR - reação em cadeia da polimerase
PMSF - fenilmetilsulfonil fluoreto
PrPc - proteína prion celular
PrPsc - proteína prion *scrapie*

RNA - ácido ribonucléico

rpm - rotações por minuto

SAA - soro precursor de amilóide A

SDS - dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

UV - radiação ultravioleta

xg - aceleração de gravidade

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o estudo sobre os prions vem recebendo grande destaque na literatura, não só por causa da participação dessas partículas em doenças neurodegenerativas, mas principalmente pelo fato do mecanismo de replicação das mesmas ser inteiramente novo, diferente daqueles postulados no "Dogma Central da Biologia Molecular".

Prions são definidos como partículas protéicas infecciosas compostas, quase que exclusivamente, por uma isoforma anormal da proteína prion celular (PrPc), conhecida como prion *scrapie* (PrPsc) (PRUSINER e cols., 1991b; PRUSINER, 1998). O envolvimento dessas partículas na etiologia de doenças neurodegenerativas, tanto em homens como em animais, já está bem estabelecido (PRUSINER, 1991a; PRUSINER, 1995), contudo, o mecanismo de transmissão dessas doenças é ainda controverso. Acredita-se que o PrPsc seja sintetizado através de modificações pós-traducionais que ocorreriam na isoforma celular normal de prion (PrPc), provavelmente em compartimentos citoplasmáticos denominados endossomos (BORCHELT e cols., 1992). A falta de evidências que apoiariam a existência de ácidos nucléicos associados a essas partículas (MEYER e cols., 1990) e os estudos de espectroscopia que revelaram diferenças nas estruturas secundárias entre as duas formas de prion (PAN e cols., 1993) sustentam, cada vez mais, a idéia de que esse processo infeccioso se dá por mudanças conformacionais (provavelmente conversão de estruturas alfa-helicoidais para estruturas beta-pregueadas) exclusivamente protéicas.

Muitas questões a respeito da transmissão das doenças causadas por prions ainda precisam ser respondidas. Grande parte dessas respostas virá quando o papel fisiológico do PrPc em células normais finalmente for elucidado. Apesar de ser uma molécula conservada entre várias espécies, a função de PrPc ainda permanece desconhecida.

Interessado nos possíveis papéis fisiológicos desempenhados pelo PrPc, nosso grupo decidiu investigar certas interações que o PrPc poderia realizar com outras moléculas, na tentativa de se encontrar pistas sobre a função dessa proteína em células

normais. Assim, nosso laboratório identificou e vem caracterizando duas interações nas quais o PrPc está envolvido: com o seu receptor de 60-66 kDa e com a principal proteína não colagênica da matriz extracelular, a laminina. O trabalho em questão trata principalmente da produção de PrPc recombinantes em sistema heterólogo e a utilização destes como importantes ferramentas para a melhor caracterização das interações identificadas.

Como será discutido mais adiante, o receptor caracterizado pelo nosso grupo pode estar envolvido no processo normal de internalização de PrPc nas células ou mesmo na transdução de algum outro sinal, envolvido em uma resposta celular diferente, quando se associa ao PrPc.

Quanto à interação PrPc/laminina, os nossos resultados sugerem que ela participe dos mecanismos de neuritogênese e também de memória e aprendizado.

A seguir será feita uma revisão da literatura sobre vários tópicos relevantes para um melhor entendimento do presente trabalho.

1.1 PRIONS

Durante muito tempo, diversos grupos de pesquisadores investiram no isolamento e na caracterização do agente infeccioso responsável por um determinado grupo de doenças: as encefalopatias espongiformes transmissíveis (ver no tópico 1.7 a descrição mais detalhada dessas doenças). Caracterizadas pela degeneração progressiva e, em muitos casos, pela deposição de material amilóide no sistema nervoso central, essas doenças atingem tanto homens ("Kuru", doença de Creutzfeldt-Jakob-CJD, doença de Gertsman-Straüssler-Scheiker-GSS e insônia familiar fatal-FFI) como animais (*scrapie*, encefalopatia espongiforme bovina-BSE, entre outras).

Por muitos anos, a etiologia destas doenças permaneceu obscura, sendo atribuída à infecção lenta por vírus ou viróides. No início, os estudos de infecção por *scrapie* eram feitos através da inoculação de cabras e ovelhas e com essa metodologia alguns anos eram necessários para a obtenção de resultados referentes a medidas de infecciosidade.

Quando em 1961, Richard Chandler foi capaz de transmitir *scrapie* para camundongos, os estudos sobre essa doença foram facilitados, porém ainda eram necessários de 1,5 a dois anos de intervalo para a observação dos resultados e também de um número grandioso de animais (PRUSINER, 1998).

Em 1975, com a identificação de um inóculo capaz de produzir *scrapie* em hamster em 70 dias (MARSH e KIMBERLIN, 1975; KIMBERLIN e WALKER, 1977) e com a substituição dos ensaios de titulação pelos ensaios baseados no tempo de incubação (PRUSINER e cols., 1980; PRUSINER e cols., 1982b), os estudos sobre a infecção por *scrapie* foram significativamente acelerados. Com essa nova metodologia foi possível reduzir o número de animais usados e o tempo de análise destes (os experimentos que se utilizavam da infecção de 60 camundongos durante 1 ano foram substituídos por ensaios nos quais eram necessários apenas 4 hamsters e 60-70 dias). Com essa facilidade foi possível desenvolver protocolos efetivos para a purificação de frações enriquecidas no agente infeccioso de *scrapie* e, conseqüentemente, para a caracterização bioquímica do mesmo.

Prusiner e colaboradores, no início da década de 80, a partir de um protocolo de purificação baseado em centrifugação diferencial e sedimentação em gradiente descontínuo de sacarose, extrações com detergentes, proteólise limitada, precipitação com sulfato de amônio e separação por eletroforese, foram capazes de obter uma fração extremamente enriquecida pelo agente infeccioso em questão (PRUSINER, 1982). O material purificado mostrou-se fortemente insolúvel, com características típicas de amiloide (coloração pelo vermelho Congo e PAS e birrefringência sob microscopia de luz polarizada). Em microscopia eletrônica de transmissão, o agente infeccioso purificado apresentou-se como pequenos agregados de estruturas alongadas, com tamanho e forma irregulares (10 a 20 nm de diâmetro por 100-200 nm de comprimento). Com esse mesmo protocolo de purificação, material semelhante, do ponto de vista bioquímico e microscópico, foi extraído de cérebros de pacientes portadores de CJD (PRUSINER e cols., 1982a; PRUSINER e cols., 1983).

A inativação da infecção por este material purificado através de agentes que modificam proteínas (como proteases, adição de SDS, sais caotrópicos, fenol) e resistência do mesmo a agentes modificadores de ácidos nucleicos (nucleases e irradiação

por UV) sugeriram fortemente a composição principalmente protéica da partícula infecciosa envolvida em Scrapie e nas demais doenças relacionadas e levaram Stanley Prusiner, em 1982, a propor que esse agente fosse chamado de "**prion**", nome derivado de "proteinaceous infectious particle". De fato, até o momento, acredita-se que essas partículas sejam exclusivamente protéicas, já que as várias tentativas em se detectar algum material genético associado a elas falharam (PRUSINER, 1998).

1.2 A DESCOBERTA DA PROTEÍNA PRION

As partículas infecciosas purificadas foram então utilizadas na produção de anticorpos monoclonais. Curiosamente, esses anticorpos reconheceram uma proteína de 33-35 kDa, presente tanto no cérebro de animais normais como nos de animais infectados (OESCH e cols., 1985; BARRY e cols., 1986). O sequenciamento dos resíduos da extremidade amino-terminal da proteína presente nas partículas infecciosas permitiu a síntese de peptídeos, os quais foram usados na imunização de coelhos (BARRY e cols., 1986). O soro obtido desses animais foi capaz de reconhecer a mesma proteína de 33-35 kDa, novamente em extratos de cérebros de animais normais e infectados.

Curiosamente, a proteína enriquecida nas partículas infecciosas apresentou um peso molecular ligeiramente inferior ao da proteína reconhecida pelos anticorpos (27-30 kDa). Denominada de PrP 27-30, descobriu-se mais tarde que essa forma era resultante do tratamento com proteases, durante a purificação. A remoção por proteólise parcial dos primeiros 67 resíduos da porção amino-terminal da proteína extraída de cérebros de animais infectados por *scrapie* ou de pacientes com CJD ou GSS, reduz seu peso molecular de 33-35 kDa para 27-30 kDa (OESCH e cols., 1985). GABIZON e cols. (1988) demonstraram, através da solubilização das partículas infecciosas, que essa resistência à degradação por proteases não é uma consequência da formação das placas amilóides, mas sim uma característica intrínseca da proteína infecciosa.

Com esses achados e com a posterior clonagem do gene que codifica para a proteína prion (ver adiante), foi possível sustentar a idéia de que a proteína presente nos agregados insolúveis nos cérebros de animais ou pacientes infectados é formada a partir

de uma proteína precursora expressa normalmente nas células. A isoforma infecciosa foi denominada de "**proteína prion scrapie**" (**PrPsc**) e a isoforma celular normal foi denominada de "**proteína prion celular**" (**PrPc**). A digestão proteolítica de PrPsc resulta na forma truncada PrP 27-30, mencionada acima (Fig. 1).

Apesar de PrPc e PrPsc apresentarem a mesma sequência de aminoácidos (TURK e cols., 1988), suas propriedades bioquímicas são bem diferentes. Enquanto o PrPc é solúvel e susceptível à ação de proteases, sua forma anormal, o PrPsc, apresenta-se muito insolúvel e resistente à proteólise limitada (MEYER e cols., 1986). Essas propriedades do PrPsc favorecem a formação de agregados insolúveis que se depositam lenta e progressivamente em várias regiões do sistema nervoso, causando a morte das células aí presentes. Estudos de espectroscopia foram capazes de revelar as estruturas secundárias dessas duas isoformas. Verificou-se que o PrPc tem um perfil característico de proteínas ricas em alfa-hélices, ao passo que o PrPsc possui muito mais estruturas beta-pregueadas (PAN e cols., 1993).

1.3 O GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA PRION CELULAR E SUA EXPRESSÃO

O sequenciamento dos resíduos da porção amino-terminal do PrP 27-30 possibilitou a síntese de oligonucleotídeos e a clonagem do gene que codifica a proteína prion, a partir de cDNAs de hamsters normais e infectados (BASLER e cols., 1986). Esse fato comprovou que a partícula infecciosa é realmente codificada por um gene do hospedeiro, o qual se encontra no braço curto do cromossomo 20 do homem e no cromossomo 2 do camundongo (OESCH e cols., 1985; CHESEBRO e cols., 1985).

A fase aberta de leitura (ORF) do gene que codifica para PrPc, desde de aves até mamíferos, encontra-se inteira em um único exon (HSIAO e cols., 1989; BASLER e cols., 1986; GABRIEL e cols., 1992; WESTAWAY e cols., 1987). O gene de PrP em camundongo, ovelha, gado e rato contém três exons e a ORF apresenta-se no exon 3 (BASLER e cols., 1986). O mesmo gene em hamster é formado por dois exons e no segundo encontra-se toda a ORF (BASLER e cols., 1986). Esse tipo de estrutura gênica

não permite a síntese de produtos distintos, provenientes de "splicing" alternativo. De fato, os RNAs mensageiros para o prion possuem um único tamanho (2,1 kb) e parece não existir variação na quantidade dessas moléculas no cérebro de animais infectados durante as várias fases da doença (OESCH e cols., 1985). Esses achados, juntamente com o sequenciamento da extremidade amino-terminal do PrPc e do PrPsc, revelando estruturas primárias idênticas (TURK e cols., 1988), sugerem que as diferenças entre essas duas isoformas sejam provenientes de modificações pós-traducionais.

Apesar do RNA mensageiro de PrPc (PrP mRNA) ser expresso constitutivamente nos cérebros de animais adultos, ele apresenta-se fortemente regulado durante o desenvolvimento.

No camundongo, o RNA mensageiro de PrPc pode ser detectado no tubo neural a partir do décimo terceiro dia de vida uterina, aumentando a quantidade após o nascimento. Esses mensageiros também foram encontrados nos neurônios do neocórtex, nas células de Purkinje do cerebelo, no hipocampo, na medula espinhal, em gânglios periféricos e nervos, além de neurônios do epitélio olfatório e da retina (KRETZCHMAN e cols., 1986; McKINLEY e cols., 1987).

Em hamsters, as quantidades de PrP mRNA parecem estar sob a regulação do fator de crescimento de nervos (NGF) (MOBLEY e cols., 1988), o que sugere uma possível participação do PrPc no desenvolvimento e diferenciação neural. No entanto, o fato de outros tecidos como intestino, rim, lâmina dental e membranas extra-embrionárias também produzirem esses mensageiros pode indicar uma função celular mais ampla para essa proteína (MANSON e cols, 1992).

Através de hibridização *in situ*, HARRIS e cols. (1993), foram capazes de detectar PrP mRNA em neurônios colinérgicos e não colinérgicos de várias regiões do sistema nervoso central de galinhas, a partir do sexto dia de vida intra-uterina. Além do sistema nervoso central, os mensageiros para PrPc foram observados na retina, intestino, coração e gânglios da raiz dorsal.

Figura 1: Isoformas da proteína prion. O diagrama de barras representa a estrutura do PrP de hamster, o qual consiste de 254 aminoácidos. Os sítios para glicosilação (CHO) e para a adição da âncora de GPI estão indicados. Após a remoção dos domínios N-terminal (peptídeo sinal-PS) e C-terminal, ambas as isoformas PrPc e PrPsc possuem 209 resíduos. Após proteólise limitada, cerca de 67 aminoácidos amino-terminais do PrPsc são clivados, resultando na forma PrP 27-30. (modificado de PRUSINER, 1998).

1.4 A PROTEÍNA PRION CELULAR (PrPc)

A) Estrutura

A proteína PrPc de várias espécies possui aproximadamente 250 aminoácidos, dos quais os primeiros 22 resíduos da extremidade amino-terminal constituem o peptídeo sinal que é removido e os 23 últimos resíduos hidrofóbicos da região carboxi-terminal também são clivados para a adição da âncora de glicosil-fosfatidilinositol (GPI). Depois de traduzida, a proteína prion sofre uma série de modificações pós-traducionais como: adição de oligossacarídeos N-ligados em regiões consenso (codons 181 e 197 de PrPc de hamster), formação de uma ponte dissulfeto intramolecular entre os resíduos de cisteína 179 e 214, além das remoções do peptídeo sinal na porção N-terminal e do peptídeo hidrofóbico na região C-terminal para a adição da âncora de GPI, como já mencionado (PRUSINER, 1991).

Através de estudos de modelagem molecular foi possível prever a presença de quatro estruturas em alfa-hélices (H1, H2, H3 e H4) no PrPc (GASSET e cols., 1992; HUANG e cols., 1994). Dados de RMN (ressonância magnética nuclear) de um peptídeo sintético correspondente aos resíduos 90-145 reforçaram a existência de H1 (ZHANG e cols., 1995). Contudo, análises mais recentes de RMN de PrPc 23-231 de camundongo indicaram que a região amino-terminal (23-120) é altamente flexível e não possui estrutura secundária definida (RIEK e cols., 1997). Outros trabalhos demonstraram que íons cobre ligam-se ao PrPc nessa região e estabilizam sua estrutura, induzindo a formação de uma alfa-hélice (MIURA e cols., 1996). Através de RMN também foi possível detectar a existência de duas estruturas em folha beta antiparalelas no PrPc (RIEK e cols., 1997).

B) Função

O PrPc é constitutivamente expresso na superfície de vários tipos celulares, sobretudo nos neurônios. Apesar dessa ampla distribuição nos tecidos e de também ser bastante conservada evolutivamente entre os vertebrados, a função normal dessa proteína

ainda permanece desconhecida. Três diferentes construções de animais “knockouts” já foram geradas. Em duas dessas construções, os camundongos se desenvolveram normalmente, sem apresentar nenhum fenótipo patológico óbvio (BÜLLER e cols., 1992; MANSON e cols., 1994). COLLINGE e cols. (1994) verificaram algumas anormalidades em alguns desses animais quanto a fenômenos eletrofisiológicos, entretanto esses mesmos defeitos não foram observados por outros grupos (HERMS e cols., 1995; LLEDO e cols., 1996). SAKAGUCHI e cols. (1996) desenvolveram uma linhagem de camundongos “knockout” que após 70 semanas mostravam progressivos sintomas de ataxia e morte das células de Purkinje do cerebelo. Há também trabalhos que sugerem a participação de PrPc nas regulações dos ritmos circadianos e do sono (TOEBLER e cols., 1996).

Testes comportamentais feitos pelo grupo do Prof Dr. Ivan Izquierdo (UFRGS) em colaboração com o nosso laboratório revelaram que camundongos deficientes em PrPc apresentam uma elevada atividade locomotora em relação aos animais selvagens (ROESLER e cols., 1999). Autores desses mesmos grupos também demonstraram que esses animais deletados para o gene que codifica o PrPc são muito mais sensíveis a agentes convulsionantes quando comparados aos animais selvagens, indicando um possível papel do PrPc em fenômenos eletrofisiológicos relacionados ao sistema nervoso central (WALZ e cols., 1999)

Mais recentemente, foi descrito que a extremidade amino-terminal do PrPc pode associar-se aos íons cobre (MIURA e cols, 1996; BROWN e cols., 1997). Animais deletados para o gene que codifica PrPc possuem 20 vezes menos cobre no cérebro em relação aos animais normais. Recentemente também, BROWN e cols. (1999) mostraram, pela primeira vez, que o PrPc possui uma atividade semelhante a da enzima superóxido dismutase (SOD). Em conjunto, esses dados indicam uma possível participação do PrPc na homeostase de Cu^{+2} nas células.

Sem dúvida, até o momento, muito pouco se sabe sobre os possíveis papéis fisiológicos que a proteína prion pode desempenhar. Como será visto, o presente trabalho irá tratar exatamente dessa questão. A identificação e caracterização de interações realizadas entre o PrPc e outras moléculas nos trará pistas importantes sobre a sua função biológica.

1.5 O MECANISMO DE PROPAGAÇÃO DOS PRIONS

Uma vez estabelecido o fato de que as partículas infecciosas envolvidas nas doenças neurodegenerativas transmissíveis eram compostas unicamente por proteínas, as várias hipóteses sobre a estrutura desse agente (como, por exemplo, composição por lipídios, carboidratos ou ácidos nucleicos) puderam ser descartadas (PRUSINER, 1982). Hoje, várias evidências experimentais reforçam a idéia de que o processo de infecção por prions se dá basicamente por mudanças estruturais (pós-traducionais) ocorridas na proteína normal PrPc, transformando-a na isoforma PrPsc, a qual é capaz de formar agregados extremamente insolúveis e, então, causar todo o processo de neurodegeneração observado nas doenças relacionadas. Entretanto, ainda se encontra alguma resistência a esse modelo. A "replicação" de proteínas sem o uso de material genético é realmente um mecanismo ímpar. A seguir será apresentada a hipótese mais aceita para a conversão de PrPc a PrPsc e suas bases experimentais e logo depois a teoria de um provável "vírus *scrapie*" também será mencionada.

A) A conversão PrPc→PrPsc

Em 1989 PRUSINER propôs que, quando o prion era introduzido em células normais, seria capaz de converter moléculas de PrPc em PrPsc através da formação de dímeros. Segundo esse autor, a ligação do PrPsc ao PrPc do hospedeiro poderia impor uma mudança de conformação nesse último, transformando-o em outra molécula de PrPsc. Assim, de acordo com esse modelo, a infecção é produtiva porque novas moléculas de PrPsc são exponencialmente geradas a partir do PrPc. As propriedades bioquímicas de PrPsc permitem o acúmulo deste em agregados insolúveis, os quais provavelmente levam à morte neuronal (PRUSINER, 1989). A principal evidência da participação de PrPc no processo infeccioso surgiu quando, em 1993, BÜELLER e cols. produziram um camundongo no qual o gene codificador para o PrPc havia sido deletado.

Esse animal foi completamente resistente à infecção por prion e essa resistência pôde ser revertida com a reintrodução do gene PrP.

As moléculas de prion não apresentam sempre o mesmo comportamento, podendo variar no tempo de incubação necessário para produzir doença e também na distribuição das lesões e deposições de amilóides em regiões específicas do cérebro. Esse fenômeno levou à definição de "cepas" de prions e levantou a dúvida de como uma única proteína poderia ser responsável por uma grande variedade fenotípica. A hipótese conformacional postula que cada "cepa" está associada a uma diferente conformação de PrPsc e cada uma delas pode converter PrPc a uma conformação semelhante a sua (AGUZZI e WEISSMAN, 1997).

O mecanismo de conversão de PrPc a PrPsc nas doenças hereditárias pôde ser sustentado com a construção de camundongos transgênicos que expressavam a mutação P101L (substituição de uma prolina por leucina na posição 101), correspondente à mutação no codon 102 do PrPc humano, encontrada em pacientes portadores de GSS (HSIAO e cols., 1994). Esses animais desenvolveram alterações neurológicas espontaneamente, apresentaram vacuolização do hipocampo e do neocórtex, além de deposição de material amilóide, principalmente no cerebelo. Esses resultados indicaram que mutações específicas no gene codificador para PrPc poderia tornar essa proteína mais susceptível a mudanças conformacionais, apoiando a hipótese de que alterações exclusivamente protéicas seriam responsáveis pelas doenças.

O melhor conhecimento sobre o mecanismo de conversão de PrPc para PrPsc foi gerado com a ajuda de peptídeos sintéticos. A análise das seqüências de aminoácidos do PrPc de diversos animais e também no homem mostrou que quatro regiões da molécula são compatíveis com estruturas em alfa-hélice. GASSET e cols. (1992) sintetizaram quimicamente peptídeos correspondentes a essas regiões e estudaram suas propriedades físicas através de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Os peptídeos estudados foram: H1 (resíduos 109 a 122), H2 (129 A 140), H3 (178 A 191) e H4 (202 a 218). Destes, H1, H3 e H4 apresentaram características peculiares, como insolubilidade em solução aquosa, formação de estruturas beta-pregueadas detectáveis na análise de FTIR, formação de fibrilas amilóides birrefringentes sob microscopia de polarização e coloração com vermelho Congo, e também formação de agregados

semelhantes às partículas infecciosas purificadas de cérebro de animais infectados. Segundo os autores, esses achados indicam que a transformação do PrPc em PrPsc pode envolver a conversão de estruturas em alfa-hélice para estruturas beta-pregueadas. Realmente, as propriedades bioquímicas do PrPsc, como resistência a proteases, alta insolubilidade e tendência à formação de agregados, apoiam essa idéia.

Estudos de ressonância magnética nuclear também confirmam essa proposta. Eles revelaram que o PrPc possui cerca de 40% de sua estrutura arranjada em alfa-hélice, enquanto que o PrPsc possui apenas 20% dessa estrutura e 50% de folha beta-pregueada (PAN e cols., 1993; RIEK e cols., 1996).

Alguns trabalhos também se preocuparam em determinar a região específica do PrPc envolvida na sua transformação em PrPsc. A deleção de cada região do PrPc provável de conter uma estrutura secundária definida, com exceção dos domínios correspondentes aos resíduos 23-88 e 141-176, impediu a formação de PrPsc em células de neuroblastoma em cultura infectadas (FISCHER e cols., 1996; ROGERS e cols., 1991; MURAMOTO e cols., 1996). É interessante notar que todas as mutações conhecidas envolvidas nas doenças causadas por prions ocorrem adjacentes ou exatamente nas regiões de estrutura secundária prováveis (HUANG e cols., 1994; ZHANG e cols., 1995; RIEK e cols., 1996).

Usando anticorpos monoclonais específicos para determinadas regiões do PrPc foi possível localizar o domínio composto pelos resíduos 90-112 como sendo o principal sítio envolvido na mudança conformacional de PrPc para PrPsc (PERETZ e cols., 1997). HORIUCH e CAUGHEY (1999), também utilizando-se de anticorpos monoclonais, demonstraram que o anticorpo contra o domínio específico 219-232 inibia a ligação do PrPsc ao PrPc e portanto impedia a formação de novas moléculas resistentes a proteases em sistemas livres de célula ("cell-free system"). Segundo esses autores, esse bloqueio de ligação pelo anticorpo ocorreu devido a um impedimento estérico e o sítio real de ligação entre as duas isoformas deve estar próximo a essa região.

Parece também que a conversão de PrPc a PrPsc está associada a ambientes redutores e a baixa taxa de glicosilação. MA e LINDQUIST (1999) expressaram PrPc de camundongo no citoplasma de levedura e demonstraram que essas moléculas adquiriram propriedades semelhantes a de PrPsc, como resistência a proteases e insolubilidade em

detergentes. Nesse mesmo artigo, os autores mostraram que células de neuroblastoma em cultura expostas a condições redutoras e de glicosilação inibida formavam PrPs com características semelhantes ao PrPsc. Os resultados desse trabalho sugerem um modelo capaz de explicar as doenças causadas por prions, principalmente as esporádicas. Esse modelo propõe que em determinados momentos e compartimentos das células o balanço das taxas de glicosilação e de oxidação e redução poderiam favorecer a transformação de PrPc em PrPsc. Como um desequilíbrio desses fatores nas células é raro, a formação de PrPsc espontaneamente seria um evento difícil, o que explicaria a baixa frequência das doenças esporádicas e também o seu aparecimento mais tardio.

Alguns esforços também vêm sendo feitos na tentativa de se mostrar a conversão de PrPc→PrPsc *in vitro*, em sistemas livres de células. Quando PrPc foi exposto a 3M de guanidina-HCL e posteriormente submetido a uma diluição da ordem de 10 vezes na presença de moléculas de PrPsc, ocorreu a formação de um tipo de PrP intermediário, ligado ao PrPsc. Esse complexo era resistente a proteases e também insolúvel. Entretanto, não foi possível demonstrar que esse intermediário era infeccioso quando injetado em animais (KOCISKO e cols., 1994; KANEKO e cols., 1997b). De fato, vários recombinantes de PrPc produzidos, ao serem renaturados podem adquirir tanto a forma mais rica em alfa-hélice, quanto a forma mais rica em estruturas beta-pregueadas. Contudo, em ensaios de infecção em animais de laboratório, nenhuma dessas moléculas mostrou-se infecciosa (PRUSINER e cols., 1998).

VEY e cols. (1996) demonstraram que PrPc e PrPsc colocalizam-se na superfície celular em compartimentos específicos, conhecidos como cavéolas, sugerindo que a conversão entre as isoformas ocorra nesses domínios. Esses resultados foram fortalecidos quando KANEKO e cols. (1997a), através da construção de quimeras, introduziram um domínio C-terminal transmembrânico no PrPc, redirecionando essa proteína para vesículas encapadas por clatrina. Nessa nova situação, a transformação de PrPc em PrPsc não ocorreu. Ela só foi observada nos PrPc possuidores de GPI, ancorados na superfície celular nas regiões de cavéolas.

Com essas várias evidências, a hipótese de que a infecção por prions se dá exclusivamente por modificações conformacionais protéicas é hoje a mais aceita.

Contudo, há ainda grupos que defendem a existência de um vírus responsável pela transmissão das doenças.

B) A hipótese de um vírus "scrapie"

Quando a associação entre as mutações no gene do PrP e as doenças familiares foi estabelecida, aqueles que acreditavam na existência de um "vírus scrapie" defenderam essa hipótese propondo que o PrPc seria um receptor de "vírus scrapie" e que quando mutado seria capaz de se ligar mais fortemente a essas partículas virais. Essa mesma teoria foi usada para explicar os resultados de infecção de animais transgênicos, que super expressavam PrPc e desenvolviam doença mais rápido que os animais selvagens e também os resultados obtidos com os camundongos deletados para o gene do PrP, os quais eram resistentes à infecção (revisado por PRUSINER, 1998). Assim, quanto maior era a quantidade de PrPc na célula, mais rápida era a disseminação dos vírus, já que eles encontravam maior quantidade de seu receptor. De maneira inversa, os animais deficientes para PrPc não sofriam infecção, pois não apresentavam o receptor necessário para a disseminação dos vírus. Contudo, ainda não foram encontradas partículas virais nas preparações purificadas de PrPsc. Alguns autores acham que essas partículas existem sim, mas ainda não foi possível detectá-las. (MANUELIDIS e cols., 1995).

1.6 ESTUDOS EM ANIMAIS TRANSGÊNICOS E A BARREIRA ESPÉCIE ESPECÍFICA

Camundongos transgênicos expressando diferentes quantidades de PrPc de hamster - Tg(ShPrP) - foram construídos (SCOTT e cols., 1989). Esses animais desenvolviam doença quando inoculados com prions de hamster e o tempo de incubação após o inóculo era inversamente proporcional ao nível de PrPc de hamster nos cérebros desses transgênicos. Como esperado, esses animais também eram infectados por prions provenientes de camundongo. Interessante foi o achado de que os PrPsc formados nesses transgênicos eram de hamster quando o inóculo inicial provinha desse animal ou de

camundongo quando os prions de camundongo eram injetados. Foi proposto então a existência de uma barreira entre espécies, já que camundongos não transgênicos eram resistentes a infecção por prions de hamster, e que essa barreira era determinada pela sequência do gene do PrP do hospedeiro.

TELLING e cols., em 1995, mostraram que animais transgênicos que expressavam PrPc humano (HuPrPc) eram extremamente resistentes a infecção por prions humanos. Somente quando o gene endógeno de PrPc de camundongo (MoPrPc) era deletado, esses animais desenvolviam doença após serem inoculados com esse tipo de prions. Baseados nesses resultados, os autores sugeriram que o PrPc de camundongo (endógeno) bloqueia a conversão de PrPc humano ligando-se a uma proteína de camundongo que possui maior afinidade por PrPc de camundongo. Essa proteína hipotética foi chamada de proteína X e, como proposto, deveria agir como uma chaperona, participando do mecanismo de transformação de PrPc para PrPsc.

Apesar de todas essas evidências que apoiam a especificidade entre espécies na infecção por prions, a encefalopatia espongiforme bovina é conhecida por ter ultrapassado essa barreira e ter sido transmitida para o gato doméstico (BRUCE e cols., 1994) e para o homem (COLLINGE e cols., 1996; SCOTT e cols., 1999).

1.7 DOENÇAS CAUSADAS POR PRIONS

Com base na hipótese dos "prions", a qual defende que partículas essencialmente protéicas podem se replicar na ausência de material genético, as encefalopatias espongiformes transmissíveis também podem ser chamadas de "doenças causadas por prions". Sem dúvida, o conceito de prion explica o fato dessas doenças serem, ao mesmo tempo, hereditárias, esporádicas e infecciosas.

A seguir, algumas dessas doenças (as mais conhecidas), as quais ocorrem tanto em animais como em homens, serão relatadas com maiores detalhes.

A) Em animais

Scrapie - Conhecida há mais de 200 anos, o *scrapie* é uma doença neurodegenerativa causada por prions que afeta cabras e ovelhas. Os animais acometidos por essa doença apresentam excitabilidade, coceira, ataxia e paralisia, morrendo em pouco tempo. A etiologia do *scrapie* ficou desconhecida durante muito tempo, sendo inicialmente atribuída à infecção lenta por algum tipo de vírus. A patogênese dessa doença começou a ser elucidada após a purificação e a caracterização bioquímica das partículas infecciosas e a descoberta de que a proteína prion, componente exclusivo dessas partículas, era também codificada por um gene localizado no genoma do hospedeiro (PRUSINER e cols., 1982a; BASLER e cols., 1986). Assim como as doenças humanas CJD e GSS, o *scrapie* também é uma doença infecciosa e ao mesmo tempo hereditária.

Encefalopatia espongiforme bovina (BSE) - Também conhecida com "doença da vaca louca", BSE é uma doença neurodegenerativa causada por prions que ocorre em bovinos e que, na última década tornou-se um sério problema no Reino Unido. A epidemia de BSE que surgiu em meados da década de 80 foi causada provavelmente pela contaminação por *scrapie* da ração usada na alimentação do gado. Essa ração é preparada a partir das vísceras de carneiros, ovelhas, gado, porcos e galinhas e é conhecida como um suplemento nutricional rico em proteínas. No final da década de 70, a etapa de extração dessas vísceras em um solvente orgânico começou a ser abandonada resultando em uma ração com maior teor em gorduras (WILESMITH e cols., 1991). Atualmente é possível dizer que a não utilização desse método de extração tenha sido a responsável pela epidemia de BSE ocorrida no Reino Unido, pois, sem ele, PrPsc provenientes de ovelhas não foram inativados e, portanto, infectaram o gado, através de transmissão oral.

A manifestação dessa doença começou a ser detectada no gado inglês por volta de 1986. Em 1987 foram confirmados 9 casos da doença e no final de 1994 já tinham sido registrados 138.359 casos (WELLS e WILESMITH, 1995). Como o tempo médio de incubação de BSE é de 5 anos, grande parte do gado não manifestou a doença, pois normalmente esses animais são sacrificados com 2-3 anos de idade (STEKEL e cols., 1996). Esse fato, sem dúvida, preocupou a população inglesa e aquelas que importavam

carne da Inglaterra, já que a suspeita de infecção por prions bovinos em humanos existia e a distinção entre a carne normal e a infectada não era possível.

Alguns estudos confirmaram experimentalmente a via oral de infecção do gado, através da transmissão de BSE para camundongos e também para o gado bovino através da alimentação (PRUSINER, 1991). É interessante notar, que as sequências de PrP do boi e da ovelha diferem em apenas 7 ou 8 posições (GOLDMAN e cols., 1991; PRUSINER e cols., 1993), o que deve facilitar a ultrapassagem da barreira entre as espécies (ver tópico 1.6) e, portanto permitir a infecção do gado por prions de ovelhas.

As alterações microscópicas observadas na BSE são semelhantes às do scrapie e estão restritas ao sistema nervoso central. Observa-se vacuolização da substância cinzenta e resposta astrocítica, vacuolização do neuropilo, presença de vacúolos dentro do pericário do neurônio e perda neuronal. A formação de placas amilóides não é característica dessa doença, sendo os acúmulos de prion detectáveis através de imunohistoquímica (WELLS e WILESMITH, 1995).

Quanto a possibilidade da transmissão de prions bovinos para humanos, trabalhos recentes indicam que ela existe. Em 1994, apareceram na Inglaterra os primeiros casos de CJD em adolescentes e adultos jovens. Essa doença foi chamada de nova variante de CJD (vCJD) (COLLINGE e cols., 1996). O cérebro desses pacientes apresentavam numerosas placas amilóides de PrP e uma degeneração espongiiforme intensa. Mais tarde, um caso semelhante ao descrito anteriormente foi detectado na França. A cronologia e a restrita ocorrência geográfica de vCJD levantaram a possibilidade dessa doença ter sido decorrente da infecção por prions bovino, através da ingestão de carne contaminada com BSE (revisado por PRUSINER, 1998). Recentemente, SCOTT e cols. (1999), demonstraram que animais transgênicos que expressavam PrP^c bovino eram igualmente susceptíveis a prions provenientes de vCJD e de *scrapie*. Esses dados indicam fortemente que prions bovinos são capazes de infectar homens.

Trabalhos que analisam o risco da ocorrência de BSE estão sendo atualmente conduzidos nos EUA, na Argentina e Espanha, tendo-se em vista alguns relatos esporádicos da doença fora do Reino Unido. Na tentativa de monitorar a transmissão de BSE, imunoensaios para PrP^{sc} vêm sendo utilizados e eles são capazes de detectar a doença, antes mesmo do aparecimento dos sinais clínicos (SAFAR e cols., 1998).

Além do scrapie, que atinge cabras e ovelhas e de BSE, doenças semelhantes são provocadas por prions em outros animais, como no visão (encefalopatia transmissível do visão), nos cervos e antílopes (doença crônica debilitante) e nos gatos domésticos (encefalopatia espongiforme felina) (revisado por PRUSINER, 1998).

B) Em homens

Kuru - O kuru é uma doença neurológica que atingiu, na década de 50, nativos do grupo lingüístico Fore e também algumas tribos vizinhas, em Papua Nova Guiné. Várias evidências indicam que o kuru se disseminou nessas tribos devido à prática de rituais canibalísticos, principalmente por mulheres e crianças, que tinham o costume de comer as vísceras (inclusive o cérebro) de seus parentes mortos, como demonstração de respeito (GAJDUSEK e ZIGAS, 1957; MATHEWS e cols., 1968). A não identificação de nenhuma mutação relacionada com essa doença leva a crer que, provavelmente, a origem dessa epidemia esteja na ingestão de vísceras de algum portador de CJD, durante a prática canibal (GAJDUSEK, 1977).

O curso clínico da doença é bastante rápido (de 3 a 6 meses após o aparecimento dos primeiros sintomas), caracterizando-se inicialmente por ataxia progressiva acompanhada de tremores no corpo todo (o significado da palavra "kuru" no dialeto Fore é tremer). (GAJDUSEK e ZIGAS, 1957). Nas fases mais avançadas da doença, características como alterações emocionais (agressividade), perda da locomoção e do controle dos vários músculos podem ser observadas.

Os aspectos histopatológicos do kuru são semelhantes aos das outras doenças causadas por prions, como alterações espongiformes, astrogliose e deposição de placas amilóides na maioria dos casos, principalmente no cerebelo e no sistema extra-piramidal. (GAJDUSEK e ZIGAS, 1957; KLATZO e cols., 1959).

Por volta de 1960, o canibalismo foi extinto nessas tribos e com isso ocorreu uma rápida redução na incidência do kuru. Os indivíduos órfãos, nascidos de mães portadoras de kuru, não apresentaram a doença até hoje. Esse fato indica que nem a placenta e nem o leite materno são vias de transmissão do agente infeccioso (PRUSINER, 1993). Como o

tempo de incubação dessa doença é muito longo, alguns indivíduos que praticaram o canibalismo naquela época estão apresentando hoje os sintomas da doença.

Doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD) - Os primeiros casos de uma doença neurodegenerativa humana denominada de doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), foram relatados em 1920 por H.G. Creutzfeldt e em 1921 por A. Jakob (RICHARDSON e MASTERS, 1995). Aproximadamente 15% dos casos de CJD têm caráter familiar autossômico dominante, sendo os demais casos esporádicos (MASTERS e cols., 1981).

CJD afeta igualmente homens e mulheres com idade média de 60 anos. Os sintomas mais comuns são desordens visuais, perda de memória e movimentos mioclônicos. Uma em cada 1 milhão de pessoas por ano é diagnosticada com CJD, sendo que 80% dos pacientes morrem cerca de 12 meses após o aparecimento dos primeiros sintomas, enquanto que os demais exibem um curso clínico de vários anos (RICHARDSON e MASTERS, 1995).

As regiões do cérebro mais afetadas pela doença são o corpo estriado, o tálamo e o cerebelo. Microscopicamente, CJD se caracteriza pela morte neuronal, gliose e alterações espongiiformes (MASTERS e RICHARDSON, 1978). A detecção imunohistoquímica de depósitos de PrPsc pode ser útil para o diagnóstico diferencial entre alguns casos de CJD, GSS e a doença de Alzheimer. Porém, como esses depósitos são encontrados em menos de 10% dos casos de CJD, esse tipo de diferenciação torna-se difícil (LANTOS e cols., 1992).

Na CJD hereditária, a mutação mais freqüente (60%) observada no gene que codifica para o PrPc ocorre no codon 200 e está associada à forma mais típica da doença (BROWN, 1992; BROWN e cols., 1994). Mutações nos codons 178, 180, 210, 232, 198, 217 e 105 também podem ocorrer.

Fontes de infecção por prions provenientes de CJD, através de transmissão iatrogênica, já foram relatadas. Elas incluem transplante de córnea, administração de hormônio de crescimento e gonadotrofinas provenientes de extratos de hipófise humana e esterilização imprópria de eletrôdos e materiais cirúrgicos (BROWN e cols., 1992). Assim, CJD é, ao mesmo tempo, uma doença hereditária e infecciosa.

Recentemente, uma nova variante de CJD foi relatada em vinte indivíduos, no Reino Unido e na França. As suspeitas de que esses indivíduos tenham desenvolvido a

doença por ingestão de carne proveniente de gado infectado com BSE estão se confirmando. O grupo de Collinge (COLLINGE e cols., 1996), demonstrou que as moléculas infecciosas provenientes desses pacientes tinham características bioquímicas diferentes das envolvidas com CJD convencional, em particular quanto ao padrão de glicosilação, porém semelhantes às causadoras de BSE. De fato, SCOTT e cols. (1999) apresentaram evidências da transmissão de prions bovinos para homens, através de experimentos com animais transgênicos.

Doença de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) - GSS é uma doença do sistema nervoso rara, autossômica dominante, caracterizada principalmente por anormalidades motoras e intelectuais. Foi descrita pela primeira vez em uma família de Viena, por Gerstmann, em 1928 (GHETTI e cols., 1995). Sintomas como ataxia cerebelar, tremores severos, dificuldades de locomoção, distúrbios da fala, irritabilidade, comportamento descontrolado, redução da capacidade intelectual são comuns nos indivíduos portadores de GSS. Deposição de placas amilóides de PrP^{Sc} em determinadas regiões do cérebro de pacientes é um achado constante em GSS (KITAMOTO e cols., 1987). Em alguns casos também se encontra degeneração espongiiforme do sistema nervoso central.

Foram identificadas várias mutações no gene que codifica para a proteína prion celular associadas a GSS (GHETTI e cols., 1995). A mais freqüente localiza-se no codon 102, mas mutações nos codons 105, 117, 145, 198 e 217 também já foram descritas.

Insônia Familiar Fatal (FFI) - Descrita pela primeira vez em 1986 (LUGARESI e cols., 1986), a FFI está associada a uma mutação no codon 178 do gene que codifica para o PrP^C, que leva a substituição de um resíduo de ácido aspártico por asparagina. Essa mesma mutação já havia sido detectada anteriormente em pacientes com CJD, entretanto, as manifestações clínicas parecem estar associadas a um polimorfismo no codon 129: a presença do resíduo de valina nessa posição determina o fenótipo de CJD, enquanto que a presença de metionina ocorre nos pacientes com FFI. Na literatura existem relatos dessa mutação no codon 178 em 16 diferentes famílias. Destas, 9 apresentam FFI e 7 apresentam CJD (GAMBETTI e cols., 1995).

Clinicamente FFI é caracterizada por distúrbios do sono e dos sistemas autônomo, endócrino e motor (LUGARESI e cols., 1986). A doença se manifesta, em média, aos 48

anos de idade e sua duração é de cerca de 13 meses (GAMBETTI e cols., 1995). Microscopicamente, FFI caracteriza-se pela perda de neurônios e astrogliose no tálamo, particularmente nos núcleos ventral anterior e médio-dorsal. Dependendo do tempo de duração da doença, também pode haver envolvimento cortical (MANETTO e cols., 1992).

Doenças Psiquiátricas - As manifestações de alguns sintomas psiquiátricos nas doenças causadas por prions levantaram a possibilidade de que mutações no gene codificador do PrP^c também pudessem estar relacionadas na etiologia de doenças psiquiátricas. De fato, SAMAIA e cols. (1997) identificaram uma mutação no codon 171 no gene de PrP^c em indivíduos pertencentes a uma família com alta incidência de doença esquizoafetiva ou esquizofrênica, demonstrando, pela primeira vez, a associação desse tipo de doença com o PrP^c.

1.8 POSSÍVEIS ROTAS DE ACESSO DO PrP^{sc} AO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A grande maioria dos casos descritos de transmissão iatrogênica de CJD ocorreu por via intramuscular (hormônios da pituitária contaminados com prion) ou via oral (kuru e vCJD). Como o agente infeccioso encontra o caminho capaz de levá-lo da periferia ao sistema nervoso central do hospedeiro?

Acredita-se que o prion deva se replicar em reservatórios, sendo os órgãos linfóides o principal deles. A inoculação periférica de PrP^{sc} em camundongos (KIMBERLING e cols., 1986) e cabras (KEUEN e cols., 1996) produz a doença neurodegenerativa. Contudo, a presença do agente infeccioso é detectada primeiramente no baço, onde os prions parecem replicar-se. O envolvimento do sistema linforeticular na propagação das doenças causadas por prions em humanos já foi demonstrado, além da detecção de PrP^{sc} em biópsia de amígdalas palatinas (HILL e cols., 1997). A infectividade também se acumula nas placas de Peyer do intestino, quase que imediatamente após a administração oral de prions (KIMBERLING e WALKER, 1989).

A natureza das células do sistema linforetico que replicam prion não é conhecida. Sabe-se que PrPsc acumula-se em células dendríticas foliculares (MURAMOTO e cols., 1993) e que animais deficientes de PrPc e inoculados com PrPsc não apresentam deposição de prions no baço, a menos que seja feita uma reposição de medula óssea proveniente de animais normais (BLAETTLER e cols., 1997). Com a utilização de um painel de camundongos deficientes para tipos celulares específicos do sistema imune, demonstrou-se que linfócitos B, mas não os T, estão envolvidos na transmissão do agente infeccioso da periferia para o SNC (KLEIN e cols., 1997).

A barreira hemato-encefálica não deve permitir que PrPsc chegue do sistema linfo-reticular ao SNC carregado por células do sistema imune. Assim, é provável que o agente infeccioso se propague pelo sistema nervoso periférico, como fazem os vírus da raiva e herpes (KIMBERLIN e WALKER, 1980).

1.9 LIGANTES DE PrPc

A identificação de ligantes de PrPc apresenta-se extremamente importante, uma vez que a caracterização dessas interações poderá trazer um melhor entendimento das doenças causadas por prions e também poderá ajudar no esclarecimento do tão misterioso papel fisiológico do PrPc.

OESCH e cols. (1990) identificaram várias proteínas ligantes de PrPs, incubando membranas de nitrocelulose contendo extrato protéico de cérebros de hamsters separado eletroforéticamente com PrPc e PrPsc marcados com o radioisótopo iodo 125 e incorporados em lipossomos. Com isso, foram identificadas várias proteínas ligantes de prions, com pesos moleculares de 45, 50, 56, 64, 72 e 110 kDa. O ligante de 45 kDa foi purificado, sequenciado e identificado como sendo a conhecida proteína glial ácida fibrilar (GFAP), componente do citoesqueleto de astrócitos. As outras proteínas não foram caracterizadas até o momento.

EDENHOFER e cols. (1996) conseguiram detectar, através do sistema de duplo-híbrido em *Saccharomyces cerevisiae*, uma proteína de choque térmico, da família das

Hsp60, capaz de se ligar ao PrPc *in vitro*. Na tentativa de mapear o sítio dessa ligação, peptídeos de PrPc recombinantes foram expressos através do sistema de fusão GST. Ensaio de ligação *in vitro*, identificaram a região entre os resíduos 180 e 210 do PrPc como sendo o domínio de ligação para a Hsp60.

Alguns trabalhos também indicam que a proteína prion é capaz de se ligar à heparina. GABIZON e cols., em 1993, baseados em competições com anticorpos, propuseram que essa interação ocorreria entre os resíduos 142 e 174 do PrPc. No entanto, CHEN e cols., em 1995, identificaram formas truncadas da proteína prion e verificaram que a região amino-terminal (os 110 primeiros resíduos) é a necessária para ligação à heparina. A caracterização dessa interação parece ser importante, uma vez que a heparina é um poliânion relacionado às glicosaminoglicanas (GAGs) celulares e essas últimas encontram-se associadas ao PrPsc, nas placas amilóides (McBRIDE e cols., 1998). Além disso, foi demonstrado que a administração de compostos polissulfatados a animais portadores de doenças causadas por prions aumentava o tempo de incubação das mesmas (FARQUHAR e cols., 1999). Estudos com células em cultura mostraram que esses poliânions eram capazes de diminuir a quantidade de PrPc na superfície celular e de também reduzir ou inibir permanentemente a conversão de PrPc a PrPsc em células infectadas (SHYNG e cols., 1995a; CAUGHEY e RAYMOND, 1993; GABIZON e cols., 1993). Esses dados sugerem que os poliânions devem competir pela ligação do PrPc às GAGs e, dessa forma, impedir a formação das placas amilóides. Em um artigo recente, BRIMACOMBE e cols. (1999) caracterizaram algumas propriedades de ligação do PrPc aos poliânions, através do método de "surface plasmon resonance". De fato, o melhor conhecimento dessa interação poderá trazer informações sobre o modo de ação desses compostos terapêuticos e, portanto, ajudar no tratamento das doenças causadas por prions.

Foi demonstrado em estudos com camundongos transgênicos (ver tópico 1.6) que uma outra macromolécula, designada de proteína X, participa no mecanismo de conversão de PrPc a PrPsc. Parece que a proteína X, sugerida como uma chaperona, se liga na região carboxi-terminal do PrPc (TELLING e cols., 1995; KANEKO, 1997c).

Além de interações com proteínas, o PrPc também é capaz de se ligar ao cobre (Cu^{+2}). BROWN e cols. (1997) demonstraram que a região amino-terminal de PrPc é a

responsável por essa ligação. Além disso, esses mesmos autores detectaram nos animais deficientes para PrPc (Prnp 0/0) uma redução significativa nas concentrações de cobre em extratos de cérebros enriquecidos em membrana e nas frações de sinaptossomos e de endossomos. Esses animais também apresentaram redução na atividade da enzima superóxido dismutase dependente de cobre/zinco e alterações de respostas eletrofisiológicas na presença de excesso de cobre. Essas evidências sugerem que PrPc pode ser uma metaloproteína dependente de Cu^{+2} . Em um outro artigo, BROWN e cols. (1999) demonstraram que PrPc apresenta uma atividade enzimática semelhante a de SOD.

Usando a metodologia do sistema de duplo-híbrido em *Saccharomyces cerevisiae*, RIEGER e cols. (1997) identificaram o precursor do receptor de laminina de 37 kDa como um ligante de PrPc. O sítio dessa interação no receptor de 37 kDa foi mapeado no mesmo domínio responsável pela sua ligação à laminina (resíduos 161-180). Foi visto também que altas quantidades do receptor estavam relacionados aos acúmulos de PrPsc em certos órgãos de animais infectados. Os resultados apresentados nesse trabalho levaram os autores a propor que esse receptor, o qual se encontra na membrana plasmática na sua forma madura de 67 kDa, poderia atuar como um receptor ou um co-receptor para o PrPc e também participar dos processos patológicos relacionados às doenças causadas por prions.

Nosso grupo identificou uma proteína de 60-66 kDa como também sendo um provável receptor para os prions (MARTINS e cols., 1997). No tópico seguinte, a identificação e a caracterização preliminar dessa proteína serão apresentadas.

1.10 O RECEPTOR DE 60-66 kDa

Normalmente, as proteínas de superfície celular ancoradas na membrana via GPI são internalizadas por estruturas conhecidas como cavéolas: invaginações de 50-100 nm da membrana plasmática que parecem estar envolvidas nos processos de sinalização transmembrânica, bem como no transporte celular (LISANTI e cols., 1994). No entanto, SHYNG e cols. (1994) demonstraram que a internalização do PrPc de galinha

transfectado em células N2a (neuroblastoma de camundongo) ocorre via vesículas de clatrina e não através de cavéolas, como seria esperado para uma proteína ligada à membrana por GPI. Já são conhecidos vários exemplos de receptores transmembrânicos que são endocitados em vesículas encapadas por clatrina. Sabe-se que o recrutamento de toda a maquinaria de clatrina depende de motivos específicos localizados no domínio citoplasmático dessas moléculas que serão internalizadas (KREIS e PEPPERKOV, 1994). A âncora de GPI presente no PrPc não seria capaz de induzir, por si só, os sinais necessários para a formação desse tipo de vesículas. Assim, para que o PrPc seja internalizado por essa via, especula-se que ele deva interagir com o domínio extracelular de uma outra proteína da superfície celular que contenha um domínio intracitoplasmático capaz de promover a formação de vesículas de clatrina (SHYNG e cols., 1995b).

Considerando-se essas e outras evidências que sugerem a existência de um provável receptor para o PrPc, nosso grupo interessou-se pela investigação dessa molécula. A abordagem utilizada para a caracterização dessa proteína baseia-se na teoria da hidropaticidade complementar dos aminoácidos, proposta por BLALOCK e SMITH (1994), que defende que peptídeos codificados por fitas complementares do DNA são capazes de interagir entre si. Esse princípio vem sendo testado em nosso laboratório e mostrou-se útil na caracterização das interações entre fibronectina e dois tipos de integrinas (PASQUALINI e cols., 1989; BRENTANI e cols., 1988), bem como na ligação entre colágeno e collagenase (DE SOUZA e BRENTANI, 1992). Além disso, há mais de 40 exemplos na literatura que sustentam essa teoria (BARANYI e cols., 1995).

O peptídeo 106-126 de prion humano é capaz de reproduzir, em cultura de células, todas as características do PrPsc, sendo neurotóxico e formando agregados insolúveis com características de material amilóide (FORLONI e cols., 1993). Um peptídeo menor, correspondente aos resíduos 106-114, também do PrPc humano, não mostrou-se neurotóxico (FORLONI e cols., 1993). SHYNG e cols. (1995b), através da construção de proteínas PrPc mutantes, demonstraram que a sequência 117-135 do PrPc de galinha é necessária para a endocitose dessa proteína através de vesículas de clatrina. Essa sequência corresponde aos resíduos 105-122 do PrPc humano. Deve-se enfatizar também que esse peptídeo está contido em uma região altamente conservada entre a proteína prion de várias espécies (GABRIEL e cols., 1992). Nós especulamos que a base

para essa neurotoxicidade seletiva seria devido ao peptídeo 106-126 conter o sítio de ligação para um possível receptor celular capaz internalizá-lo e/ou de induzir sinais celulares que levam o neurônio à morte. Assim, considerando esses dados e fundamentados na teoria da hidropaticidade complementar dos aminoácidos, deduzimos um peptídeo teórico-HVATKAPHHGPCRSSA-a partir da sequência de nucleotídeos complementar àquela que codifica o peptídeo 114-129 do PrPc humano, que como já mencionado, possui os sinais de neurotoxicidade e de internalização dessa molécula. De acordo com a teoria da hidropaticidade complementar, o peptídeo deduzido pode apresentar a mesma conformação do sítio de ligação de uma proteína (possivelmente um receptor) ao PrPc e ao PrPsc.

Esse peptídeo foi sintetizado quimicamente e utilizado na imunização de camundongos. O soro contra esse peptídeo teórico reconhece, em "Western blots", uma proteína específica de 60 kDa em extrato total de cérebro de camundongos. Em preparações de membrana plasmática purificadas de cérebro de camundongo, esse soro é capaz de reconhecer uma proteína com peso molecular um pouco superior, de aproximadamente 66 kDa. Ensaio de ligação, utilizando-se extratos enriquecidos de PrPc ou da proteína de 60-66 kDa, sugerem que a forma capaz de se ligar ao PrPc é a forma presente na membrana, de 66 kDa.

Experimentos de imunofluorescência e de microscopia confocal, feitos em cultura primária de neurônios, mostram que o soro anti-peptídeo complementar reconhece um antígeno de membrana. Além desses resultados, esse mesmo soro e o peptídeo complementar usado na sua produção são capazes de bloquear, *in vivo*, os efeitos neurotóxicos mediados pelo peptídeo de prion humano 106-126.

Esses dados, os quais já foram publicados (MARTINS e cols., 1997) e alguns também encontram-se na tese de doutorado do Dr. Edgard Graner (1996), sugerem fortemente a existência de um receptor para prions que pode ser responsável não só pela internalização dessas proteínas, como também mediar alguma resposta celular ao se ligar no PrPc. Esse receptor também pode estar envolvido no mecanismo de conversão de PrPc→PrPsc.

Recentemente, SHMERLING e colaboradores (1998) publicaram um trabalho no qual foram expressos PrPc com deleções amino-terminais em animais "knockouts" para

PrPc. Curiosamente, deleções correspondentes aos domínios 32-121 e 32-134 provocaram ataxia e morte neuronal limitada à camada granular do cerebelo nos animais estudados. O fenótipo normal (característico dessa linhagem de animais “knockout” para o gene de PrPc) era reestabelecido quando uma ou mais cópias do gene normal do PrPc eram introduzidas nos camundongos que possuíam múltiplas cópias do mesmo gene truncado nas regiões acima mencionadas. Com base nesses resultados, os autores do artigo especularam que o PrPc truncado poderia competir com uma outra molécula, capaz de desempenhar a mesma função que o PrPc, por um ligante comum. Assim, essa outra proteína seria responsável por manter o fenótipo normal nos camundongos “knockout” para PrPc. Entretanto, a introdução de PrPc deletados deslocava a ligação entre essa molécula “substituta” do PrPc e o ligante comum, e por não possuírem o domínio amino-terminal, não eram capazes de desempenhar sua função normal, causando assim o fenótipo observado. É interessante notar que a região deletada que parece ser importante para a função normal do PrPc compreende parte do domínio neurotóxico 114-129, o qual especulamos ser o sítio de ligação ao receptor de 60-66 kDa que caracterizamos. Esses achados reforçam a idéia de que a interação entre o receptor que caracterizamos e o PrPc desempenhe um importante papel fisiológico.

É importante comentar que artigos mais recentes demonstraram a localização de PrPc em cavéolas (VEY e cols., 1996) e que a sua conversão a PrPsc também ocorre nesses domínios (KANEKO, 1997a). Mesmo sendo ainda controversa a via de internalização dos prions (cavéola ou clatrina), a importância do receptor de 60-66 kDa não deve ser desconsiderada.

Na tentativa de uma melhor caracterização desse potencial receptor, houve a necessidade de obter a proteína prion celular purificada. Os métodos tradicionais de purificação de PrPc a partir de vários organismos são baseados em numerosas etapas de cromatografias que, além de demoradas, proporcionam um baixo rendimento. Assim optamos por expressar PrPc de camundongo em sistema heterólogo. Através do sistema de fusão GST, a proteína GST-PrPc foi expressa em bactéria (*E.coli*) e purificada. Ela foi utilizada em ensaios de ligação *in vitro* (“overlays”) na caracterização do receptor de 60-66 kDa. Esses resultados serão apresentados no presente trabalho e também encontram-se publicados (MARTINS e cols., 1997).

1.11 AS PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR E O PROCESSO DE AMILOIDOGENESE

Vem sendo descrito na literatura um grande número de evidências que indicam uma relação entre as proteínas da matriz extracelular (ECM) e o processo de amiloidogênese. Alguns resultados, de natureza estrutural, mostraram a presença de depósitos amilóides em regiões específicas da membrana basal e também grandes quantidades de proteínas da ECM como parte desses depósitos (YAMAGUCHI e cols., 1992; LINKE e cols., 1989; LYON e cols., 1991).

Modelos murinos da inflamação associada à amilóide (AA amilóide) trouxeram significativas informações a respeito dessa associação entre proteínas da matriz e placas amilóides. Verificou-se que deposições de proteínas de ECM e do soro precursor de amilóide A (SAA) colocalizavam-se. Heparan-sulfato proteoglicano foi identificado como constituinte das fibras desse tipo de amilóide. Esse mesmo proteoglicano era capaz de induzir mudança conformacional em SAA₂, um precursor específico da AA amilóide, aumentando o número de estruturas em folha β nessas moléculas. A conformação β parece ser compatível com a formação de material amilóide. Alguns trabalhos também sugerem que a indução de mRNAs de perlecan e da cadeia $\alpha 1$ (IV) de colágeno esteja relacionada à deposição de AA amilóide (revisado por NARINDRASORASAK e cols., 1995).

Resultados semelhantes foram obtidos em relação às placas β -amilóides formadas na doença de Alzheimer (AD). Perlecan, laminina, fibronectina e colágeno IV foram encontrados como constituintes desse tipo de amilóide (PERLMUTTER e cols., 1991; HOWARD e PILKINGTON, 1990). Sobretudo, as quantidades de mRNA de laminina apresentam-se extremamente elevadas no cérebro de pacientes com AD (MURTOMAKI e cols., 1992).

Quanto aos amilóides encontrados no sistema nervoso central de pacientes ou de animais portadores de doenças causadas por prions, além da proteína PrP^{Sc}, já foi detectado heparan-sulfato proteoglicano como constituinte destas placas (SNOW e cols., 1990; McBRIDE e cols., 1998).

Alguns trabalhos demonstraram uma ligação específica da proteína precursora de amilóide (APP) com fibronectina, entactina colágeno IV e perlecan

(NARINDRASORASAK, 1995) e com a laminina (NARINDRASORASAK e cols., 1992; NARINDRASORASAK e cols., 1995). Essa última interação ocorre na região da laminina onde está contida a sequência IKVAV (KIBBEY e cols., 1993), a qual parece estar envolvida nos processos de adesão e migração celulares, além de ter um importante papel na formação de neuritos (TASHIRO e cols., 1989). De fato, estudos realizados em cultura de células de origem nervosa sugerem a participação de APP na formação e manutenção de processos celulares (KOO e SELKOE, 1993). Cabe comentar que até então nenhuma função biológica tinha sido atribuída à APP, uma proteína transmembrânica de 110 kDa. O peptídeo β A4, derivado proteoliticamente da APP, é um dos principais componentes das placas amilóides encontradas nos cérebros de pacientes com AD. Dessa forma, foi visto que a interação entre APP e laminina, além de participar do processo patológico que leva à formação de placas amilóides na AD, também pode estar envolvida em processos fisiológicos da célula, como, por exemplo, na neuritogênese.

Levando em consideração esses dados e outros que mostram que PrPc e APP possuem alguma homologia (HAN e cols., 1995) e apresentam propriedades semelhantes (HSIAO, 1997), além de resultados obtidos em nosso laboratório que mostraram a co-localização de laminina e PrPc no hipocampo e no cerebelo de camundongos normais (GRANER, Tese de doutorado, 1996), decidimos investigar a existência de uma ligação específica entre PrPc e laminina. A caracterização dessa interação também será abordada neste trabalho.

1.12 A LAMININA (LN)

Dentre as várias moléculas presentes na membrana basal, a laminina (LN), a principal proteína não colagênica dessa estrutura, está associada a um grande número de fenômenos fisiológicos, sendo vital para variada quantidade de processos biológicos como embriogênese, e fenômenos imunológicos e hematológicos, estando também envolvida em processos patológicos, nos quais se inclui invasões parasitárias e bacterianas, além de metástases (BECK e cols., 1990).

A laminina foi originalmente isolada do tumor murino EHS (Engelbreth Holm Swarm), de onde pode ser extraída e purificada facilmente, em condições não desnaturantes (TIMPL e cols., 1979). Apesar de existirem outros tipos de laminina, aquela que é proveniente desse tumor constitui-se como protótipo e é conhecida como LN-1.

Do ponto de vista estrutural, a LN-1 é formada por três cadeias (cadeia α 1 de 440 kDa, cadeias β 1 e γ 1 de aproximadamente 220 kDa cada) que encontram-se arranjadas na forma de uma cruz (fig. 2) (TIMPL e cols., 1979). Novas isoformas das cadeias α , β e γ , vêm sendo descritas (ENGVALL, 1993) e as diferentes combinações destas produzem os onze tipos de laminina conhecidos até hoje (BURGESON, 1994), todos eles arranjados em estruturas cruciformes, semelhantes à LN-1.

Sabe-se que a laminina está envolvida em diversas atividades biológicas, dentre as quais pode-se citar adesão, migração e espalhamento celulares (KLEINMAN e cols., 1987), mas também deve-se destacar a participação dessa proteína em processos relacionados ao sistema nervoso central, como no crescimento de neuritos, no direcionamento do cone de crescimento e na formação de sinapses (VENSTRON e REICHARDT, 1993; LUCKENBILL-EDDS, 1997). Em seu artigo, CHEN e STRICKLAND (1997) demonstraram que a degradação de laminina via ativador de plasminogênio/plasmina promove a morte de neurônios hipocâmpais. Esses resultados indicam um possível papel da laminina na sobrevivência e manutenção de neurônios. Além disso, a interação dessas células com a matriz extracelular pode estar envolvida no processo normal de desenvolvimento (TALHOUK e cols., 1992; KALCHEIM e cols., 1987).

Alguns trabalhos, utilizando-se de anticorpos monoclonais, peptídeos sintéticos ou fragmentos característicos produzidos em proteólises específicas da laminina foram capazes de mapear nessa proteína certos sítios importantes, responsáveis por alguns dos papéis que ela desempenha. Assim, o pentapeptídeo YIGSR, que faz parte do braço curto da cadeia β 1, parece ser importante nos processos de adesão e migração e também na ligação do receptor de 67 kDa (SASAKI e cols., 1987; LIOTTA e cols., 1986). É importante comentar que esse sítio não se mostrou ativo em promover crescimento de neuritos (TASHIRO e cols., 1989). Na cadeia α 1 da laminina está contida a sequência

RGD, conhecida por ser o sítio de ligação às integrinas de várias proteínas de matriz, como fibronectina, vitronectina e colágeno. Entretanto, na laminina esse peptídeo parece não atuar nesse tipo de interação (SASAKI e cols., 1988, GEHLSSEN e cols., 1989). Resultados indicam que o domínio RGD dessa proteína promove o crescimento de processos celulares de uma linhagem celular específica, NG108-15 (TASHIRO e cols., 1989). TASHIRO e cols., em 1989, identificaram uma sequência presente na cadeia $\alpha 1$ da laminina -IKVAV- como sendo responsável por estimular processos de migração, adesão e também por promover o crescimento de neuritos em células PC12 e em neurônios de cerebelo. Como já comentado, a proteína precursora de amilóide envolvida na doença de Alzheimer (APP) liga-se nesse domínio específico da laminina (KIBBEY e cols., 1993), induzindo o processo de neuritogênese (KOO e SELKOE, 1993). LIESE e cols. (1989) identificaram a sequência RNIAEIIKDI, presente na cadeia $\gamma 1$ da laminina, como sendo importante na indução do crescimento de neuritos em cultura primária de neurônios do cerebelo, na adesão celular e também na migração neuronal (LIESI e cols., 1992; LIESI e cols, 1995).

A localização desses domínios na molécula de laminina encontra-se representada no esquema da figura 2. Peptídeos sintéticos correspondentes a esses sítios já bem estabelecidos podem ser utilizados como ferramentas para a caracterização das interações da laminina com outras proteínas. Como será visto adiante, essa estratégia foi abordada nesse trabalho para a investigação da associação entre o PrPc e a laminina.

As propriedades biológicas relacionadas à laminina devem-se, em grande parte, às associações que essa proteína é capaz de fazer com ligantes ou receptores específicos (VON de MARK e KUHL, 1985). Existem vários receptores de laminina descritos, do tipo integrinas ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ $\alpha 6\beta 4$ e $\alpha 7\beta 1$) e não-integrinas (proteínas de 67 e 110 kDa, entre outros) (KLEINMAN e cols., 1991). A investigação de novos ligantes, bem como a caracterização de sua interação com regiões específicas da laminina apresenta-se extremamente interessante, tendo em vista a ampla gama de processos normais e patológicos nos quais a laminina pode atuar. Nesse sentido, o estudo da interação entre essa proteína de matriz e o PrPc torna-se válido.

Figura 2: Representação esquemática da molécula de laminina, indicando a localização de alguns sítios biologicamente ativos da LN (retirado de TASHIRO, K. e cols., 1989).

1.13 PRODUÇÃO DE PrPc RECOMBINANTE EM SISTEMA HETERÓLOGO

Na tentativa de caracterizar as interações PrPc/receptor e PrPc/laminina, tivemos a necessidade de obter PrPc purificado. Os métodos de purificação de PrPc a partir de extratos de cérebros de animais consistem de diversos passos baseados em trabalhosas técnicas de cromatografias de afinidade e troca iônica e, por isso, esses processos exigem muito tempo, além de proporcionarem baixos rendimentos da proteína purificada (ROGERS e cols., 1992). Assim, devido às inúmeras dificuldades e à baixa eficiência desse tipo de purificação, os sistemas de expressão recombinante tornaram-se pré-requisitos para os estudos bioquímicos e estruturais do PrPc. Dessa forma, optamos por produzir PrPc em sistema heterólogo para utilizá-lo como ferramenta em vários ensaios necessários na investigação das interações já mencionadas.

Em 1995, WEISS e cols. descreveram um procedimento que permitiu o isolamento de PrPc de hamster em sistemas heterólogos. Através da expressão da proteína de fusão GST-PrPc, eles conseguiram obter miligramas de PrPc puros, estáveis e solúveis, tanto em *E. coli*, quanto em células de inseto infectadas com báculo-vírus.

O sistema bacteriano GST requer a utilização do plasmídeo pGEX. Esses vetores oferecem (ver o mapa na fig.3):

- uma origem de replicação bacteriana de pBR322, que permite a produção de um grande número de cópias de *E.coli*.
- o gene *Ap^r*, codificador da β -lactamase, que confere resistência à ampicilina
- um gene *lacI^q* que codifica um inibidor do promotor *lac*
- um promotor *tac*, induzível por IPTG (isopropil- β -D-thiogalactopinanosídio) e capaz de proporcionar altos níveis de expressão.

Logo após o promotor *tac*, segue-se nessa ordem: a sequência que codifica a porção efetora da enzima glutathione-S-transferase (GST) de *Schistosoma japonicum*; uma sequência que codifica sítios específicos para trombina ou para o fator X de coagulação, permitindo a clivagem entre a proteína desejada e a GST; um múltiplo sítio de clonagem e codons de terminação de tradução nos três quadros de leituras (SMITH e JOHNSON, 1988).

Uma das principais vantagens do sistema pGEX é a possibilidade de se produzir e purificar uma proteína recombinante na sua forma solúvel, com a manutenção de sua conformação original. As proteínas recombinantes são purificadas através da passagem do lisado bacteriano por uma coluna de glutathione-Sepharose, seguida de uma eluição com glutathione reduzida livre. Esses passos são todos feitos em condições não desnaturantes, o que é de grande importância para se manter tanto a conformação, quanto a atividade da proteína recombinante. Se houver necessidade, a proteína de interesse pode ser separada da GST através de clivagem por proteases específicas (SMITH, 1993). Outra facilidade do sistema pGEX é a sua disponibilidade comercial (ele é comercializado pela Pharmacia).

Como será visto, através do sistema GST fomos capazes de produzir GST-PrPc, o qual foi utilizado em vários ensaios para a caracterização das interações PrPc/receptor e PrPc/laminina. Entretanto, após algumas dificuldades obtidas com essa metodologia, resolvemos investir na produção de um outro tipo de PrPc recombinante.

Recentemente, vários trabalhos na literatura descreveram a expressão de PrPc (de várias espécies) em sistema heterólogo. Na maioria deles (NEGRO e cols., 1997; ZAHN e cols., 1997; VÖLKEL e cols., 1998; MARCOTTE e EISENBERG, 1999), o PrPc recombinante, expresso nos corpos de inclusão das bactérias, tinha que ser purificado em condições desnaturantes, o que levava à necessidade de uma etapa posterior de renaturação. Normalmente, essa é uma etapa crítica, de difícil controle, principalmente no caso do PrPc, o qual não apresenta uma função conhecida e, portanto, não há meios de medir sua atividade durante o processo de renaturação.

Em um desses trabalhos, ZANH e cols. (1997) apresentaram um método eficiente e relativamente simples para a produção de alguns polipeptídeos de PrPc humanos. Eles foram expressos com uma sequência N-terminal de seis histidinas, a qual permitiu a posterior purificação das proteínas de interesse através de uma cromatografia de metal-afinidade em uma resina de níquel-NTA (ácido nitrilotriacético) agarose, em condições desnaturantes. Nesse trabalho foi desenvolvido um protocolo de renaturação na própria resina, na qual as proteínas em questão apresentavam-se imobilizadas. Após a eluição, um rendimento de 10-20 mg de PrPc solúveis foi obtido. A manutenção da estrutura

dessa proteína na sua forma nativa, após a renaturação, foi monitorada através de técnicas espectroscópicas.

Figura 3: Mapas dos vetores de expressão pGEX. Para a expressão de GST-PrPc utilizou-se o plamídeo pGEX-4T-3. (retirado do manual da Pharmacia).

Baseados na metodologia desse artigo e dispondo do vetor pTrcHis-A, o qual permite a expressão de proteína recombinante com a sequência de seis histidinas, resolvemos produzir His₆-PrPc em bactérias.

O vetor pTrcHis-A (Invitrogen) (mapa apresentado na figura 4) foi designado para a expressão de proteínas recombinantes em E.coli. Ele possui o promotor Trc (-35 e -10), o operador Lac e o gene codificador LacIq que permitem a indutibilidade da expressão do gene de interesse por IPTG. O gene da β -lactamase, que confere resistência à ampicilina, também está presente. Esse vetor contém ainda, nessa ordem, uma sequência para reduzir o término prematuro da transcrição (anti-term), uma sequência amplificadora da tradução (g10 RBS), um sítio de ligação aos ribossomos (RBS) e uma sequência para expressão cistrônica (mini cístron). O codon de iniciação (met) é seguido de uma sequência de seis histidinas, a qual é expressa na porção amino-terminal, em fusão com a proteína de interesse. Há também diversos sítios de clonagem para a introdução do gene desejado e logo após um codon de terminação (CTS) que garante o fim da tradução. O vetor codifica ainda um sítio de clivagem para a enteroquinase (EK), que permite a remoção das seis histidinas se necessário.

A sequência de seis histidinas, expressa na porção N-terminal da proteína de interesse, permite a purificação dessa última através de uma cromatografia de metal-afinidade. Normalmente, para a realização dessa purificação utiliza-se a resina NTA (ácido nitrilotri acético-agarose), a qual é comercialmente disponível (Qiagen). Ela possui quatro sítios quelantes de íons metálicos que podem ocupar quatro dos seis sítios de coordenação dos íons Ni²⁺, deixando dois sítios livres para a interação com a sequência de seis histidinas (HOCHULI, 1989; HOCHULI, 1990). Outra resina também usada nesse tipo de purificação é a "HiTrap Chelating" (Pharmacia), que quando está carregada com íons Ni²⁺ retém seletivamente e principalmente proteínas com sequências de histidinas expostas. Assim, a purificação das proteínas recombinantes com a cauda de histidinas baseia-se na interação entre esses resíduos e o íon Ni²⁺. Para a expressão de proteínas pouco solúveis (como no caso do PrPc) esse sistema apresenta uma vantagem sobre aquele que utiliza a proteína de fusão GST: a purificação da proteína recombinante pode ser realizada em condições desnaturantes, pois elas permitem a solubilização da

maioria das proteínas e não alteram a ligação das histidinas ao Ni^{+2} . Nessas mesmas condições, a interação entre GST e a glutathione não é favorecida.

Para a remoção da proteína de interesse da resina pode-se utilizar concentrações determinadas de imidazol, já que esse composto também tem afinidade pelos íons de níquel e, portanto, compete com o anel imidazólico dos resíduos de histidina, promovendo a eluição da proteína recombinante.

Como será apresentado no presente trabalho, a produção dos dois tipos de PrPc recombinante (GST-PrPc e His₆-PrPc) foi um passo essencial para o desenvolvimento do trabalho do nosso grupo. A partir desses reagentes foi possível gerar resultados inéditos a respeito das interações PrP/receptor e PrPc/laminina.

2.OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos:

- 1) Produzir PrPc murino recombinante em sistema heterólogo (E. coli).
- 2) Identificar a ligação entre PrPc e o seu receptor de 60-66 kDa, com a ajuda de PrPc recombinante.
- 3) Identificar a existência de uma interação específica entre PrPc e laminina, através de ensaios de ligação utilizando PrPc recombinante.
- 4) Mapear na laminina o sítio responsável por sua ligação ao PrPc.
- 5) Verificar a relevância fisiológica da interação PrPc/laminina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PRODUÇÃO DE PrPc MURINO RECOMBINANTE EM SISTEMA HETERÓLOGO (E.coli)

A) Sistema de expressão GST

Extração de DNA de cérebro de camundongo

O cérebro de um camundongo Balb-C foi retirado e homogeneizado em 2ml de TES (10mM de Tris, pH 8,0; 10mM de EDTA e 0,5% de SDS), juntamente com a adição de 100µg de proteinase K. A digestão com essa enzima ocorreu a 37°C, durante 16 horas. Seguiu-se então duas extrações com fenol/clorofórmio e uma só com clorofórmio. O DNA foi precipitado com 2,5 volumes de etanol absoluto e 1/10 do volume de acetato de sódio 3M, por 2 horas, a -20°C. Após centrifugação de 15 minutos, a 10.000 rpm na centrífuga Sorval RC-5B, o sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi ressuspensão cuidadosamente em 500µl de água destilada e deionizada. Foi feito também um tratamento com RNase, a 37°C, durante 40 minutos. Repetiu-se a extração com fenol/clorofórmio e a precipitação com etanol absoluto, com a finalidade de se remover a enzima adicionada.

Amplificação do gene que codifica PrPc de camundongo

Iniciadores específicos foram sintetizados para a amplificação da região do gene codificadora de PrPc de camundongo, correspondentes aos aminoácidos 23-238. Os 22 primeiros aminoácidos foram descartados, pois eles correspondem ao pepídeo sinal, um domínio que é clivado logo após a tradução, originando a forma madura do PrPc. Os 23 aminoácidos da região carboxi-terminal também não foram incluídos, já que eles são retirados para que a âncora de GPI seja introduzida. Os oligonucleotídeos usados

apresentavam ainda sequências nucleotídicas reconhecidas pelas enzimas de restrição Bam HI e Eco RI para a realização de clonagem dirigida.

Iniciador "forward": 5' GAG GGATCC AAA AAGCGGCCAAAG 3'
extra Bam HI aa 23

Iniciador "reverse": 5' AGA GAATTC GGA GGAGAAAAGCACGGTG 3'
extra Eco RI aa 238

Cinquenta nanogramas do DNA extraído de cérebro de camundongo foram adicionados em uma reação de PCR (reação em cadeia da polimerase), na qual se utilizou os iniciadores mostrados acima em condições de alta exigência ($T_m=66^\circ\text{C}$).

Os produtos de PCR foram separados eletroforéticamente em um gel 8% de acrilamida, não desnaturante, o qual foi corado pela prata.

Coloração pela prata

Após a corrida, o gel é incubado, durante 5 minutos, na solução fixadora (10% etanol absoluto, 0.75% de ácido acético). Nitrato de prata para concentração final de 0,2% é adicionado durante 5-10 minutos. Seguem-se duas lavagens rápidas com água destilada e deionizada, após as quais se acrescenta a solução reveladora (1,8% NaOH, 0,12% de formaldeído). Essa última é removida após visualização das bandas e o gel é novamente incubado com o fixador.

Digestão com enzimas de restrição

Dez microgramas do plasmídeo isolado pGEX-4T-3 (Pharmacia) foram digeridos com 10 unidades da enzima de restrição Bam HI (BRL), por 16 horas, a 37°C . O produto dessa digestão sofreu então extrações com fenol/clorofórmio e uma precipitação com etanol absoluto. Após ressuspensão em água, esse produto foi submetido a uma nova digestão com a enzima Eco RI (10 unidades), por 16 horas, a 37°C . Como os sítios para essas duas enzimas são muito próximos, a digestão com uma enzima de cada vez favorece uma eficiência maior de clivagem.

O fragmento de cerca de 660 pares de bases do PrPc, resultante da reação de PCR, foi extraído com fenol/clorofórmio, precipitado com etanol e, após ser ressuspenso em

água, foi submetido à digestão dupla com as enzimas Eco RI e Bam HI (uma unidade de enzima para cada micrograma de DNA, por 16 horas, a 37°C).

Após as digestões com as enzimas de restrição, os produtos das mesmas, depois de extraídos com fenol/clorofórmio e precipitados com etanol, foram ressuspensos em água e utilizados em reações de ligação.

Reação de ligação

Quarenta nanogramas do vetor pGEX-4T-3 e 200ng do fragmento de DNA correspondente aos resíduos 23-238 do PrPc murino, ambos duplamente digeridos com Bam HI e Eco RI foram adicionados a uma reação de ligação (volume final de 20 μ l) com 200 unidades da enzima ligase (Biolabs). A reação ocorreu durante a noite, a 16°C.

Transformação dos produtos das ligações

Sete microlitros (1/3) de cada reação de ligação foram usados para transformação em bactérias DH5 α competentes. Após o choque térmico, as bactérias foram colocadas por 1h em 1ml de meio LB (1% de triptona; 0,5% de extrato de levedura; 1% de NaCl; pH 7,0), a 37°C. Em seguida foram sedimentadas através de centrifugação, ressuspensas em 200 μ l desse mesmo meio e plaqueadas em placas de LB-ágar (1,5% de ágar), contendo 50 μ g/ml de ampicilina. Algumas colônias isoladas de cada placa (de cada ligação) foram coletadas e crescidas em 5ml de LB+50 μ g/ml de ampicilina, por 16 horas, a 37°C, para posterior purificação de DNA plasmidial em pequena escala. Os plasmídios purificados, através do "kit" Wizard™ Mini Preps DNA Purification System (Promega), foram digeridos com as enzimas Eco RI e Bam HI, para verificação da liberação do inserto. Os clones que apresentaram o inserto foram então sequenciados.

Sequenciamento

Para as reações de sequência foi utilizado o "kit" "ABI Prism™ Big Dye™ Termination Cycle Sequencing Ready Reaction" (Perkin Elmer), conforme instruções do fabricante, e o processamento das mesmas foi realizado no sequenciador automático ABI Prism 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer).

Expressão e purificação de PrPc-GST em *E.coli* DH5α (conforme WEISS e cols., 1995)

As bactérias contendo pGEX-PrPc, obtidas de suspensão congelada, foram crescidas em 20 ml de meio 2xYT (1,6% de triptona; 1% de extrato de levedura; 0,5% de NaCl; pH 7,0), 50 µg/ml de ampicilina, por 16 horas, a 37°C, com agitação. Essa cultura saturada foi diluída 1:50 em 400 ml de 2xYT-G (2xYT suplementado com 2% de glicose) com 100 µg/ml de ampicilina e crescidas até D.O₆₀₀=0,6-0,8. A indução foi feita com 0,1 mM de IPTG (isopropil-β-D-thiogalactopinosídeo), por 1h, a 37°C. As bactérias foram sedimentadas por centrifugação a 4.000 x g, por 10 minutos, a 4°C, o precipitado lavado com STE (Tris 10mM [pH 8,0], NaCl 150mM, EDTA 1mM) e ressuspenso em 20 ml desse mesmo tampão. Foi adicionada lisozima (Sigma) a uma concentração final de 100 µg/ml, durante 15 minutos, no gelo. Após essa incubação, ditioneitol (DTT) e sarkosil (Ciba-Geigy) foram acrescidos para concentrações finais de 5 mM e 2%, respectivamente. A suspensão foi dividida em alíquotas de 5ml para sonicação. Após a lise, os restos celulares foram removidos através de centrifugação, por 20 minutos, 45.000 xg. Ao lisado, adicionou-se Triton X-100 para concentração final de 4%. Esse extrato foi incubado com 300 µl de glutathiona-Sepharose 4B (Pharmacia), previamente equilibrada com STE+2% de Sarkosil e 4% de Triton X-100. Essa incubação foi feita sob agitação lenta, a 4°C, durante a noite. A resina então foi lavada 3 vezes em STE (sem detergentes) e guardada a 4°C, com 1 volume de STE (1:1). Vinte microlitros da resina em STE (1:1), foram fervidos com tampão de amostra redutor (62 mM de Tris-HCL, 2% de SDS, 40% de glicerol, 0,2% de azul de bromofenol e 200 mM de 2-mercaptoetanol) e submetidos a um SDS-PAGE 10% (LAEMMLI, 1970), convencional. Após a corrida, o gel foi transferido para membrana de nitrocelulose e essa corada com Ponceau (Sigma) para a visualização das bandas.

"Western blot" com GST-PrPc

A membrana de nitrocelulose contendo a proteína de fusão, após bloqueio com 5% de leite (Molico), foi incubada com anticorpo policlonal anti-prion produzido em coelho (gentilmente cedido pelos Drs. Albert Taraboulos, da Hadassah Medical School de Jerusalém e Stanley Prusiner, da UCSF) na diluição 1:5.000, por 2 horas. Após 3 lavagens com TBST (20mM Tris pH 7.4, 120mM NaCl e 0,05% de Tween 20), seguiu-se incubação com anticorpo secundário, conjugado com peroxidase, diluído 1:1000 em TBST, por 1 hora. A reação foi revelada com a solução reveladora do "kit" "ECL

Western blotting analysis system" (Amersham) e as membranas foram expostas a um filme radiográfico (Kodak).

Digestão com proteinase K

Dez microgramas da proteína recombinante imobilizadas na Sepharose foram incubadas com 10 μ g de proteinase K, em um tampão adequado (10 mM Tris [pH 7,8], 0,5% SDS, 1mM CaCl_2), por 15 minutos, a 37°C. A reação foi bloqueada com a adição de tampão de amostra redutor e analisada através de um SDS-PAGE 10%.

Eluição de GST-PrPc da glutathiona-Sepharose com glutathiona reduzida livre

Glutathiona-Sepharose acoplada a GST-PrPc foi primeiramente equilibrada no tampão de eluição contendo 50 mM Tris (pH 8,0), 5 mM de DTT e 0,1% de Triton X-100. A proteína de fusão foi eluída pela adição de 1 volume de tampão de eluição acrescido de 18,3 mM de glutathiona reduzida (Pharmacia) à resina, durante 16 horas, a 4°C, sob agitação. O sobrenadante foi então separado da resina e ambos analisados em um SDS-PAGE 10% convencional. Quando necessário, a glutathiona livre foi dialisada.

Digestão de GST-PrPc com trombina

Quinze microgramas da proteína de fusão na Sepharose foram digeridos com 2,5 unidades NIH de trombina (Sigma, T6759) em 1 volume de um tampão específico (50mM Tris-HCL pH 8,0, 150mM NaCl, 2,5mM CaCl_2 , 5mM DTT), durante a noite, a 4°C. Após sedimentação, o sobrenadante e o precipitado (resina) foram separados, a cada um deles adicionou-se tampão de amostra redutor e ambos foram submetidos a um SDS-PAGE 10% para separação eletroforética e posterior coloração para análise das bandas.

B) Sistema de expressão baseado na cauda de histidinas

Expressão e purificação de His₆-PrPc em bactéria (conforme ZAHN e cols., 1997)

O fragmento de DNA correspondente aos resíduos 23-238 de PrPc de camundongo foi retirado do vetor pGEX-4T-3 e subclonado no vetor pTrcHis-A (Invitrogen) entre os sítios de restrição Bam HI e Eco RI.

Bactérias DH5α transformadas com pTrcHis-A contendo o inserto PrPc 23-238 foram crescidas em meio LB contendo 50µg/ml de ampicilina, a 37°C. Quando atingiram a D.O.₆₀₀=0,7, a expressão da proteína recombinante foi induzida com 1,5mM de IPTG, por 4 horas, a 37°C. As bactérias foram então sedimentadas por centrifugação, a 4.000 xg, por 10 minutos, a 4°C. O precipitado foi ressuspensão em 100ml de tampão G (6M cloreto de guanidina, 10mM Tris, 100mM Na₂HPO₄, 10mM de glutathione reduzida, pH 8,0) e lisado sob alta pressão (16.000 psi), com auxílio da prensa de French. Após centrifugação, a fração solúvel desse extrato foi incubada com 5ml de resina NTA-agarose (Qiagen), ou "Hi-Trap" carregada com Ni⁺² (Pharmacia). Após extensa lavagem com 250 ml de tampão G, aplicou-se um gradiente de 200ml, de tampão G ao tampão B (10mM Tris, 100mM Na₂HPO₄, pH 8,0). Proteínas ligadas a resina com baixa afinidade ao Ni⁺² foram removidas através de lavagem com 200ml de tampão B contendo 50mM de imidazol. A eluição da proteína recombinante His₆-PrPc foi realizada com a passagem de 30ml de tampão E (10mM Tris, 100mM Na₂HPO₄, 500mM imidazol, pH 5,8). Várias frações (de 1,2 ml) foram coletadas e uma alíquota de cada (35µl) foi submetida a um SDS-PAGE 12% para a verificação da presença da banda correspondente à proteína recombinante. As frações contendo His₆-PrPc foram combinadas e então dialisadas contra água. É importante comentar que todas as etapas da purificação foram realizadas a 4°C, com o auxílio de uma bomba peristáltica.

"Western blot" com His₆-PrPc

A membrana de nitrocelulose contendo a proteína de fusão His₆-PrPc, previamente separada por eletroforese em SDS-PAGE 12%, foi bloqueada com 5% de leite desnatado (Molico). Em seguida, foi realizada a incubação com o anticorpo

policlonal anti-prion (R340) produzido em coelho (gentilmente cedido pelo Dr. Charles Weissmann) na diluição 1:5.000 ou com um soro anti-GST-PrPc (1:1.000) produzido em nosso laboratório em camundongos "knockout" para PrPc, por 2 horas. Após 3 lavagens com TBST (20mM Tris pH 7.4, 120mM NaCl e 0,05% de Tween 20), seguiu-se incubação com anticorpo secundário, conjugado com peroxidase, diluído 1:1000 em TBST, por 1 hora. A reação foi revelada com a solução reveladora do "kit" "ECL Western blotting analysis system" (Amersham) e as membranas foram expostas a um filme radiográfico Kodak.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO PrPc/RECEPTOR

Peptídeo complementar e imunização dos camundongos

O peptídeo HVATKAPHHGPCRSSA codificado pela fita de DNA complementar aos nucleotídeos correspondentes aos resíduos 114-129 do gene de PrPc humano foi sintetizado quimicamente pela Neosystem (Strasbourg-France), acoplado à hemocianina (KLH) e usado na imunização de camundongos como descrito por MARTINS e cols, 1997, para a obtenção do soro anti-peptídeo complementar.

“Western blots” em extratos total e de membrana de cérebro de camundongo

O extrato total foi obtido após homogeneização de 10 cérebros de camundongos em 20 mL de tampão de lise (50mM Tris.HCl pH 7,4; 0,2% de deoxicolato de sódio; 0,5% Triton X-100; 1mM de aprotinina; 1mM de leupeptina; 1mM de PMSF e 1mM de benzamidina) e centrifugado a 12.000xg, por 30 min. O extrato de membrana de cérebro de camundongo foi preparado como descrito por ARVAN e cols. (1983), com algumas modificações. Brevemente, os cérebros foram homogeneizados em 10mM Hepes pH 7,4; 0,5mM MgCl₂, 1mM de aprotinina; 1mM de leupeptina; 1mM de PMSF e 1mM de benzamidina e centrifugados a 600xg durante 15 min. O sobrenadante foi então diluído 5 vezes no mesmo tampão já descrito, acrescido de 0,7mM de EDTA e centrifugado sobre um colchão de 0,3M de sacarose a 825xg, por 15 min. O precipitado foi ressuspenso em

1,38M de sacarose e centrifugado sob uma solução de sacarose 0,3M a 105.000xg, por 1 hora. A interface, na qual se encontram as membranas celulares, foi coletada e ressuspensa em tampão 20mM Tris.HCl pH 7,4; 120mM de NaCl; 1mM de aprotinina; 1mM de leupeptina; 1mM de PMSF e 1mM de benzamidina. Amostras desses extratos foram submetidas a um SDS-PAGE 10% e transferidas para membrana de nitrocelulose. Após bloqueio com Molico 5%, essas membranas foram incubadas com os soros primários, os quais serão especificados nas legendas das figuras, diluídos 1:300 em TBST (20mM Tris-HCl pH 7,4; 120mM de NaCl; 0,05% Tween 20), durante 2 horas, à temperatura ambiente. Após 3 lavagens com TBST, seguiu-se incubação com o anticorpo secundário, conjugado com peroxidase, diluído 1:1.000 em TBST, por 1 hora. A reação foi revelada com a solução reveladora do “kit” “ECL Western blotting analysis system” (Amersham) e as membranas foram expostas a um filme radiográfico Kodak.

Ensaio de ligação entre GST-PrPc e extratos contendo o receptor de 60-66 kDa

Cinco microgramas da proteína de fusão PrPc-GST ou apenas de GST foram submetidas a um SDS-PAGE 10% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. As membranas contendo essas proteínas, após bloqueio com 5% de leite desnatado (Molico) foram incubadas com 600 μ g (0,6mg/ml) de extrato total de cérebro de camundongo ou com a mesma quantidade de extrato de membrana purificada desse mesmo tecido, ambos diluídos em 1mL de TBST. Essa incubação se deu durante a noite, a 4°C. Após três lavagens com TBST, as membranas foram incubadas com o soro anti-peptídeo complementar ou soro normal de camundongo, ambos na diluição de 1:300. As reações foram reveladas com o anti-IgG de camundongo, conjugado com peroxidase e o sinal amplificado com a solução de quimioluminescência ("kit" ECL-Amersham).

Também foram feitos experimentos nos quais a proteína glutational S-transferase (GST) e a proteína recombinante GST-PrPc foram marcadas com 125 I (o método para a marcação dessas proteínas foi o mesmo que utilizado para a marcação da laminina - ver adiante) a uma atividade específica de 6,9x10⁴ cpm/ μ g. Extratos de membrana e total foram resolvidos em SDS-PAGE 10%, transferidos para nitrocelulose e incubados com 0,8x10⁶ cpm de GST ou de PrPc-GST, por 16 horas, a 4°C. Após 5 lavagens com TBST à temperatura ambiente, filmes de raio-X (Kodak) foram expostos às membranas.

Ensaio de citometria de fluxo

Células de neuroblastoma de camundongo (N2a) foram incubadas com anticorpo anti-PrPc R340 diluído 1:200 (gentilmente cedido pelo Dr. Chales Weissmann), por 1h, a 4°C, na presença ou não de 300µg de extrato de membrana purificado a partir de cérebros de camundongos. Em um determinado ensaio, esse último extrato foi pré-incubado com o soro anti-peptídeo complementar (1:50), por 1h, a 4°C, antes de ser adicionado às células. Após três lavagens com PBS, as células foram incubadas com o anticorpo secundário, conjugado a FITC (diluído 1:80), por 1h, a 4°C e lavadas novamente com PBS para leitura da fluorescência no citômetro. As análises foram feitas no citômetro Becton Dickinson FACScan, com laser de argônio a 488nm (San Jose, CA). A aquisição dos dados foi realizada no sistema Consort 32, através do programa Lysis II (Becton Dickinson). A frequência de positividade foi obtida a partir da subtração da porcentagem de células marcadas com anti-PrPc da porcentagem de células marcadas com o soro não-imune.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO PrPc/LAMININA

Ensaio de ligação entre laminina e GST-PrPc separado eletroforéticamente ("LN-overlay assay")

Esses experimentos de ligação foram feitos conforme descrito por CHAMMAS e cols. (1991). Brevemente, membranas de nitrocelulose contendo 2µg das proteínas recombinantes GST ou GST-PrPc separadas eletroforéticamente foram bloqueadas, por 2h, à temperatura ambiente, com 5% de leite desnatado (Molico) dissolvido em tampão TCM (50mM Tris-HCL, pH7,4; 50mM NaCl; 5mM CaCl₂; 5mM MgCl₂). Seguiu-se então a incubação das membranas com uma solução 10µg/ml de LN-1 (proveniente de tumor EHS) em TCM, durante 16h, à temperatura ambiente. Após extensiva lavagem com TCM, as membranas foram incubadas, por 2h, com soro anti-LN ou soro não imune de coelho (ambos diluídos em TCM, 1:500) e depois de novas lavagens elas foram incubadas com anti-IgG de coelho, conjugado com fosfatase alcalina (diluído 1:3000). A

revelação da reação foi feita com a adição dos substratos BCIP e NBT (Gibco-BRL) em um tampão apropriado para a atividade da fosfatase alcalina (Tris 100mM, pH 9,5; NaCl 100mM; MgCl₂ 5mM).

Marcação de laminina com iodo 125

Trezentos microgramas de laminina-1 proveniente de tumor EHS, purificada como descrito por TIMPL e cols. (1979), foram marcados com 0,5 mCi de Na¹²⁵I (Amersham), utilizando-se “Iodo-beads” (Pierce), durante 15 minutos, sob agitação. A reação foi bloqueada com a retirada dos “beads” da solução. A proteína marcada foi separada do Na¹²⁵I através de uma gel filtração em Sephadex G-25. As frações contendo laminina foram então combinadas, uma alíquota foi contada e os cálculos de concentração e atividade específica foram feitos.

Curva de ligação entre laminina marcada e GST-PrPc

Concentrações crescentes de laminina marcada a uma atividade específica de $2,6 \times 10^6$ cpm/ μ g foram incubadas com 0,2 μ g de GST ou GST-PrPc acoplados à glutathiona-Sepharose, em TBS (20 mM de Tris, pH 7,4; 150 mM de NaCl), durante 16 horas, a 4°C, sob agitação. As resinas foram então lavadas 3 vezes com TBS e depois a radioatividade incorporada nas mesmas foi medida no contador gama (LKB Wallac). É importante comentar que para cada ponto da curva foram feitas duplicatas. Obteve-se, dessa forma, duas curvas: uma total, resultado da ligação da laminina à proteína de fusão GST-PrPc e a outra inespecífica, proveniente da ligação entre a laminina e GST sozinha. Da subtração dos valores dessas duas curvas conseguiu-se um gráfico específico para ligação PrPc/laminina.

Ensaio de competição da ligação entre laminina e GST-PrPc com peptídeos específicos

Duzentos nanogramas de GST-PrPc ou de GST (sempre usado como controle), adsorvidos à glutathiona-Sepharose foram previamente incubados, em TBS (20 mM de Tris, pH 7,4; 150 mM de NaCl), com 30-300 μ g (ou $5,4 \times 10^{-5}$ - $10,8 \times 10^{-4}$ M) de certos peptídeos quimicamente sintetizados, correspondentes a domínios conhecidos e de

funções estabelecidas da laminina: IKVAV, YIGSR e RNIAEIIKDI. Esse tratamento foi realizado durante 2 horas, a 4°C. Em seguida, adicionou-se a cada tubo 6 μg de ^{125}I -laminina e essa incubação continuou por mais 16 horas, também a 4°C. As resinas foram então lavadas 3 vezes com 1ml de TBS e, em seguida, a radioatividade incorporada foi medida no contador gama (LKB Wallac). A porcentagem de ligação específica (diferença entre as ligações GST-PrPc e GST) foi calculada em relação ao tubo controle, no qual não foi adicionado peptídeo (100% de ligação).

Ensaio de ligação usando ^{125}I His₆-PrPc

Curva de ligação: Laminina-1, proveniente do tumor murino EHS, foi adsorvida em placas de plástico (0,1 μg /poço), durante 24 horas, a 4°C. Para o bloqueio de interações inespecíficas, adicionou-se a cada poço uma solução de 2% BSA (albumina de soro bovino), por 2h, a temperatura ambiente. As placas foram então incubadas com quantidades crescentes de His₆-PrPc marcado com ^{125}I (através da mesma metodologia descrita para a marcação da laminina), durante 16h, a 4°C. Após lavagem extensiva com TBS, a radioatividade incorporada em cada poço foi medida através de um contador gama (Minigamma Counter-LKB Wallac). Com esses valores foi possível construir a curva total de ligação. Para a curva inespecífica, placas sensibilizadas com laminina foram pré-incubadas com uma quantidade 3 vezes maior de His₆-PrPc não marcado, por 2 horas, à temperatura ambiente, antes da adição do ^{125}I His₆-PrPc. A curva específica para a ligação His₆-PrPc/laminina foi obtida subtraindo-se os valores inespecíficos dos valores totais.

"Overlay": Quatro e meio pmoles de certas proteínas purificadas (Laminina-1, fibronectina, colágeno tipo 1 e BSA) foram adsorvidas em uma membrana de nitrocelulose ("dot-blot"). Essa membrana foi bloqueada com TCM (50mM Tris-HCL, pH7,4; 50mM NaCl; 5mM CaCl₂; 5mM MgCl₂) contendo 5% de leite desnatado (Molico), por 2 horas, à temperatura ambiente. Logo em seguida, incubou-se a mesma membrana com 2 μg /ml de His₆-PrPc marcado com ^{125}I , diluído em TCM, durante a noite, à temperatura ambiente. Após extensiva lavagem com TCM contendo 0,2% de Tween-20, a membrana foi exposta a um filme autorradiográfico (Kodak) e os sinais obtidos foram quantificados através de densitometria e normalizados pelo número de moles de cada proteína.

Experimento de esquiiva inibitória

Noventa ratos adultos Wistar (200-300g) foram implantados bilateralmente na área CA1 do hipocampo dorsal com uma cânula de 9mm, como descrito anteriormente (BERNABEU e cols., 1997; IZQUIERDO e cols., 1997). Três ou sete dias após essa cirurgia, os ratos foram submetidos às sessões de treino. Nessas sessões, os animais foram colocados sobre uma plataforma de 7cm de largura e 2,5cm de altura situada em uma caixa de acrílico de 50x25x25cm. O chão desta caixa consiste de uma grade de barras de aço paralelas. O tempo que cada animal demorou para descer da plataforma foi medido, com a ajuda um cronômetro automático. Nas sessões de treino, assim que o animal descia da plataforma para a grade, ele recebia um choque em suas patas de 0,4mA, por 2 segundos.

Os ratos, imediatamente após o treino, receberam 5 μ l bilateralmente através da cânula localizada na área específica do hipocampo, soluções de salina, de IgG de coelho pré-imune purificada (0,90 ou 0,09 μ g/lado), de IgG purificada de anti-PrPc (0,36 ou 0,9 μ g/lado), de IgG purificada de anti-LN (0,09 μ g/lado), do peptídeo RNIAEIIKDI (derivado da cadeia γ 1 da laminina) (0,04 μ g/lado) ou desse mesmo peptídeo co-injetado com IgG de anti-PrPc purificada (0,90 μ g/lado). Como controle, um peptídeo com os mesmos resíduos que aquele derivado da cadeia γ 1 da laminina, porém arranjados em outra ordem ("Scrambled") também foi infundido sozinho (0,04 μ g/lado) ou com IgG purificada de anti-PrPc (0,90 μ g/lado). Após 24 horas, os ratos treinados que receberam esses tratamentos foram então submetidos ao teste. Nas sessões de teste, os mesmos animais são recolocados na plataforma e o tempo que eles levam para descer até a grade é novamente medido. Nessa etapa, o choque não é mais administrado.

Como controle, depois do experimento, os animais foram infundidos, através da cânula, com 4% de azul de metileno em salina, sacrificados e seus cérebros processados para histologia (BERNABEU e cols., 1997; IZQUIERDO e cols., 1997) para verificação da localização da cânula. Só os animais com a cânula situada corretamente na área pretendida é que foram incluídos na análise estatística dos resultados.

Análises de variância de Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney U foram aplicados para avaliar estatisticamente os resultados obtidos nas sessões de treino e de

teste. A comparação entre os valores obtidos nessas duas sessões foi feita através do teste de Wilcoxon. Em todas as comparações, $p < 0,05$ indica significância estatística.

4. RESULTADOS

4.1 QUANTO À PRODUÇÃO DE PrPc EM SISTEMA HETERÓLOGO

A) Através do sistema GST

O fragmento de DNA correspondente ao PrPc 23-238 de camundongo foi amplificado através de PCR com os iniciadores específicos (ver em "Materiais e Métodos"). A canaleta 2 da figura 5 apresenta o produto dessa reação: uma banda de cerca de 660 pares de base (pb), de acordo com o que se esperava obter. Na canaleta 3 dessa mesma figura é mostrado o controle negativo dessa reação, isto é, no tubo de PCR foram adicionados todos os reagentes, exceto o DNA extraído de cérebro de camundongo. Pode-se perceber a presença de algumas bandas nessa canaleta, que resultaram, provavelmente, da amplificação de moléculas de DNA contaminantes. Entretanto, nenhuma banda na altura de 660 pb foi encontrada, indicando que a reação da canaleta 2 foi realmente específica.

Esse fragmento de DNA foi então clonado entre os sítios de restrição Bam HI e Eco RI do vetor pGEX-4T-3, o qual foi transformado e amplificado em *E.coli* DH5 α . Na canaleta 3 da figura 6, o produto da digestão dupla com as enzimas Eco RI e Bam HI de um dos clones obtido pode ser visualizado. O inserto liberado tem a mesma migração eletroforética no gel que o produto da PCR (canaleta 5), sugerindo que esse clone apresenta a sequência de nucleotídeos correspondente ao PrPc 23-238. Essa sequência foi confirmada com o sequenciamento automático do inserto (resultado não apresentado).

Figura 5: Produtos da PCR realizada para amplificar o fragmento de DNA correspondente aos resíduos 23-238 de PrPc murino. Na canaleta 2 esse produto de cerca de 660 pb pode ser visto. A canaleta 3 apresenta o controle negativo dessa reação. O padrão de peso molecular "100 bp Leader" (BRL) está em 1. Esses produtos foram submetidos a um gel de poliacrilamida 8%, não desnaturante, corado pela prata.

Figura 6: Digestão do clone pGEX-PrPc com as enzimas de restrição Eco RI e Bam HI, mostrando liberação do inserto de 660 pb (canaleta 3). As canaletas 4 e 5 correspondem respectivamente ao plasmídeo pGEX sem inserto digerido com as mesmas enzimas e ao produto da PCR específica para a amplificação de PrPc 23-238. Na primeira canaleta foi aplicado o padrão "lambda Hind III" (BRL) e na segunda está o padrão "100 bp Leader".

Realizou-se, então, uma tentativa de expressão da proteína recombinante GST-PrPc. Para isso, as bactérias transformadas com o vetor pGEX-PrPc foram crescidas em 5 ml de meio 2xYT-G. Após atingirem a $D.O_{600}=0,6-0,8$, uma alíquota de 1ml da suspensão de bactérias foi induzida com 0,1mM de IPTG, e outra alíquota, de mesmo volume, não sofreu indução. Estas foram então centrifugadas, os precipitados das bactérias ressuspensos em tampão de amostra redutor e submetidos a um SDS-PAGE 10%. Após a corrida, o gel foi corado com o corante Coomassie Blue para a visualização das bandas. A figura 7 apresenta esse resultado. No extrato de bactérias não induzido (canaleta "N") pode-se ver várias bandas. Na canaleta "I", onde foi aplicado o extrato das bactérias induzidas com IPTG, também percebe-se um padrão de bandas semelhante ao da canaleta "N". Porém, uma banda de aproximadamente 46 kDa se destaca e provavelmente, deve corresponder à proteína recombinante GST-PrPc, já que ela se encontra dentro do peso molecular esperado (28 kDa da GST + cerca de 20 kDa do PrPc). O mesmo ensaio foi feito também com bactérias transformadas com o mesmo vetor pGEX, porém sem o inserto correspondente ao PrPc 23-238. Comparando-se extrato bacteriano tratado e não tratado com IPTG, destacou-se no primeiro uma banda com peso molecular aproximado de 28 kDa, peso correspondente à proteína GST. Esses resultados (não mostrados) indicam que a indução do promotor *tac* estava funcionando.

Figura 7: Indução da proteína recombinante GST-PrPc. Amostras de extratos da bactéria transformada com pGEX-PrPc induzida (I) ou não induzida (N) com IPTG foram submetidas a um SDS-PAGE 10% e, após corrida, o gel foi corado com Coomassie Blue. Na canaleta I destaca-se uma banda de aproximadamente 46kDa (seta), correspondente, provavelmente, ao GST-PrPc.

Havia, dessa forma, algumas evidências de que o clone obtido estava expressando o PrPc. Decidiu-se então utilizar esse clone para a produção de GST-PrPc em larga

escala. Através do protocolo de purificação descrito por WEISS e cols. (1995), conseguimos obter quantidades significativas de GST-PrPc puros, ligados à glutathiona-Sepharose. Na canaleta 2, da figura 8 pode-se visualizar uma banda de aproximadamente 46 kDa, correspondente à proteína de fusão que se ligou à Sepharose. A certeza de que essa banda tratava-se realmente de GST-PrPc veio com a realização de um "Western blot" feito com um anticorpo anti-prion disponível em nosso laboratório (gentilmente cedido pelos Drs. Albert Taraboulos, da Hadassah Medical School de Jerusalém e Stanley Prusiner, da UCSF). A canaleta 3 da figura 8 mostra que 5 μ g dessa proteína, após serem submetidos a um SDS-PAGE 10% e transferidos para membrana de nitrocelulose, foram reconhecidos pelo soro anti-prion, em ensaio de "Western blot" quimioluminescente. Na canaleta 4, realizou-se o controle negativo dessa reação: um soro de coelho pré-imune não é capaz de reconhecer essa proteína, nas mesmas condições. A canaleta 5, na qual 5 μ g de GST foram aplicados, demonstra que o soro anti-prion não tem reação cruzada com essa enzima. Ele reconhece especificamente a parte PrPc da proteína recombinante.

Figura 8: Reação de "Western blot" quimioluminescente: proteína recombinante de 46 kDa na membrana de nitrocelulose (2) é reconhecida pelo soro anti-PrPc (3). Essa mesma proteína não é reconhecida por um soro pré-imune de coelho (4). A proteína GST sozinha, de 28 kDa (1), não é reconhecida pelo soro anti-PrPc (5) e nem pelo soro pré-imune de coelho (6).

Uma das principais características que difere PrPc de PrPsc diz respeito à sensibilidade dessas moléculas à digestão por proteases. Enquanto PrPc é sensível à ação dessas enzimas, sua isoforma anormal apresenta-se resistente (MEYER e cols., 1986). Com a finalidade de se confirmar se a proteína que estava sendo expressa em *E.coli* tratava-se de PrPc e não de PrPsc, realizou-se a digestão da mesma com proteinase K. Como mostrado na figura 9, a proteína GST-PrPc (presente na canaleta 2) foi totalmente digerida pela enzima (canaleta 1), indicando que a isoforma normal do PrP estava sendo expressa.

Figura 9: Digestão de GST-PrPc com proteinase K. Na canaleta 1 foi aplicado o produto dessa digestão e na canaleta 2 aplicou-se GST-PrPc sem o tratamento com a enzima. Verifica-se que a proteína recombinante é totalmente susceptível à ação proteolítica. Em 3 está o padrão de peso molecular. As amostras foram resolvidas em um SDS-PAGE 10% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Essa última foi corada com Ponceau, para visualização das bandas.

Com a necessidade de se obter GST-PrPc solúvel para a realização dos ensaios de ligação com outras moléculas, realizamos uma tentativa de eluição dessa proteína da glutathiona-Sepharose, através da adição de glutathiona reduzida livre. Nessas condições, é possível obter proteínas recombinantes purificadas solúveis, com a manutenção de sua conformação original. A figura 10A indica que apenas uma pequena fração de GST-PrPc (menos de 1%) pôde ser eluída (canaleta 2). Grande parte da proteína de fusão permanece ligada à glutathiona-Sepharose (canaleta 1).

As proteínas de fusão do sistema GST possuem um sítio específico para a clivagem por trombina, o que permite a separação entre GST e a outra proteína. Quando digeridas com essa enzima, GST permanece ligada à glutathiona-Sepharose enquanto que a proteína de interesse é liberada para o sobrenadante. Contudo, quando GST-PrPc ligado à Sepharose foi digerido com essa enzima, o PrPc não foi encontrado no sobrenadante (fig. 10B, canaleta 2) e sim na resina, juntamente com GST (canaleta 3). Assim, na canaleta 3 da figura 10B estão todos os produtos dessa digestão separados eletroforéticamente em um SDS-PAGE 10%. Pode-se verificar a presença de um dublê na altura de 20-28 kDa. A banda de maior peso corresponde à proteína GST (presente purificada na canaleta 1) e a de menor corresponde ao PrPc (cerca de 20 kDa). Nessa mesma canaleta ainda pode-se observar uma banda fraca na altura de 46 kDa, indicando que houve digestão parcial de GST-PrPc.

Figura 10: A) Eluição de GST-PrPC da Sepharose através da adição de glutathiona reduzida livre. Após a eluição, separou-se a resina (canaleta 1) do eluato (canaleta 2) por centrifugação e cada uma das amostras foi resolvida em um SDS-PAGE 10% para a visualização das bandas com o corante Coomassie Blue.

B) Digestão de GST-PrPc com trombina. Cinco microgramas de GST-PrPc imobilizados na glutathiona-Sepharose foram digeridos com trombina. Separou-se o sobrenadante (canaleta 2) da resina (canaleta 3) e então essas amostras foram separadas eletroforéticamente, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e coradas pelo Ponceau S. Na canaleta 1 foram aplicados 2 μ g de GST.

Os resultados acima mostram que utilizando o protocolo descrito na literatura por WEISS e cols. (1995), fomos capazes de obter GST-PrPc purificado, a partir de sua expressão em bactérias E.coli DH5 α . Todavia, esses autores tiveram um rendimento igual ou superior a 2 mg de proteína recombinante por litro de cultura, ao passo que nós conseguimos apenas 0,5 mg/litro de cultura. Além disso, praticamente toda essa quantidade de GST-PrPc que obtivemos permaneceu ligada à glutationa-Sepharose. Com isso, como será visto nos demais resultados apresentados nesse trabalho, muitos ensaios tiveram que ser adaptados para a utilização dessa proteína recombinante imobilizada na Sepharose.

B) Através do sistema de expressão baseado na cauda de histidinas

O baixo rendimento de GST-PrPc solúvel (eluído da glutationa-Sepharose) que vinha sendo obtido trouxe a necessidade de se investir na produção de PrPc recombinante através de um outro sistema. Pesquisas na literatura nos levaram a optar pelo sistema baseado na cauda de poli-histidina. Dessa forma, subclonou-se o fragmento correspondente aos resíduos 23-238 do PrPc murino nos sítios de restrição Bam HI-Eco RI do vetor pTrcHis-A (Invitrogen), a partir do plasmídeo pGEX que apresentava esse inserto (e era usado na produção de GST-PrPc em nosso laboratório). Essa construção foi então transformada em E.coli DH5 α . Várias colônias foram obtidas e trinta e cinco delas foram analisadas quanto à presença ou não do inserto desejado, através de reações de PCR com iniciadores específicos para esse fragmento. Foi visto que todos os clones selecionados apresentavam o inserto do tamanho esperado (cerca de 660 bp) (resultado não mostrado). Desses clones, cinco foram escolhidos ao acaso para isolamento dos plasmídeos e posterior digestão dupla desses com as enzimas Bam HI e Eco RI para confirmar a presença do inserto. Na figura 11 pode-se visualizar que os cinco vetores liberaram o inserto de 660 pb (pares de base) após a digestão (canaletas 2-6).

Figura 11: O fragmento de 660 bp contendo os nucleotídeos que codificam para os resíduos 23-238 de PrPc de camundongo foi subclonado entre os sítios de restrição Bam HI-Eco RI do vetor de expressão pTrcHis-A. Após transformação e amplificação em DH5 α , cinco plasmídeos de vários clones obtidos foram digeridos com as enzimas Bam HI e Eco RI (canaletas 2-6) com a finalidade de verificar a presença do inserto desejado. A flecha indica a altura dos insertos liberados após a digestão. Os mesmos vetores não digeridos encontram-se nas canaletas 7-11. Como controle da reação, o plasmídeo pGEX-4T-3 contendo o mesmo inserto também foi digerido com as mesmas enzimas (canaleta 1).

Destes clones, quatro foram então testados para a expressão da proteína recombinante His₆-PrPc. Eles foram inoculados em meio LB contendo 50 μ g/ml de ampicilina. Após atingirem a D.O.₆₀₀=0,7, uma alíquota de cada, de 1ml da suspensão de bactérias, foi induzida com 1,5mM de IPTG durante 4 horas e outra alíquota, do mesmo volume, não sofreu indução. Após esse tratamento, as suspensões foram centrifugadas e os precipitados foram ressuspensos em tampão de amostra redutor para análise em SDS-PAGE 12% corado com Coomassie Blue. Esse resultado está demonstrado na figura 12. Comparando-se as canaletas correspondentes às amostras induzidas (canaletas 2, 4, 6 e 8) com a canaletas das amostras não induzidas (3, 5, 7 e 9), nota-se a presença de uma única banda diferencialmente expressa somente naquelas amostras que sofreram indução. Com peso molecular ao redor de 32 kDa, essa banda possui exatamente o tamanho esperado para a proteína recombinante desejada His₆-PrPc.

Figura 12: Os quatro clones escolhidos da bactéria DH5 α transformada com o vetor pTrcHis-A contendo o inserto correspondente ao PrPc 23-238 de camundongo foram analisados quanto à expressão da proteína recombinante His₆-PrPc. Extratos correspondentes a alíquotas de bactérias induzidas (canaletas 2, 4, 6 e 8) ou não (canaletas 3, 5, 7 e 9) com IPTG foram submetidos a um SDS-PAGE 12%, corado com Coomassie Blue. A seta indica que uma banda de cerca de 32 kDa foi expressa especificamente nas amostras induzidas, sugerindo a produção do recombinante desejado nesses clones. Na canaleta 1 encontra-se um marcador de peso molecular de 28 kDa.

Assim, tomou-se um desses clones para a expressão e purificação dessa proteína em larga escala. Seguindo o protocolo de purificação descrito por ZAHN e cols. (1997), após centrifugação, as bactérias induzidas para a expressão de His₆-PrPc foram lisadas em um tampão desnaturante e redutor, com a finalidade de tornar a proteína de interesse solúvel, já que ela se localiza nos chamados corpos de inclusão. O extrato resultante foi então incubado com a resina Hi-Trap (que contém Ni⁺²) e a proteína contendo a cauda de 6 histidinas, imobilizada nessa coluna, foi submetida a um processo de renaturação e oxidação. Seguiu-se então a eluição com 0,5 M de imidazol. Uma amostra (cerca de 3%) de cada fração eluída foi analisada em SDS-PAGE 12% corado com Coomassie Blue. Como pode ser visto na figura 13A, a banda correspondente a proteína recombinante aparece na frações 4-16. Esses eluatos foram combinados e dialisados contra água. Com esse protocolo foi possível obter aproximadamente 250 μ g de His₆-PrPc solúveis por litro de cultura. O "Western blot" da figura 13B indica que essa proteína é mesmo PrPc, pois ela é reconhecida por um soro anti-PrPc específico (canaleta 2), gentilmente cedido pelos Drs. Albert Taraboulos e Stanley Prusiner, e também por um soro anti-GST-PrPc produzido em nosso laboratório (canaleta 3).

Figura 13: A) Expressão e purificação de His₆-PrPc em larga escala. O PrPc (23-238) murino foi expresso juntamente com uma cauda de 6 resíduos de histidinas e purificado em resina de níquel. Após renaturação, a proteína recombinante foi removida da resina com a adição de 0,5M de imidazol e uma alíquota de cada fração eluída foi submetida a um SDS-PAGE 12%, posteriormente corado com Coomassie Blue (canaletas 1-16). Nas frações 4-16 pode-se visualizar uma banda de cerca de 32 kDa (setas) correspondente à proteína recombinante de interesse.

B) Cinco microgramas de GST-PrPc (canaleta 1) e da proteína recombinante eluída da resina de níquel (canaletas 2-5) foram separadas eletroforéticamente em um SDS-PAGE 12% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Em análises de "western blot", um soro específico anti-PrPc (canaletas 1 e 2) e um soro anti-GST-PrPc (canaleta 3) foram capazes de reconhecer a proteína purificada através da resina de níquel, provando que esse recombinante produzido é mesmo His₆-PrPc, como esperado. Essa mesma molécula não é reconhecida pelos soros não imunes de coelho (canaleta 4) ou de camundongo (canaleta 5).

Dispondo-se agora de quantidades significativas da proteína recombinante His₆-PrPc solúveis, foi possível melhorar a execução de vários ensaios realizados em nosso laboratório.

4.2 QUANTO À INTERAÇÃO PrPc/RECEPTOR

Antes da expressão e purificação de GST-PrPc em bactéria, tínhamos evidências de que a proteína de 66 kDa, a forma de membrana do provável receptor de prion, reconhecida pelo soro anti-peptídeo complementar, era capaz de se ligar ao PrPc através de ensaios de “overlay”. Nestes experimentos, frações enriquecidas das duas moléculas (PrPc ou receptor) foram utilizadas. O resultado desses ensaios pode ser visto na figura 4D do artigo do nosso grupo já publicado (MARTINS e cols., 1997), em anexo.

Apesar desses “overlays” com extratos enriquecidos terem sido bastante informativos, houve a necessidade de se obter PrPc purificado para a confirmação dos resultados.

Após expressão, purificação e eluição da proteína recombinante GST-PrPc, essa foi marcada com ^{125}I e incubada com extratos total (fig. 14A) ou de membrana purificada de cérebro de camundongo (fig. 14B) separados em SDS-PAGE 10% e imobilizados em membrana de nitrocelulose. Foi visto que GST-PrPc ligou-se a várias bandas no extrato de membrana (fig. 14B, canaleta 3), sendo que uma delas, a de 66 kDa, comigrava com a proteína reconhecida pelo soro anti-peptídeo complementar (fig 14B, canaleta 2). Com o objetivo de mostrar que a responsável pela ligação era a parte PrPc da proteína de fusão, somente GST foi marcada da mesma maneira e o ensaio de “overlay” repetido. A canaleta 4 da figura 14B indica que essa proteína não é capaz de se ligar a nenhuma banda do extrato de membrana, sugerindo que a ligação de GST-PrPc na molécula de 66 kDa é específica para o PrPc.

Em extrato total de cérebro de camundongo (fig. 14A), a proteína receptora está presente, como indicado na reação de “Western blot” com soro específico (canaleta 2), e apresenta peso molecular ligeiramente inferior (60 kDa) quando comparada a sua isoforma encontrada na membrana. Nesse extrato não foi possível detectar nenhuma ligação específica com a proteína recombinante ^{125}I -GST-PrPc.

Figura 14: Ensaios de ligação usando a proteína recombinante GST-PrPc marcada com ^{125}I . Extrato total de cérebro de camundongo (a) ou extrato de membrana purificada de cérebro desse mesmo animal (b) foram separados eletroforéticamente. “Western blots” usando soro não imune (canaletas 1) ou o soro anti-peptídeo complementar (canaletas 2) foram realizados. As canaletas 3 e 4 foram respectivamente incubadas com as proteínas GST-PrPc ou GST iodinadas. Após lavagem, as membranas foram autorradiografadas.

Quando GST-PrPc, separado eletroforéticamente e transferido para uma membrana de nitrocelulose, foi incubado com a fração de membrana, o soro anti-peptídeo complementar reconheceu a banda na altura da proteína de fusão-46 kDa (fig. 15, canaleta 7). Nessas mesmas condições, quando incubou-se extrato total de cérebro de camundongo com GST-PrPc, não detectou-se reação na altura de 46 kDa. Só após exposição prolongada é que a ligação entre a proteína recombinante e o receptor podia ser identificada. É importante comentar que o soro anti-peptídeo complementar não reconhece GST-PrPc (fig. 15, canaleta 6), sustentando que, após o “overlay”, a reatividade na banda de 46 kDa representa a ligação da proteína de 66 kDa na proteína de fusão imobilizada na membrana de nitrocelulose.

A análise dos resultados desses ensaios de ligação *in vitro* permitem concluir que a proteína de 66 kDa, forte candidata a ser um receptor, liga-se ao PrPc de maneira específica.

Figura 15: Ensaio de ligação usando a proteína de fusão GST-PrPc imobilizada na membrana de nitrocelulose. Cinco microgramas das proteínas expressas em sistema heterólogo GST (canaletas 1 e 3) ou PrPc-GST (canaletas 2, 4-8) foram submetidas a um SDS-PAGE 10% e, após transferência, foram coradas com Ponceau S (canaletas 1 e 2) ou reagidas com o soro anti-PrPc (canaletas 3 e 4), com soro de camundongo não imune (canaleta 5) ou com o soro anti-peptídeo complementar (canaleta 6). As canaletas 7 e 8 foram incubadas respectivamente com extrato de membrana ou extrato total de cérebro de camundongo e depois reveladas com o soro anti-peptídeo complementar.

Com a finalidade de demonstrar que a interação PrPc/receptor também ocorria quando ambas as moléculas apresentavam-se na sua forma nativa (sem serem recombinantes e sem estarem desnaturadas e reduzidas, após serem submetidas ao SDS-PAGE), realizou-se os ensaios de citometria de fluxo com células de neuroblastoma (N2a). Assim, quando essas células foram incubadas com anticorpos anti-PrPc, uma positividade intensa (cerca de 94% das células) foi obtida (fig. 16B). Contudo, essa positividade pôde ser inibida (de 94% para 57%) quando as células foram pré-incubadas com a fração de membrana purificada a partir de cérebros de camundongos, indicando que algum componente desse extrato estava se ligando ao PrPc e impedindo o seu reconhecimento pelo anticorpo anti-PrPc (fig. 16C). Quando esse último experimento foi feito tratando-se as células com extrato de membrana previamente incubado com o soro

anti-peptídeo complementar, a inibição do reconhecimento do PrPc pelo anti-PrPc foi revertida (fig. 16D) e a intensidade de fluorescência voltou aos valores da fig. 16B (cerca de 92% das células). Esse resultado sugere que o receptor de 66 kDa, presente na fração de membrana, única proteína reconhecida pelo soro anti-peptídeo complementar, liga-se ao PrPc nativo das células N2a, sustentando os dados anteriores, obtidos com PrPc recombinante.

Figura 16: Análise de citometria de fluxo em células N2a indicando a ligação de PrPc e o seu provável receptor em condições nativas. As células foram incubadas com soro de coelho não imune (A); com anticorpo anti-PrPc (B); com a fração de membrana purificada de cérebro de camundongo, seguido da adição de anti-PrPc (C); ou com a fração de membrana previamente tratada com soro anti-peptídeo complementar, seguido de anti-PrPc (D).

4.3 QUANTO À INTERAÇÃO PrPc/LAMININA

Como já comentado na parte introdutória desse trabalho, alguns dados reportados na literatura e mesmo alguns resultados preliminares realizados no nosso laboratório sugeriram a possibilidade de que o PrPc poderia se ligar a uma das principais moléculas da matriz extracelular, a laminina. Assim, com a finalidade de demonstrar tal interação, realizou-se inicialmente o ensaio de "LN overlay" (CHAMMAS e cols., 1991) sobre as proteínas recombinantes, GST-PrPc (canaleta 1, fig. 17) e GST (canaleta 5, fig. 17), separadas eletroforéticamente. Quando a LN foi incubada com a membrana de nitrocelulose contendo GST-PrPc, o soro anti-LN foi capaz de reconhecer uma banda de 46 kDa, correspondente à proteína de fusão (canaleta 3). Esse resultado indica uma interação específica entre PrPc e a laminina, já que esse mesmo soro não reconhece GST-PrPc em "Western blot" (canaleta 4) e GST sozinha não é capaz de se ligar à LN nas mesmas condições (canaleta 6).

Figura 17: "LN overlay". Membranas de nitrocelulose contendo 2 μ g de GST-PrPc (canaletas 1-4) ou de GST (5-7) resolvidos eletroforéticamente foram coradas com Ponceau S (canaletas 1 e 5), incubadas com anticorpo anti-PrPc (canaleta 2), incubadas com anticorpo anti-laminina (canaletas 4 e 7), ou incubadas com laminina-1 (10 μ g/ml) e posteriormente com anti-LN (canaletas 3 e 6).

Utilizamos também a proteína recombinante GST-PrPc disponível em nosso laboratório para a construção de curvas de ligação entre PrPc e laminina. Entretanto, como já comentado, esse sistema de expressão apresentou certas dificuldades. Apesar de produzir grandes quantidades da proteína de fusão, somente uma pequena parte podia ser eluída da glutathiona-Sepharose através do método convencional de eluição com glutathiona reduzida livre. Métodos de eluição alternativos foram testados, contudo nenhum deles se mostrou completamente satisfatório. Optamos, então, por fazer as curvas de ligação entre PrPc e laminina, utilizando a proteína recombinante imobilizada na glutathiona-Sepharose, contornando, assim, o problema de rendimento da eluição. Como descrito no item “Materiais e Métodos”, uma quantidade fixa de GST-PrPc associada à glutathiona-Sepharose foi incubada com concentrações crescentes de laminina marcada com ^{125}I . Após lavagem, a radioatividade incorporada à resina foi medida e, sabendo-se da atividade específica da proteína marcada, pode-se calcular a quantidade e a concentração de laminina que se ligou à GST-PrPc-Sepharose. Com esses dados construiu-se uma curva (laminina ligada x laminina adicionada) de ligação total (fig. 18A): ligações em GST, em PrPc e na própria glutathiona-Sepharose. Paralelamente, foi realizado o mesmo procedimento, com as mesmas concentrações de ^{125}I -LN, porém para uma mesma quantidade de apenas GST acoplada à glutathiona-Sepharose. Com isso foi possível obter uma curva de ligação inespecífica: ligações da laminina ao GST e à glutathiona-Sepharose. Subtraindo-se os valores dessa última curva dos da curva total, verificou-se um gráfico específico somente para a ligação entre a laminina e o PrPc. Essas três curvas são apresentadas na figura 18A.

No inserto dessa mesma figura está representado o gráfico de Scatchard (SCATCHARD, 1949), feito a partir da curva de saturação específica. Nesse gráfico, os valores da relação laminina ligada/laminina livre (B/F) são plotados na ordenada e os valores de laminina ligada no eixo das abscissas. Pela união dos pontos, obtém-se uma reta e a partir do inverso do seu coeficiente angular, pôde-se determinar a constante K_d para a interação entre a laminina e o PrP (aproximadamente $2 \times 10^{-8} \text{ M}$).

Figura 18: A) Curvas de ligação entre laminina e GST-PrPc (total), GST (não específica) e PrPc (específica). A curva específica foi obtida a partir da subtração dos valores da curva não-específica dos da curva total. O gráfico de Scatchard obtido a partir dos valores da curva específica encontra-se no inserto. Através do inverso do coeficiente angular desta reta, obteve-se o K_d de 2×10^{-8} M para a ligação da laminina ao PrPc.

B) Autoradiograma indicando a ligação de laminina marcada a GST-PrPc (linhas 1 e 2) e a GST (linhas 3 e 4). Seis (linhas 1 e 3) e oito (linhas 2 e 4) microgramas de laminina foram incubados com GST-PrPc ou GST imobilizados na glutationa-Sepharose. Após as lavagens, adicionou-se as resinas tampão de amostra redutor e, então, elas foram submetidas a um SDS-PAGE 6%. O gel foi seco e a ele foi exposto um filme de raio X. Com peso molecular de 440 kDa pode-se visualizar a banda correspondente à cadeia $\alpha 1$ da laminina. A banda de 220 kDa corresponde às cadeias $\beta 1$ e $\gamma 1$.

Com o objetivo de visualizar essa associação entre PrPc e laminina, resinas contendo GST ou GST-PrPc incubadas com duas concentrações de ^{125}I -LN foram submetidas a uma eletroforese de poliacrilamida-SDS 6%. Após a corrida, o gel foi seco e a ele foi exposto um filme de raio X (Kodak). No autoradiograma da figura 18B pode-se ver que as bandas correspondentes às cadeias da laminina marcada encontram-se com intensidade bem maior nos ensaios de ligação ao GST-PrPc imobilizado na Sepharose (canaletas 1 e 2), quando comparadas aos respectivos pontos feitos com GST acoplado à glutathiona-Sepharose (canaletas 3 e 4). Esse resultado confirma os valores obtidos na figura 18A, indicando que a ligação da laminina ao GST-PrPc é superior a de GST.

Na tentativa de mapear a região específica da laminina responsável por se ligar ao PrPc, foi examinado, através de ensaios de competição, o efeito inibitório de três peptídeos correspondentes a regiões conhecidas e de funções estabelecidas da laminina: IKVAV, YIGSR e RNIAEIIKDI. É importante mencionar que a escolha desses peptídeos foi feita com base em alguns resultados obtidos por outros estudantes do nosso grupo, os quais apresentam-se publicados (GRANER e cols., 2000 - em anexo). Esses resultados foram capazes de demonstrar que a ligação específica entre o PrPc e a laminina promovia o crescimento de neuritos tanto na linhagem celular PC-12 (um feocromocitoma), como em células de hipocampo de ratos e camundongos em cultura primária. Assim, os peptídeos selecionados IKVAV e RNIAEIIKDI já haviam sido descritos na literatura como sítios da laminina indutores do processo de neuritogênese (TASHIRO e cols., 1989; LIESE e cols., 1989). Já a sequência YIGSR estava envolvida no mecanismo de adesão e não era capaz de promover o crescimento de neuritos (TASHIRO e cols., 1989). Esse último peptídeo foi então usado como controle negativo nos ensaios de competição. Para esses ensaios, o peptídeo RNIAEIIKDI foi usado nas concentrações de $5,4 \times 10^{-5}$ M a $5,4 \times 10^{-4}$ M (4.000 a 40.000 vezes mais que a LN, em número de moles) e os peptídeos IKVAV e YIGSR foram adicionados nas concentrações de $10,8 \times 10^{-5}$ a $10,8 \times 10^{-4}$ M (8.000 a 80.000 vezes mais que a LN). A utilização de grandes quantidades de peptídeos para a observação da inibição de interações moleculares já havia sido demonstrada (PIERSCHBACHER e ROUSLAHTI, 1984). Como indicado na figura 19, dos peptídeos

testados, o único que foi capaz de inibir a ligação PrPc/LN foi RNIAEIIKDI. A porcentagem de ligação diminuiu para 26% quando essa sequência é adicionada na concentração de $5,4 \times 10^{-5}$ M ($30 \mu\text{g}$) e quando o coloca-se o dobro da quantidade desse peptídeo (dado não indicado no gráfico da fig. 19), a interação em questão é completamente inibida, indicando que esse é o sítio de ligação da LN ao PrPc. Deve-se notar que nem a adição de $10,8 \times 10^{-4}$ M ($300 \mu\text{g}$) dos peptídeos YIGSR e IKVAV foi capaz de bloquear a ligação PrPc/laminina.

Figura 19: Inibição da ligação da laminina ao PrPc com peptídeos sintéticos específicos. Os peptídeos YIGSR, IKVAV ($300 \mu\text{g}$) ou RNIAEIIKDI ($30 \mu\text{g}$), correspondentes a domínios já bem estabelecidos da laminina, foram pré-incubados com $0,2 \mu\text{g}$ de GST-PrPc ou somente GST imobilizados em glutathiona-Sephrose. Em seguida, $6 \mu\text{g}$ de laminina marcada foram adicionados. A porcentagem de ligação específica entre PrPc e laminina foi calculada em relação ao tubo controle, no qual não foi adicionado peptídeo (100%). Os valores indicados no gráfico representam a média obtida em 3 experimentos diferentes. * indica que esse valor é significativamente diferente do controle (teste de T-Student para amostras pareadas, $p < 0,05$).

Dispondo-se posteriormente da proteína recombinante His₆-PrPc solúvel foi possível padronizar um ensaio de ligação com a laminina em placas de poliestireno (utilizadas em ensaios de ELISA). Assim, os poços dessa placa foram sensibilizados com $0,1 \mu\text{g}$ de laminina e concentrações crescentes de His₆-PrPc marcado com ^{125}I foram adicionadas. Após lavagem extensiva, a radioatividade incorporada em cada poço foi medida e, sabendo-se da atividade específica da proteína marcada, pôde-se calcular a

quantidade e a concentração de His₆-PrPc que se ligou à laminina. Com esses valores construiu-se uma curva (His₆-PrPc ligado X His₆-PrPc adicionado) de ligação total. Paralelamente, foi construída uma curva de ligação inespecífica, na qual uma quantidade três vezes maior da proteína recombinante não marcada foi adicionada aos vários poços sensibilizados com laminina, juntamente com ¹²⁵I His₆-PrPc. Subtraindo-se os valores totais dos valores inespecíficos correspondentes, obteve-se a curva de ligação específica entre a laminina e o His₆-PrPc. Esses gráficos estão apresentados na figura 20A.

Graner e cols. (2000).

A partir da curva de saturação específica construiu-se o gráfico de Scatchard (figura 20B). O valor do K_d encontrado para a interação em questão foi de $5,8 \times 10^{-8}$ M, valor este muito semelhante ao obtido para a ligação PrPc/laminina quando utilizou-se o recombinante GST-PrPc (K_d= 2×10^{-8} M). Portanto, os dois tipos de PrPc recombinante ligam-se à laminina da mesma forma.

Na tentativa de confirmar a especificidade da interação entre PrPc e laminina, realizamos outro tipo de ensaio de ligação, no qual o recombinante His₆-PrPc marcado com ¹²⁵I foi incubado com uma membrana de nitrocelulose contendo, além da laminina-1, outras proteínas adsorvidas: fibronectina, colágeno tipo I e BSA. O autorradiograma da figura 21A evidencia que o PrPc apresenta uma maior ligação com a laminina. Os valores obtidos após a densitometria dos sinais no autorradiograma, corrigidos pelo número de moles de cada proteína (fig. 21B) mostram que a ligação do His₆-PrPc à laminina é cerca de dez vezes maior que a ligação desse mesmo recombinante à fibronectina, uma outra glicoproteína da matriz extracelular, também envolvida na indução do crescimento de neuritos e na adesão neuronal (LIESE, 1990). Não detectou-se ligação entre o PrPc e o colágeno do tipo I ou o BSA (fig. 21 A e B).

A)

B)

Figura 20: A) Curvas de ligação entre $^{125}\text{I His}_6\text{-PrPc}$ e laminina. Curva total: construída com os valores obtidos na ligação entre crescentes concentrações de $\text{His}_6\text{-PrPc}$ marcado e a laminina. Curva inespecífica: determinada com a adição, nos vários pontos do ensaio de ligação, de uma quantidade três vezes maior da proteína recombinante não marcada em relação a mesma iodinação. A curva específica foi obtida através da subtração dos valores totais dos respectivos valores inespecíficos.

B) Gráfico de Scatchard obtido a partir dos valores da curva específica. Através do inverso do coeficiente angular da reta pôde-se calcular o K_d de $5,8 \times 10^{-8}\text{ M}$ para a interação $\text{His}_6\text{-PrPc/laminina}$.

Figura 21: A) Autorradiograma resultante da incubação de ^{125}I His₆-PrPc com uma membrana de nitrocelulose contendo as seguintes proteínas adsorvidas em duplicata: laminina-1 (LN), fibronectina (FN), colágeno tipo I (COL-I) e BSA. Pode-se visualizar que a maior ligação ocorreu entre o recombinante e a laminina. B) Os sinais (pontos) obtidos no autorradiograma foram quantificados por densitometria e normalizados pelo número de moles de cada proteína imobilizada (valores relativos).

Evidências recentes sugeriam um envolvimento de PrPc nos mecanismos de memória e aprendizado. NISHIDA e cols., 1997, mostraram que camundongos "knockout" para o gene codificador de PrPc apresentavam déficit nos processos de memória e aprendizado quando submetidos a certos testes comportamentais. Com essa informação e também sabendo que PrPc e LN encontram-se em grandes quantidades no hipocampo (TARABOULOS e cols., 1992; CHEN e STRICKLAND, 1997; HAGG e cols., 1997), resolvemos investigar se a interação verificada entre PrPc e LN estava

envolvida nos mecanismos de memória. Assim, em colaboração com o grupo do Prof. Dr Ivan Izquierdo (UFRG), verificamos o efeito do bloqueio de PrPc e laminina através de infusões intrahipocampais em ratos dos anticorpos anti-PrPc, anti-LN e também do peptídeo RNIAEIIKDI, usando o teste de esquiva inibitória (detalhado em "Materiais e Métodos"). A figura 22 mostra que os ratos que foram infundidos bilateralmente com anti-PrPc ou anti-LN na área CA1 do hipocampo, imediatamente após o treino, e testados depois de 24 horas, apresentaram uma inibição significativa do tempo de latência na plataforma (apesar do choque, desciam rapidamente para a grade), quando comparados aos animais do grupo controle (aqueles que só receberam salina ou aqueles que receberam IgG purificada de soro pré-imune).

A infusão do peptídeo RNIAEIIKDI (o sítio ligante de PrPc na laminina) na mesma área do cérebro não provocou nenhum efeito no tempo de latência dos ratos na plataforma (figura 23). Contudo, quando esse mesmo peptídeo foi co-infundido com anti-PrPc, o efeito amnésico promovido por esse anticorpo pôde ser revertido (figura 23). É importante notar que um outro peptídeo com os mesmos resíduos que RNIAEIIKDI, porém em outra ordem ("Scrambled") não foi capaz de causar o mesmo efeito. Sem dúvida, esses resultados indicam que a interação verificada *in vitro* entre PrPc e o sítio específico da LN apresenta uma relevância biológica, participando dos processos de aprendizado e memória e também do mecanismo de neuritogênese (esse último foi reportado por GRANER e cols., 2000).

Figura 22: Efeitos de infusões intrahipocampais bilaterais de IgG purificada de soro pré-imune, de IgG anti-PrPc e IgG anti-LN na retenção de ratos na plataforma, submetidos ao teste de esquiva inibitória. Os valores representam a mediana no tempo de latência dos animais na plataforma. * Significativamente diferente do grupo que recebeu IgG purificada de soro pré-imune (Teste de Mann-Whitney U, $p<0,05$). As barras indicam o mínimo e o máximo dos tempos de latência para cada grupo de animais.

Figura 23: Efeito de infusões intrahipocampais bilaterais de IgG anti-PrPc, do peptídeo derivado da cadeia $\gamma 1$ da LN (RNIAEIIKDI) ($0,04\mu\text{g/lado}$) sozinho ou co-infundido com IgG anti-PrPc ($0,90\mu\text{g/lado}$) e de um peptídeo com os mesmos resíduos que este último, porém arranjados em outra ordem ("Scrambled $\gamma 1$ " - S $\gamma 1$) sozinho ($0,04\mu\text{g/lado}$), ou co-injetado com IgG anti-PrPc ($0,90\mu\text{g/lado}$). Os valores representam a mediana no tempo de latência na plataforma de ratos submetidos ao teste de esquiva inibitória * Significativamente diferente do grupo que recebeu IgG purificada de soro pré-imune (Teste de Mann-Whitney U, $p<0,05$). As barras indicam o mínimo e o máximo dos tempos de latência para cada grupo de animais.

5. DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO DE PrPc EM SISTEMA HETERÓLOGO

Para a melhor caracterização das interações que estávamos investigando no laboratório (entre PrPc e o receptor de 60-66 kDa e entre PrPc e a laminina), houve a necessidade de se obter a proteína PrPc purificada. Os métodos de purificação de PrPc a partir de vários organismos eram métodos que se utilizavam de diversos passos, e que, por isso eram muito demorados, além de proporcionarem um baixo rendimento. Assim, por exemplo, partindo de 100 cérebros de hamster era possível purificar apenas alguns microgramas de PrPc (PAN e cols., 1993), após trabalhosas técnicas baseadas em cromatografias de afinidade e troca iônica. PrPc isolados de neuroblastomas celulares (células N2a), linhagens de glioma e fibroblastos eram também obtidos em pequenas quantidades (ROGERS e cols., 1992). Em 1995, WEISS e cols. apresentaram um protocolo de expressão e purificação de PrPc de hamster em sistema heterólogo, através do sistema GST. Além de ser disponível comercialmente, o sistema de expressão e purificação baseado na proteína de fusão GST funciona em condições não desnaturantes, permitindo a produção de proteínas solúveis, com a manutenção de sua conformação original e de sua atividade. Dessa forma, decidimos produzir PrPc recombinante através dessa metodologia. Optamos por expressar essa proteína em bactéria (*E.coli*), já que esse sistema apresenta facilidades quanto à manipulação, além de ser mais barato. Alguns trabalhos anteriores também indicavam que a glicosilação do PrPc não parecia ser uma modificação importante para a sua conversão a PrPsc (TARABOULOS e cols., 1990; KOCISKO e cols., 1994). Artigos mais recentes sugerem que uma baixa taxa de glicosilação aliada a um ambiente redutor facilitam essa conversão (MA e LINDQUIST, 1999). Como o papel funcional de PrPc é desconhecido, ainda não é possível saber se a glicosilação dessa proteína é importante para a sua função fisiológica.

Os resultados das figuras 5-8 apresentados no presente trabalho mostram que as etapas de clonagem do fragmento de DNA correspondente aos resíduos 23-238 de PrPc

de camundongo no vetor pGEX-4T-3 (Pharmacia), de expressão da proteína GST-PrPc em *E.coli* e de purificação desse recombinante através da cromatografia em glutathiona-Sepharose foram todas bem sucedidas. A digestão da proteína de fusão com proteinase K (fig.9) sugeriu que a forma normal de PrP estava sendo produzida. Contudo, a remoção de GST-PrPc da glutathiona-Sepharose através do método convencional de eluição com glutathiona reduzida livre não foi satisfatório (fig.10A): apenas 1% da proteína de fusão foi recuperado no sobrenadante. A clivagem com trombina de GST-PrPc imobilizada na Sepharose (fig. 10B) confirmou a dificuldade de se remover o PrPc da resina, já que, mesmo após a digestão, GST e PrPc separados permaneceram na Sepharose. Esses resultados indicam que o PrPc deve se ligar de alguma forma a essa resina (através de interações hidrofóbicas) ou então ele deve formar agregados insolúveis que sedimentam junto com a Sepharose.

As dificuldades encontradas na eluição de GST-PrPc da glutathiona-Sepharose nos levaram a desenvolver certos ensaios nos quais foi possível utilizar esse recombinante imobilizado à resina. Como foi visto em "Resultados" e será discutido mais adiante, várias informações significativas foram obtidas quanto às caracterizações das interações PrPc/receptor e PrPc/laminina com o uso de GST-PrPc nessas condições.

Entretanto, na tentativa de se conseguir maiores quantidades de PrPc solúveis, indispensáveis em alguns ensaios, tivemos a necessidade de expressar e purificar PrPc em *E.coli* através de outro sistema. Pesquisas na literatura nos levaram a optar pelo sistema baseado na cauda de histidinas.

Assim, subclonamos o fragmento de DNA correspondente aos resíduos 23-238 de PrPc murino no vetor pTrcHis-A (Invitrogen), disponível em nosso laboratório (fig.11). Como apresentado nos resultados das figuras 12 e 13, a expressão e a purificação de His₆-PrPc foram bem sucedidas. O protocolo de purificação desenvolvido por ZAHN e cols. (1997) (detalhado no item "Materiais e Métodos"), permite a total solubilização da proteína recombinante, localizada nos corpos de inclusão das bactérias, através do uso de 6M de cloreto de guanidina. O extrato de bactérias lisado em condições desnaturantes e redutoras (há também a adição de 10mM de glutathiona reduzida) é incubado com a resina de níquel, a qual possui alta afinidade pela cauda de seis resíduos consecutivos de histidina, presente na porção N-terminal do PrPc recombinante. As proteínas que não

possuem essa cauda são removidas após extensiva lavagem da resina com o tampão desnaturante que contém cloreto de guanidina e também glutathione reduzida. Essa última é importante na prevenção da formação de pontes dissulfetos intermoleculares.

A renaturação e a oxidação da proteína recombinante são as etapas críticas para a obtenção de altos rendimentos de PrPc na conformação correta. A renaturação através da simples diluição dos agentes desnaturante e redutor normalmente provoca a formação de agregados protéicos e de pontes S-S intermoleculares. Assim, os autores que desenvolveram o protocolo em questão optaram por realizar o passo de renaturação com o His₆-PrPc imobilizado na resina, através de um gradiente de 100-0% de cloreto de guanidina/glutathione. Essa estratégia impede a agregação das proteínas e favorece a formação de pontes dissulfeto intramoleculares. As proteínas contaminantes, que possuem baixa afinidade pela resina de níquel, são removidas nas lavagens com solução contendo 50mM de imidazol e o His₆-PrPc monomérico pode ser então eluído com uma concentração maior de imidazol (500mM).

Utilizando esse protocolo, conseguimos obter no máximo 250µg de His₆-PrPc solúveis por litro de cultura bacteriana, um rendimento bem inferior ao obtido por ZAHN e cols. (10-20mg/litro de cultura). Monitorando as várias etapas da purificação, detectamos que grandes quantidades da proteína recombinante ligavam-se à resina, entretanto só uma pequena parte era eluída, exatamente como ocorria com o GST-PrPc. Vários trabalhos na literatura sobre expressão de PrPc recombinante em bactérias comentam sobre as dificuldades obtidas durante a purificação de grandes quantidades dessa proteína, dificuldades essas geralmente relacionadas com a insolubilidade do PrPc, a formação de agregados ou com a sensibilidade a proteases e instabilidade dessa proteína (VÖLKEL e col., 1998; MARCOTTE e EISENBERG, 1999). Realmente, a etapa de renaturação deve ser muito importante para conseguir os rendimentos reportados. ZAHN e cols. (1997) comentam em seu artigo que o PrPc oligomérico ou não renaturado permanecem ligados à resina. Provavelmente, o gradiente para a renaturação não tenha sido eficaz durante as nossas purificações e, dessa forma, pouco His₆-PrPc foi renaturado e, portanto, eluído da resina.

Contudo, através do protocolo acima comentado, conseguimos obter quantidades suficientes da proteína recombinante solúvel para a realização de alguns ensaios de ligação

com a laminina, os quais serão discutidos mais adiante. Algumas modificações metodológicas estão sendo introduzidas com a finalidade de melhorar o nosso rendimento, para que maiores quantidades de PrPc recombinante possam ser geradas.

Sem dúvida, a produção de PrPc em sistema heterólogo vem sendo de grande importância no nosso laboratório. Essa proteína apresenta-se como ferramenta fundamental em vários experimentos e também vem sendo usada na imunização de coelhos e camundongos para a produção de anticorpos policlonais e também monoclonais anti-PrPc.

5.2 EVIDÊNCIAS DA INTERAÇÃO ENTRE O PrPc E O SEU RECEPTOR DE 60-66 kDa

Os ensaios de “overlay” realizados com PrPc recombinante (fig.14 e fig.15) sugerem fortemente que, ao menos *in vitro*, PrPc e seu provável receptor interagem entre si e também confirmam, de uma maneira mais elegante, os resultados obtidos nos ensaios de ligação feitos com extratos enriquecidos nessas moléculas (MARTINS e cols., 1997; GRANER, Tese de Doutorado, 1996). O mais interessante é que só a forma presente na membrana celular é capaz de fazer essa ligação. Isso está bem claro nas figuras 14B (canaleta 3) e 15 (canaleta 7). O fato de nenhuma ligação ter sido detectada quando extrato total foi incubado com GST-PrPc (fig.15, canaleta 8) pode ser explicado por uma diluição da forma de 66 kDa nesse extrato em comparação ao extrato de membrana, ou talvez por uma menor afinidade da forma citoplasmática de 60 kDa (a mais abundante no extrato total) por PrPc. De fato, resultados apresentados em MARTINS e cols. (1997) indicam que apenas 6% da forma de membrana do receptor está presente no extrato total de cérebro de camundongo.

Na canaleta 3 da figura 14B nota-se o aparecimento de outras bandas, além da de 66 kDa, indicando que GST-PrPc possa estar se ligando a outras proteínas, o que não é surpresa, visto que vários ligantes para prion já foram descritos na literatura (OESCH e cols., 1990). O fato desses mesmos ligantes não serem observados quando GST-PrPc marcado com ¹²⁵I foi incubado com o extrato total de cérebro de camundongo (fig.14A,

canaleta 3) pode ser explicado pela diluição dessas proteínas nesse extrato em relação à fração de membrana.

Com a finalidade de demonstrar que a proteína de 66 kDa na sua forma nativa (não desnaturada e não reduzida) era capaz de se ligar ao PrPc nativo (não recombinante e não desnaturado ou reduzido) presente na superfície das células, foram realizados ensaios de citometria de fluxo com células de neuroblastoma (N2a) em cultura. A figura 16 evidencia que o provável receptor de 66 kDa, presente na fração de membrana purificada de cérebros de camundongos, liga-se ao PrPc localizado na superfície celular da linhagem celular analisada, já que esse extrato foi capaz de inibir o reconhecimento do anticorpo anti-PrPc na superfície das células (fig.16C) e essa inibição pôde ser revertida quando a fração de membrana foi tratada com o soro anti-peptídeo complementar antes de ser incubada com as células (fig.16D). Esses dados reforçam os resultados de ligação *in vitro* realizados com GST-PrPc, validando o uso desse recombinante como ferramenta para estudar melhor as interações que o PrPc pode realizar com o receptor de 60-66 kDa, e também com outras moléculas.

Apesar de ter sido verificada uma ligação *in vitro* entre PrPc e a proteína receptora que caracterizamos, foi necessário estudar se essa interação seria capaz de gerar algum efeito biológico *in vivo*. Como a função do PrPc ainda não é conhecida, nosso grupo decidiu explorar o efeito neurotóxico do peptídeo 106-126 do PrPc humano em cultura primária de neurônio. Como já mencionado, nossa teoria defende que o poder neurotóxico desse peptídeo é dado por nele estar contido o sítio de ligação a um provável receptor, o qual seria responsável por sua internalização e consequente manifestação da neurotoxicidade. Assim, seria razoável supor que tanto o peptídeo deduzido (peptídeo complementar), que pela teoria da hidropaticidade complementar deve mimetizar o sítio de ligação do receptor ao PrPc, quanto o soro produzido contra esse mesmo peptídeo deveriam impedir a interação entre o receptor e o PrPc e, portanto, inibir o efeito neurotóxico do peptídeo 106-126. Alguns resultados realizados pelo nosso grupo e que já foram publicados (MARTINS e cols., 1997) mostraram que esses reagentes diminuem significativamente a morte de neurônios em cultura tratados com o peptídeo neurotóxico de PrPc106-126. Sem dúvida, esses resultados favorecem ainda mais a idéia de que a

proteína de 66 kDa reconhecida pelo soro anti-peptídeo complementar é realmente um receptor para prions.

Mais recentemente, foi publicado um artigo na literatura no qual PrPc truncados foram expressos em animais “knockout” para o gene que codifica PrPc. Esses animais desenvolveram severa ataxia e degeneração da camada de células de Purkinje do cerebelo. Os resultados obtidos fortalecem a idéia de que a região onde está contida a sequência peptídica 106-126 do PrPc é importante não só para os processos infecciosos, mas também para a manutenção do fenótipo normal dos camundongos (SHMERLING, 1998).

Outros estudos serão necessários para estabelecer as consequências fisiológicas da ligação do PrPc ao seu provável receptor. SHYNG e cols. (1994) verificaram que a endocitose de PrPc de galinha nas células N2a ocorre via vesículas de clatrina. Para que isso aconteça, os autores sugerem a existência de um receptor transmembrânico que possua um domínio citoplasmático capaz de recrutar toda a maquinaria de formação desse tipo de vesícula, isto porque o PrPc é preso na membrana por uma âncora de GPI que provavelmente não pode induzir esse tipo de sinal. Um possível papel para a proteína que caracterizamos é exatamente o de promover a internalização do PrPc ou do PrPsc por vesículas de clatrina, permitindo que esse último provoque modificações conformacionais no primeiro, formando acúmulo de agregados insolúveis que levarão à morte celular. Por outro lado, esse receptor também deve estar envolvido nos processos fisiológicos normais da endocitose de PrPc.

Contudo, um artigo mais recente (VEY e cols., 1996) demonstrou a co-localização do PrPc e do PrPsc em domínios do tipo cavéolas (CLD-“caveolae-like domains”), sugerindo que a conversão da isoforma normal na isoforma infecciosa ocorra nesses locais e demonstrando que o PrPc, assim como a maioria das proteínas possuidoras de GPI, é internalizado por cavéolas (KANEKO, 1997a) e não por vesículas de clatrina como proposto por SHYNG e cols. (1995b). Entretanto, parece que uma mesma proteína ancorada na membrana por GPI pode ser endocitada por essas duas vias distintas. Acredita-se que quando essas proteínas agrupam-se em uma determinada porção da membrana o processo de endocitose por cavéolas é induzido, ao passo que quando essas mesmas proteínas apresentam-se isoladas em outros domínios da superfície

celular elas podem se ligar a um receptor que promova a endocitose por vesículas de clatrina (ANDERSON, 1993). Assim, ainda podemos pensar que o receptor que caracterizamos é necessário para a internalização de PrPc.

Já está bem estabelecido que as cavéolas participam na transdução de sinais celulares (SHAUL e ANDERSON, 1998). Várias moléculas envolvidas nas sinalizações mediadas pela proteína-G e por cálcio concentram-se nessas regiões. Há evidências também de que a clivagem da própria âncora de GPI (que constitui grande parte das proteínas encontradas nas cavéolas), gera IPG (inositol fosfoglicana), que é capaz de induzir respostas celulares semelhantes a de certos ligantes extracelulares (JONES e VARELA-NIETO, 1997). A localização específica de algumas moléculas nesses microdomínios indica que as cavéolas compartimentalizam determinados sinais celulares. Assim, seria interessante verificar a presença do receptor de 60-66 kDa nessas regiões, já que ele seria co-localizado com o PrPc, indicando a participação da interação dessas duas proteínas na transdução de algum sinal.

Já se tem evidências de que proteínas GPI ancoradas são capazes de transduzir sinais ao citoplasma que resultem na fosforilação de tirosina (LISANTI e cols., 1994). Esse evento de transdução parece ser consequência de uma associação física entre proteínas ancoradas por GPI e quinases do tipo Src. Mas como essas proteínas poderiam interagir entre si se a primeira é voltada para o meio extracelular e a segunda para a face citoplasmática? Foi sugerido a existência de uma molécula adaptadora transmembrânica capaz de fazer a ligação dessas duas proteínas. Como a caveolina, uma proteína presente em grande quantidade nas cavéolas, apresenta-se associada a proteínas-GPI e a quinases do tipo Src, possui um domínio transmembrânico e promove fosforilação *in vivo* e *in vitro*, foi proposto que a caveolina seja esse potencial adaptador que realiza a interação entre proteínas-GPI e a maquinaria citoplasmática (LISANTI e cols., 1994). Com base nessas informações, poderia-se especular que o provável receptor que caracterizamos funcionaria como uma molécula adaptadora nas cavéolas. Ele poderia intermediar a ligação entre o PrPc e uma outra proteína capaz de transduzir algum sinal celular.

Além disso, também é possível que o receptor de 60-66 kDa esteja envolvido nos processos patogênicos das doenças causadas por prion. Ele poderia participar na conversão entre PrPc e PrPsc, que ocorreria durante a internalização dessas duas

isoformas. Pode ser também que defeitos na expressão desse receptor promovam respostas aberrantes mediadas pela sua ligação ao PrPc, causando as disfunções observadas nas doenças de prion.

Sem dúvida, uma melhor caracterização da proteína de 60-66 kDa será de grande utilidade não só para se entender um pouco mais sobre a propagação dos prions e suas doenças, mas também para nos ajudar a esclarecer sobre a desconhecida função biológica do PrPc nas células normais. É importante mencionar que a clonagem desse provável receptor está sendo abordada pelo nosso grupo.

5.3 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO PrPc/LAMININA

A partir de evidências na literatura que sugeriam a participação dos componentes da matriz extracelular no processo de formação de placas amilóides e de resultados obtidos em nosso laboratório que indicavam uma possível interação entre PrPc e laminina, decidiu-se avaliar a existência de uma ligação específica entre essas duas proteínas.

O ensaio de ligação ("LN overlay") apresentado na figura 17 indicou que a LN era capaz de se ligar especificamente a parte PrPc da proteína recombinante GST-PrPc. Esse resultado foi confirmado através da realização de curvas de ligação entre LN e PrPc. A figura 18A mostra o gráfico obtido para a ligação PrPc/laminina. A curva obtida apresenta um padrão característico de ligação específica entre duas moléculas: a medida que a quantidade de laminina adicionada aumenta, a sua ligação ao PrPc também cresce até atingir um patamar, indicando a saturação. O Kd obtido para a ligação da laminina ao PrPc foi da ordem de 2×10^{-8} M. A utilização de um outro tipo de recombinante nesses ensaios, o His₆-PrPc, forneceu um Kd muito semelhante, $5,8 \times 10^{-8}$ M (fig.20), confirmando ser essa mesma a ordem de grandeza dessa constante. É importante comentar, que a produção de quantidades significativas de PrPc solúveis (através do recombinante His₆-PrPc) facilitou enormemente a realização dos ensaios de ligação com a laminina. O valor da constante observado para a ligação em questão está de acordo com aqueles obtidos para ligação da laminina à proteína precursora de amilóide (APP). Em

seu trabalho, NARINDRASORASAK e cols. (1992) verificaram a existência de dois sítios de ligação para a laminina, em APP: um de maior ($K_d=1 \times 10^{-10}$ M) e outro de menor afinidade ($K_d=1 \times 10^{-8}$ M). Assim, o valor de K_d obtido para ligação entre laminina e PrPc é semelhante àquele observado para o sítio de APP de menor afinidade à laminina. Só para efeito de comparação, é interessante mencionar o K_d verificado para a interação integrina/LN é da ordem de 10^{-6} - 10^{-7} M (BUCK e HORWITZ, 1987).

No autoradiograma da figura 18B foi possível comprovar que os valores obtidos nas curvas total e inespecífica eram realmente devido às ligações de laminina a GST-PrPc e a GST e não artefatos. Como indicado nas canaletas 3 e 4, apenas uma pequena quantidade de laminina é capaz de se ligar à GST sozinha, ao passo que nas canaletas 1 e 2 pode-se visualizar uma quantidade bem maior de laminina ligada à proteína de fusão, indicando que a maior parte dessa interação deve-se à parte PrPc da proteína recombinante.

O resultado obtido na figura 21 confirma a especificidade da ligação entre o PrPc e a laminina: a maior ligação verificada nesse ensaio ocorreu entre o recombinante His₆-PrPc e laminina-1. Uma interação dez vezes menor pôde ser detectada entre esse mesmo recombinante e a fibronectina e praticamente nenhuma ligação foi obtida quando colágeno tipo I ou BSA foram adsorvidos na membrana de nitrocelulose.

Os resultados até então apresentados evidenciam, sem dúvida, que há uma interação específica entre PrPc e laminina. Mas qual seria o significado fisiológico dessa interação?

Sabe-se que a laminina está envolvida em diversas atividades biológicas, dentre as quais pode-se citar adesão, migração e espalhamento celulares (KLEINMAN, 1987), mas também deve-se destacar a participação dessa proteína em processos relacionados ao sistema nervoso central, como no crescimento de neuritos, no direcionamento do cone de crescimento e na formação de sinapses (VENSTRON e REICHARDT, 1993; LUCKENBILL-EDDS, 1997). Um artigo recente (CHEN e STRICKLAND, 1997) demonstrou que a degradação de laminina via ativador de plasminogênio/plasmina promove a morte de neurônios hipocampus. Esses resultados indicam um possível papel da laminina na sobrevivência e manutenção de neurônios. Além disso, a interação dessas células com a matriz extracelular pode estar envolvida no processo normal de

desenvolvimento. Já foi demonstrado que proteínas da ECM são fatores importantes para a sobrevivência de vários tipos de células. Se células epiteliais ou neurônios são impedidos de interagir com a matriz, eles tornam-se inviáveis (TALHOUK E cols., 1992; KALCHEIM e cols., 1987). A perda dessas células pode determinar a formação de cavidades ou dar espaço para a acomodação de outros tipos de células durante fases precoces do desenvolvimento embrionário. Será que a interação verificada entre laminina e PrPc (proteína presente principalmente na superfície de neurônios do hipocampo) estaria envolvida, de alguma forma, na manutenção dessas células? Vale a pena ressaltar que, como mencionado anteriormente, o PrPc é fundamental para a manutenção dos neurônios de Purkinje do cerebelo (SAKAGUSHI e cols., 1996) e, curiosamente, essas mesmas células sintetizam grande quantidade de laminina (resultados preliminares do nosso laboratório, apresentado em (Graner, Tese de Doutorado, 1996)).

Outros trabalhos também mostraram que a interação encontrada entre APP e laminina pode estar relacionada ao processo patológico de formação de placas amilóides, mas também pode participar de processos fisiológicos, como, por exemplo, na neuritogênese (KOO e cols., 1993). Considerando-se algumas semelhanças compartilhadas por APP e PrPc, resolvemos investigar se a interação PrPc/laminina também estaria envolvida no mecanismo de indução do crescimento de neuritos.

Em GRANER e cols. (2000) - em anexo - fomos capazes de mostrar uma inibição significativa do crescimento de neuritos induzido por laminina por anticorpos anti-PrPc em células PC-12 e em culturas primárias de neurônios hipocámpais de ratos e camundongos. Esses resultados demonstraram que a interação verificada entre PrPc e LN participa do mecanismo de neuritogênese, assim como a interação APP/LN.

Para uma melhor caracterização da interação verificada, resolvemos mapear o sítio de ligação da LN ao PrPc, através de ensaios de competição com peptídeos de funções bem estabelecidas, correspondentes a determinadas regiões da laminina. A verificação da participação da interação PrPc/LN no processo de neuritogênese (GRANER e cols., 2000) nos levou a escolher os peptídeos IKVAV, YIGSR e RNIAEIIKDI para a execução dos experimentos de competição. Como já citado no presente trabalho, a sequência IKVAV da laminina parece estimular os processos de adesão e migração e também promover o crescimento de neuritos em células nervosas

(TASHIRO e cols., 1989). Curiosamente, verificou-se que APP é capaz de se ligar à laminina exatamente nesse domínio (KIBBEY e cols., 1993) e de induzir a formação de prolongamentos celulares (KOO e cols., 1993) quando faz esse tipo de associação. Quanto ao peptídeo YIGSR, parece que ele é importante nos processos de adesão e migração, contudo não apresenta-se ativo no crescimento de neuritos induzido por LN (TASHIRO e cols., 1989), sendo então usado como controle negativo nos nossos ensaios. O peptídeo RNIAEIIKDI encontra-se na região C-terminal (alfa-helicoidal) da cadeia $\gamma 1$ da laminina e, como demonstrado por LIESE e cols. (1989), esse domínio é responsável por estimular tanto a adesão, quanto o crescimento de neuritos em neurônios de cerebelo em cultura primária. Como indicado na figura 19, dos peptídeos testados, este último foi o único capaz de inibir a ligação da laminina ao PrPc. Deve-se notar que a inibição verificada foi dose-dependente: 30 μg de RNIAEIIKDI inibiram cerca de 70% da ligação, enquanto que 60 μg desse mesmo peptídeo já se mostraram suficiente em bloquear totalmente essa interação (resultado não mostrado na figura). Por outro lado, nem a adição de 300 μg dos outros peptídeos testados conseguiram deslocar a ligação em questão. Sem dúvida, o resultado obtido indica fortemente que essa sequência presente na cadeia $\gamma 1$ é, pelo menos, um dos sítios da laminina envolvidos na ligação ao PrPc. Vale mencionar que até então não se havia demonstrado nenhum ligante para esse domínio da laminina (POWELL e KLEINMAM, 1997).

A participação da interação entre PrPc e esse domínio específico da cadeia $\gamma 1$ da laminina na indução do crescimento de neuritos foi verificada em ensaios de neuritogênese feitos pelo nosso grupo. O tratamento de neurônios em cultura primária de hipocampo de rato com anticorpos anti-PrPc inibiu cerca de 50% da indução de neuritos quando essas células foram crescidas sobre laminina. O efeito inibitório desses mesmos anticorpos aumentou para 80% quando as células foram plaqueadas sobre o peptídeo derivado da cadeia $\gamma 1$ da laminina, indicando que a neuritogênese mediada pelo PrPc se dá quando ele se liga a essa região específica da laminina. Esses dados também foram confirmados com ensaios de neuritogênese feitos com neurônios provenientes de hipocampo de camundongos selvagens e "knockout" para PrPc. Verificou-se que a inibição do crescimento de neuritos por anticorpos anti-PrPc de células de animais selvagens crescidas sobre laminina ou sobre o peptídeo RNIAEIIKDI era semelhante à

obtida para os neurônios de ratos (cerca de 40-50% de inibição para o primeiro substrato e 90% para o último). Por outro lado, os neurônios de camundongos "knockout" para PrPc apresentaram bem menos neuritos quando crescidos sobre laminina em relação aos selvagens e a indução desses prolongamentos não foi inibida pelo tratamento com anti-PrPc. Os neurônios provenientes de animais "knockout" também foram incapazes de estender neuritos quando plaquados sobre o peptídeo derivado da cadeia $\gamma 1$ da laminina. Todos esses resultados de neuritogênese encontram-se no artigo publicado pelo nosso grupo (GRANER e cols., 2000), em anexo. Eles sustentam os dados aqui apresentados de uma ligação específica entre o PrPc e o domínio específico da laminina e demonstram que essa interação apresenta uma função biológica.

Ainda pensando em termos de um significado fisiológico para a associação entre a laminina e o PrPc, vale à pena discutir um pouco sobre os resultados obtidos a partir dos ensaios de ligação *in vitro* e de neuritogênese, nos quais utilizou-se a laminina-1 (LN-1), proveniente do tumor EHS e a distribuição desse tipo de LN no sistema nervoso central. HAGG e cols. (1997) mostraram a localização dos vários tipos de cadeias de laminina no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos, através de reações de imunohistoquímica. Foi visto que a laminina-1 ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$) encontra-se exclusivamente nos vasos sanguíneos, o que não parece estar muito de acordo com os dados de que a interação verificada estaria envolvida no mecanismo de neuritogênese. Entretanto, como indicado na figura 19, a região da laminina responsável por se ligar ao PrPc encontra-se na cadeia $\gamma 1$ dessa molécula. De maneira consistente, no mesmo trabalho acima mencionado, foi verificada uma reação positiva para a cadeia $\gamma 1$ nos corpos celulares de neurônios distribuídos por todo SNC. Marcação para a cadeia $\alpha 2$ também foi encontrada, porém apenas nos processos neuronais e em estruturas sinápticas, principalmente na região do sistema límbico. Assim, a localização de $\alpha 2$ e $\gamma 1$ no SNC parece ser mutuamente exclusiva, deixando dúvidas à respeito do tipo de laminina aí presente. Os autores do artigo em questão especulam a existência de novas isoformas de laminina nesse local e até propõem que cadeias separadas, não associadas na forma clássica de heterotrímeros, possam existir. De toda forma, a presença de $\gamma 1$ no tecido nervoso, independente de que outras cadeias estejam associadas a ela, fortalece a hipótese de um envolvimento da interação PrPc/laminina em processos biológicos normais, os quais parecem incluir neuritogênese

associada aos mecanismos de memória e aprendizado (como será visto adiante). É importante também mencionar que o gene *unc6* de *C.elegans*, essencial para a migração neuronal e formação de vias nervosas, é homólogo à cadeia $\gamma 1$ da laminina, reforçando a relevância fisiológica dessa cadeia no sistema nervoso central e, consequentemente, da interação de sua região específica com o PrPc. Deve-se também mencionar que dez, dos onze tipos de laminina conhecidos apresentam a cadeia $\gamma 1$ (LUCKENBILL-EDDS, 1997).

Em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Ivan Izquierdo (UFRG) demonstramos que a ligação do PrPc na sequência RNIAEIIKDI da cadeia $\gamma 1$ da laminina também parece estar envolvida nos processos de memória e aprendizado. A figura 22 mostra que os anticorpos anti-PrPc e anti-LN possuem efeito amnésico, visto que ratos submetidos ao teste de esquiva inibitória que receberam em seus hipocampus essas substâncias logo após o treino, permaneceram menos tempo na plataforma do que os ratos controles, que receberam salina ou IgG irrelevante. Esse resultado sugere que PrPc e LN participam no processo de memória, entretanto ele não permite concluir que esse mecanismo seja decorrente da associação entre essas duas moléculas. O resultado da figura 23 possibilitou chegar a essa conclusão. Quando o peptídeo RNIAEIIKDI foi infundido no hipocampo dos ratos, não se observou nenhuma alteração nos testes de esquiva inibitória. Contudo, a co-infusão desse peptídeo com o anti-PrPc reverteu o efeito amnésico desse último. Uma explicação possível para esses resultados baseia-se na premissa de que a manutenção da ligação entre PrPc e o sítio específico da cadeia $\gamma 1$ da LN é importante para o estabelecimento da memória. Assim, a infusão do peptídeo em questão não promoveu nenhum efeito, pois ele não foi capaz de deslocar a interação PrPc/ $\gamma 1$ no hipocampo dos ratos. Essa interação pôde ser deslocada com a adição de anticorpos anti-PrPc e então, a sequência RNIAEIIKDI pode agora se ligar ao PrPc e inibir o bloqueio pelo anti-PrPc e portanto, reverter o efeito amnésico que ele provoca. Essa interpretação também presume que o peptídeo derivado da cadeia $\gamma 1$ sozinho (não fazendo parte da molécula inteira de laminina), ao se ligar ao PrPc, é capaz de promover o sinal celular necessário.

Já está bem estabelecido que os fatores neurotróficos são cruciais para o desenvolvimento e a manutenção da plasticidade do sistema nervoso. Evidências recentes

sugerem que as moléculas de adesão celular (CAMs), como NCAM, L1, tenascina e Thy-1 também participam da regulação da plasticidade, estando envolvidas no remodelamento funcional e estrutural das sinapses (COTMAN e cols., 1998). Nesse sentido, os resultados aqui apresentados, permitem sugerir que o PrPc funcione como uma CAM, participando da consolidação e do fortalecimento das sinapses. De fato, esses dados estão de acordo com os achados de que camundongos deletados para o gene que codifica PrPc apresentaram alterações nas propriedades relacionadas aos receptores GABA_A, assim como no fenômeno hipocampal de potenciação de longa duração (LTP) (COLLINGE e cols., 1994; MANSON e cols., 1995; WHITTINGTON e cols., 1995). Resultados do nosso grupo em associação com o grupo do Dr Éspere Cavalheiro (UNIFESP) também mostraram a participação da interação PrPc/laminina na LTP. De maneira semelhante ao que foi observado nos testes de esquila inibitória (figs. 22 e 23), foi visto que anticorpos anti-PrPc e anti-LN foram capazes de diminuir a LTP promovida em fatias de hipocampo de ratos *in vitro*. O peptídeo RNIAEIIKDI sozinho não apresentou efeito, porém quando co-injetado com o anti-PrPc ele foi capaz de reverter a inibição que esse anticorpo provocou. Esses dados encontram-se em anexo e estão submetidos para publicação, juntamente com os dados de memória.

É interessante comentar que um papel fisiológico parecido foi atribuído à proteína precursora de amilóide (APP), envolvida na doença de Alzheimer. Em seus estudos, MEZIANE e cols. (1998) demonstraram que a administração intracerebroventricular de APP^s₇₅₁ e APP^s₆₉₅ em camundongos aumenta a memória desses animais e bloqueia o efeito amnésico induzido pela droga escopolamina nos vários testes utilizados. Aliando esses dados às informações de que APP se liga à laminina, funciona de maneira similar a uma CAM, induz o crescimento de neuritos e está relacionada ao processo de LTP, pôde-se propor que APP teria a função de consolidação da memória, através da estabilização dos contatos entre células e da manutenção e fortalecimento de sinapses específicas (MEZIANE e cols., 1998; COTMAN e cols., 1998). Curiosamente, os resultados produzidos no nosso laboratório e também por outros grupos, revelaram que o PrPc está envolvido nos mesmos processos listados acima para o APP: nesse trabalho verificamos que PrPc liga-se à LN, induzindo os mecanismos de neuritogênese e memória; outros também já demonstraram o envolvimento dessa proteína na LTP (COLLINGE e cols.,

1994; MANSON e cols., 1995; WHITTINGTON e cols., 1995). Resultados nossos em colaboração com o grupo do Dr. Éspér Cavalheiro (UNIFESP) indicaram que a interação PrPc/laminina também está envolvida na LTP. Assim, pode-se dizer que o PrPc, da mesma forma que APP, participa da consolidação e do fortalecimento de sinapses, ou seja, do mecanismo de plasticidade sináptica do sistema nervoso.

COTMAN e cols. (1998) ainda discutem que as interações realizadas pelas CAMs, além de participarem no processo fisiológico de desenvolvimento e reestruturação de circuitos neuronais, elas também podem favorecer o estabelecimento de processos patológicos. Os autores citados acima defendem que uma determinada interação que desestruture a organização da membrana celular leva ao mecanismo de degeneração. Na Doença de Alzheimer, por exemplo, o peptídeo β -amilóide, produzido a partir da clivagem de APP, adquire a conformação de folha beta-pregueada (em fibrilas). Essa estrutura permite a formação das placas β -amilóides e as interações das moléculas que constituem essas placas (dentre as quais deve-se destacar os componentes da matriz extracelular) com receptores celulares iniciam determinados sinais aberrantes que levam os neurônios à morte. Ainda pensando nas várias propriedades em comum entre APP e PrPc, esse mesmo processo deve ocorrer nas doenças causadas por prions, já que a conversão de PrPc para PrPsc requer a transformação de estruturas em alfa-hélice para estruturas em folha-beta e a formação de placas amilóides é característica dessas doenças.

Ainda quanto à discussão do provável papel fisiológico para o PrPc, HERMS e cols. (1999) demonstraram que essa proteína localiza-se predominantemente nas membranas pré-sinápticas, através de ensaios bioquímicos e morfológicos. Estudos eletrofisiológicos indicaram que o PrPc atua na homeostase de cobre nessas regiões. É interessante notar que alguns trabalhos sugerem a participação da cadeia $\gamma 1$ da LN nas sinapses. Foi visto que a LN-11 ($\alpha 5$, $\beta 2$, $\gamma 1$) está presente nas fendas sinápticas (MINER e PATTON, 1999). A co-localização de PrPc e $\gamma 1$ nessas regiões sugere que a interação verificada entre essas duas moléculas realmente participa de algum mecanismo relacionado à função das sinapses. A integração das interações do PrPc com a laminina e com o cobre para desempenhar esse papel deve ser investigada.

5.4 PrPc E SUAS INTERAÇÕES: FORMAÇÃO DE UM COMPLEXO MULTIPROTÉICO?

Outros estudos ainda serão necessários para se determinar a via de sinalização desencadeada pela interação PrPc/laminina. Sendo o PrPc ancorado na superfície celular por GPI e a laminina uma proteína presente na matriz extracelular, seria razoável supor a existência de uma molécula transmembrânica capaz de fazer a ligação entre essa interação que ocorre extracelularmente e o meio citoplasmático. As integrinas seriam fortes candidatas para realizar esse papel: elas atravessam a membrana plasmática e se ligam à laminina e também às proteínas do citoesqueleto, além de transduzirem sinais celulares (HYNES, 1992) e de participarem do mecanismo de neuritogênese induzido por laminina (REICHARDT e TOMASELLI, 1991). Assim poderíamos pensar na existência de um complexo protéico formado por PrPc, laminina e integrina, capaz de gerar os sinais necessários para os processos de neuritogênese e memória.

O receptor de 60-66 kDa que caracterizamos também poderia participar desse complexo, modulando as interações que o PrPc realiza ou ajudando na transdução dos sinais. De fato, vários ligantes de PrPc e de laminina poderiam estar envolvidos em um complexo multiprotéico para mediar as respostas fisiológicas identificadas. Resta saber se esse complexo realmente existe e quais são as moléculas que fazem parte dele. É possível também que não exista uma integração de todas essas interações e que o PrPc apresente funções diferentes que dependam do tipo de associação que ele realiza.

Como pode ser visto, muitas questões sobre o PrPc e suas interações ainda permanecem em aberto. O melhor conhecimento dessas ligações poderá ajudar a desvendar o(s) papel(éis) fisiológico(s) do PrPc e também poderá trazer informações úteis no desenvolvimento de compostos terapêuticos para o tratamento das doenças causadas por prion.

6. CONCLUSÕES

1) Através do sistema GST, conseguiu-se obter a proteína PrPc recombinante, porém imobilizada na glutathiona-Sepharose. Mesmo nessas condições, utilizou-se GST-PrPc em vários ensaios de ligação para a caracterização das interações PrPc/receptor e PrPc/laminina.

2) Com o sistema de expressão heteróloga baseado na cauda de histidinas, foi possível produzir quantidades significativas de PrPc solúvel, o qual vem facilitando alguns ensaios realizados no laboratório.

3) Ensaios de ligação *in vitro* utilizando PrPc recombinante, ou PrPc nativo (ancorado na superfície de células N2a) confirmaram que a forma presente na membrana plasmática do receptor (de 66 kDa) era capaz de se associar ao PrPc.

4) Verificou-se a existência de uma interação específica entre PrPc e laminina. O Kd obtido para essa ligação foi da ordem de 10^{-8} M.

5) O domínio da laminina capaz de se ligar ao PrPc foi mapeado. É uma sequência específica da região C-terminal da cadeia $\gamma 1$ (RNIAEIIKDI) e está envolvida nos mecanismos de adesão e neuritogênese. De fato, resultados produzidos por outros membros do grupo demonstraram que a interação PrPc/laminina participa do processo de indução de crescimento de neuritos.

6) Experimentos feitos em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Ivan Izquierdo (UFRG) indicaram que a ligação entre PrPc e a região específica da cadeia $\gamma 1$ da laminina também está envolvida nos mecanismos de memória e aprendizado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUZZI, A. e WEISSMAN, C. Prions research: the next frontiers. *Nature* 389: 795-798, 1997.
- ANDERSON, R.G.W. Plasmalemmal caveolae and GPI-anchored membrane proteins. *Cur. Opin. Cell Biol.* 5: 647-652, 1993.
- ARVAN, P., CAMERON, R.S. e CASTLE, D. Secretory membranes of rat parotid gland: preparation and comparative characterization. *Meth. Enzymol.* 98: 75-87, 1983.
- BARANYI, L., et al. The antisense homology box: a new motif within proteins that encodes biological active peptides. *Nat. Med* 1: 894-901, 1995.
- BARRY, R.A. e PRUSINER, S.B. Monoclonal antibodies to the cellular and scrapie prion proteins. *J. Infect. Dis.* 154:518-521, 1986.
- BASLER, K.; OESCH, B.; SCOTT, M.; WESTAWAY, D.; WALCHLI, M.; GROTH, D.F.; MCKINLEY, M.P.; PRUSINER, S.B. e WEISSMANN, C. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46: 417-428, 1986.
- BECK, K., HUNTER, I. e ENGEL, J. Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J.* 4: 148-160, 1990.
- BERNABEU, R., BEVILACQUA, L., ARDENGHI, P., BROMBERG, E., SCHIMITZ, P., BIANCHIN, M., IZQUIERDO, I. e MEDINA, J.H. Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signalling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proc. Natl. Aca. Sci USA* 94: 7041-7046, 1997.
- BLALOCK, J. e SMITH, E.M. Hydropatic anti-complementary of aminoacids based on the genetic code. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121: 203-207, 1994.
- BLÄTTLER, T.; BRANDNER, S.; RAEER, A.J.; KLEIN, M.A.; VOIGTLÄNDER, T.; WEISSMANN, C. e AGUZZI, A. PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain. *Nature* 389: 69-73, 1997.
- BORCHELT, D.R., TARABOULOS, A. e PRUSINER, S.B. Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 267: 16188-16199, 1992.
- BRENTANI, R.R., RIBEIRO, S.F., POTOENJAK, P., PASQUALINI, R., LOPES, J.D. e NAKAIE, C.R. Characterization of the cellular receptor for fibronectin through a hydropathic complementary approach. *Proc. Natl. Aca. Sci USA* 85: 364-367, 1988.

- BRIMACOMBE, D.B., BENNETT, A.D., WUSTEMAN, F.S., GILL, A.C. e DANN, J.C. Characterization and polyanion-binding properties of purified recombinant prion protein, *Biochem. J.* 342: 605-613, 1999.
- BROWN, D.R., WONG, B.-S., HAFIZ, F., CLIVE, C., HASWELL, S.J. e JONES, I.M. Normal prion protein has an activity like that superoxide dismutase. *Biochem. J.* 344: 1-5, 1999.
- BROWN, D.R.; QIN, K.; HERMS, J.W.; MADLUNG, A.; MANSON, J.; STROME, R.; FRASER, P.E.; KRUCK, T.; VON BOHLEN, A.; SCHULZ-SCHAEFFER, W.; GIESE, A.; WESTAWAY, D. e KRETZSCHMAR H The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 390: 684-687, 1997.
- BROWN, P. The phenotypic expression of different mutations in transmissible human spongiform encephalopathy. *Rev. Neurol.* 148: 317-327, 1992.
- BROWN, P., GIBBS, C.J.Jr.; RODGERS-JOHNSON, P.; ASHER, D.M.; SULIMA, M.P.; BACOTE, A.; GOLDFARB, L.G. e GAJDUSEK, D.C. Human spongiform encephalopathy: The National Institute of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Ann. Neurol.* 35: 513-529, 1994.
- BROWN, P., PREECE, M.A. e WILL, R.G. "Friendly fire" in medicine: hormones, homografts, and Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 340:24-27, 1992.
- BRUCE, M.; CHREE, A.; MCCONNELL, I.; FOSTER, J.; PEARSON, G. e FRASER, H. Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice strain variation and the species barrier. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* B343:405-411, 1994.
- BUCK, C.A. e HORWITZ, A.F. Cell surface receptors for extracellular matrix molecules. *Annu Rev Cell Biol.* 3:179-205, 1987.
- BÜELER, H., FISCHER, M., LANG, Y., BLUETHMANN, H., LIPP, H.-P., DEARMOND, S.J., PRUSINER, S.B., AGUET, M. e WEISSMANN, C. Normal developmental and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356: 577-582, 1992.
- BÜELER, H.; AGUZZI, A.; SAILER, A.; GREINER, R.A.; AUTENRIED, P.; AGUET, M. e WEISSMANN, C. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73: 1339-1347, 1993.
- BURGESSON, R.E., CHIQUET, M., DEUTZMANN, R., EKBLOM, P., ENGEL, J., KLEINMAN, H., MARTIN, G.R., MENEGUZZI, G., PAULSSON, M. e SANES, J. A new nomenclature for the laminins. *Matrix Biol.* 14: 209-211, 1994.

- CAUGHEY, B. e RAYMOND, G.J. Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells. *J. Virol.* 67: 643-650, 1993.
- CHAMMAS, R., VEIGA, S.S., LINE, S., POTOENJAC, P. e BRENTANI, R.R. Asn-linked oligosaccharide-dependent interaction between LN and gp120/140. *J. Biol. Chem.* 266: 3349-3355, 1991.
- CHEN, S.G., TELOW, D.B., PARCHI, P., TELLER, J.K., GAMBETTI, P. e AUTILIO-GAMBETTI, L. Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. *J. Biochem. Chem.* 270: 19173-19180, 1995.
- CHEN, Z. e STRICKLAND, S. Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell* 91: 917-925, 1997.
- CHESEBRO, B.; RACE, R.; WEHRLY, K.; NISHIO, J.; BLOOM, M.; LECHNER, D.; BERGSTROM, S.; ROBBINS, K.; MAYER, L.; KEITH, J.M.; et al. Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie infected and uninfected brain. *Nature* 315: 331-333, 1985.
- COLLINGE, J., WHITTINGTON, M.A., SIDLE, K.C.L., SMITH, C.J., PALMER, M.S., CLARKE, A.R. e JEFFREYS, J.G.R. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370: 295-297, 1994.
- COLLINGE, J.; SIDLE, K.C.L.; MEADS, J.; IRONSIDE, J. e HILL, A.F. Molecular analysis of prion strain variation and the etiology of "new variant" CJD. *Nature* 383: 685-690, 1996.
- DE SOUZA, S.J. e BRENTANI, R.R. Collagen binding site in collagenase can be determined using the concept of sense-anti-sense peptide interactions. *J. Biol. Chem.* 267: 13763-13767, 1992.
- EDENHOFER, F., RIEGER, R., FAMULOK, M., WENDLER, W., WEISS, S. e WINNACKER, E-L. Prion protein PrP^C interacts with molecular chaperones of the Hsp60 family. *J. Virol.* 70: 4724-4728, 1996.
- ENGVALL, E. Laminin variants: why, where, and when? *Kidney Int.* 43: 2-6, 1993.
- FARQUHAR, C., DICKINSON, A. e BRUCE, M. Prophylactic potential of pentosan polysulphate in transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet* 353, 117, 1999.
- FISCHER, M., RÜLICHE, T., RAEBER, A., SAILER, A., MOSER, M., OESCH, B., BRANDNER, S., AGUZZI, A. e WEISSMANN, C. Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J.* 15: 1255-1264, 1996.

- FORLONI, G., ANGERETTI, N., CHIESA, R., MONZANI, E., SALMONA, M., BUGIANI, O. e TAGLIAVINI, F. Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 362: 543-546, 1993.
- GABIZON, R., MCKINLEY, M.P., GROTH, D.F., KENAGA, L. e PRUSINER, S.B. Properties of *scrapie* prion in liposomes. *J. Biol. Chem.* 263: 4950-4955, 1988.
- GABIZON, R., MEINER, Z., HALIMI, M. e BEN-SASSON, S.A. Heparin-like molecules bind differentially to prion-proteins and change their intracellular metabolic fate. *J. Cell. Physiol.* 157: 319-325, 1993.
- GABRIEL, J-M., OESCH, B., KRETZSCHMAR, H., SCOTT, M. e PRUSINER, S.B. Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc. Natl. acad. Sci USA* 89: 9097-9101, 1992.
- GAJDUSEK, D.C. e ZIGAS, V. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea. The endemic occurrence of "kuru" in the native population. *N. Eng. J. Med.* 257: 974-978, 1957.
- GAJDUSEK, D.C. Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science* 197: 943-960, 1977.
- GAMBETTI, P.; PARCHI, P.; PETERSEN, R.B.; CHEN, S.G. e LUGARESI, E. Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: Clinical, pathological and molecular features. *Brain Pathol.* 5: 43-51, 1995.
- GASSET, M.; BALDWIN, M.A.; LOYD, D.H.; GABRIEL, J-M.; HOLTZMAN, D.M.; COHEN, F.; FLETTERICK, R. e PRUSINER, S.B. Predicted α -helical regions of the prion protein when synthesized as peptide form amyloid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10940-10944, 1992.
- GEHLSSEN, K.R., DICKERSON, K., SCOTT, W., ENGVALL, E. e RUOSLATHI, E. Subunit structure of laminin-binding integrin and localization of its binding site on laminin. *J. Biol. Chem.* 264: 19034-19038, 1989.
- GHETTI, B.; DLOUHY, S.R.; GIACONE, G.; BUGIANI, O.; FRANGIONE, B.; FORLONE, M.R. e TAGLIAVINI, F. Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease and the Indiana kindred. *Brain Pathol.* 5: 61-75, 1995.
- GOLDMANN, W., HUNTER, N., MARTIN, T., DAWSON, M. e HOPE, J. Different forms of the bovine PrP gene have five or six copies of a short, G-C-rich element within the protein-coding exon. *J. Gen. Virol.* 72:201-204, 1991.
- GRANER, E., MERCADANTE, A.F., ZANATA, S.M., FORLENZA, O.V., CABRAL, A.L.B., VEIGA, S.S., JULIANO, M.H., ROESLER, R., WALZ, R., MINETTI, A.,

- IZQUIERDO, I., MARTINS, V.R. e BRENTANI, R.R. Cellular Prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Mol. Brain Res.* 76: 85-92, 2000.
- GRANER, E. Caracterização de um receptor para o prion através da teoria da hidropaticidade complementar dos aminoácidos. Evidências da interação prion-laminina. Tese de doutorado, Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, 1996.
- HAN, H., WHINREB, P.H. e LANSBURY, P.T.J. The core Alzheimer peptide NAC forms amyloid fibrils which seed and are seeded by β -amyloid: is NAC a common trigger or target in neurodegenerative diseases?. *Chem. & Biol.* 2: 163-169, 1995
- HARRIS, D.A.; LELE, P. e SNIDER, W.D. Localization of the mRNA for a chicken prion protein by in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4309-4313, 1993.
- HERMS, J., TINGS, T., GALL, S., MADLUNG, A., GIESE, A., SIEBERT, H., SCHÜRMANN, P., WINDL, O., BROSE, N. e KRETZSCHMAR, H. Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J. Neurosci.* 19: 8866-8875, 1999.
- HERMS, J.W., KRETZSCHMAR, H.A., TITZ, S. e KELLER, B.U. Patch-clamp analysis of synaptic transmission to cerebellar Purkinje cells of prion protein knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* 7: 2508-2512, 1995.
- HILL, A.F.; ZEIDLER, M.; IRONSIDE, J. e COLLINGE, J. Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet* 349:99-100, 1997.
- HOCHULI, E. Genetically design affinity chromatography using a novel metal chelate absorbent. *Biologically Active Molecules* 217-239, 1989.
- HOCHULI, E. Purification of recombinant proteins with metal chelate absorbent. In: Genetic engineering, principle and method. Setlow, J.K., ed 12, 87-98, 1990.
- HORIUCH, M. e CAUGHEY, M. Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state. *EMBO J.* 18: 3193-3203, 1999.
- HOWARD, J. e PILKINGTON, G.J. Antibodies to fibronectin bind to plaques and other structures in Alzheimer's disease and control brain. *Neurosci. Lett.* 118: 71-16, 1990.
- HSIAO, K.K. From prion diseases to Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm.* 49: 135-144, 1997.

- HSIAO, K., BAKER, H.F., CROW, T.J., POULTER, M., OWEN, F., TERWILLIGER, J.D., WESTAWAY, D., OTT, J. e PRUSINER, S.B. Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Sträusler syndrome. *Nature* 338:342-345, 1989.
- HSIAO, K.K.; GROTH, D.; SCOTT, M.; YANG, S-L.; SERBAN, H.; RAPP, D.; FOSTER, D.; TORCHIA, M.; DeARMOND, S.J. e PRUSINER, S.B. Serial transmission in rodents of neurodegeneration from transgenic mice expressing mutant prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9126-9130, 1994.
- HUANG, Z., GABRIEL, J.-M., BALDWIN, M.A., FLETTERICK, R.J., PRUSINER, S.B. e COHEN, F.E.. Proposed three-dimensional structure for the cellular prion protein *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7139-7143 1994.
- HYNES, R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11-25, 1992.
- IZQUIERDO, I., QUILLFELDT, J.Á., ZANATTA, M.S., QUEVEDO, J., SCHAEFFER, E., SCHMITZ, P.K. e MEDINA, J.H. Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *Eur. J. Neurosci.* 9: 786-793, 1997.
- JONES, D. e VARELA-NIETO, I. The role of glycosyl-phosphatidylinositol in signal transduction. *Intern. J. Biochem. Cell Biol.* 30: 313-326, 1998.
- KALCHEIM, C., BARDE, Y-A., THOENEN, H. e DOUARIN, N.M. In vivo effect of brain-derived neurotrophic factor on the survival of developing dorsal root ganglion cells. *EMBO J.* 6: 2871-2873, 1987.
- KANEKO, K., VEY, M., SCOTT, M., PILKUHN, S., COHEN, F.E. e PRUSINER, S.B. COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2333-2338, 1997a.
- KANEKO, K., WILLE, H., MEHLHORN, I., ZHANG, H., BALL, H., COHEN, F.E., BALDWIN, M.A. e PRUSINER, S.B. Molecular properties of complexes formed between the prion protein and synthetic peptides. *J. Mol. Biol.* 270: 574-586, 1997b.
- KANEKO, K., ZULIANELLO, L., SCOTT, M., COOPER, C.M., WALLACE, A.C., JAMES, T.L., COHEN, F.E. e PRUSINER, S.B. Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion during scrapie prion propagation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10069-10074, 1997c.
- KEUEN, L.J.M.; SCHREUDER, B.E.C.; MALOEN, R.H.; MOOIJ-HARKES, G.; VROMANS, M.E.W. e LANGEVELD, J.P.M. Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J.Clin.Microbiol.* 34: 1228, 1996.

- KIBBEY, M.C., JUCKER, M., WEEKS, B.S., NEVE, R.L., VAN NOSTRAND, W.E. e KLEINMAN, H.K. β -amyloid precursor protein binds to the neurite-promoting IKVAV site of laminin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10150-10153, 1993.
- KIMBERLIN, R. e WALKER, C. Characteristics of a short incubation model of scrapie in the golden hamster. *J. Gen. Virol.* 34: 295-304, 1977
- KIMBERLIN, R.H. e WALKER, C.A. Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for neural spread of infection to the CNS. *J. Gen. Virol.* 51: 183-187, 1980.
- KIMBERLIN, R.H. e WALKER, C.A. Pathogenesis of scrapie in mice after intragastric infection. *Virus Res* 12:213-20, 1989.
- KIMBERLIN, R.H. e WALTER, C.A. Pathogenesis of scrapie (strain 263K) in hamsters infected intracerebrally, intraperitoneally or intraocularly. *J. Gen. Virol.* 67: 255, 1986.
- KITAMOTO, T.; OGOMORI, K.; TATEISHI, J. e PRUSINER, S.B. Formic acid pre-treatment enhances immunostaining of cerebral and systemic amyloids. *Lab. Invest.* 57: 230-236, 1987.
- KLATZO, I.; GAJDUSEK, D.C. e ZIGAS, V. Pathology of kuru. *Lab. Invest.* 8: 799-847, 1959.
- KLEIN, M.A.; FRIGG, R.; FLECHSIG, E.; RAEGER, A.J.; KALINKE, U.; BLUETHMANN, H.; BOOTZ, F.; SUTER, M.; ZINKERNAGEL, R.M. e AGUZZI, A. A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* 390:687-90, 1997.
- KLEINMAN, H.K., CANNON, F.B., GORDON, W.L., HASSEL, J.R., AUMAILLEY, M., TERRANOVA, V.P., MARTIN, G.R. e DUBOIS-DALCA, M. Biological activities of laminin. *J. Cell Biochem.* 27: 317-325, 1987.
- KLEINMAN, H.K., WEEKS, B.S., CANNON, F.B., SWEENEY, T.M., SEPHEL, G.C., CLEMENT, B., ZAIN, M., OLSON, M.O.J. e JUCKER, M. Identification of a 110 kDa nonintegrin cell surface laminin-binding protein which recognizes an A chain neurite-promoting peptide. *Arch. Biochem. Biophys.* 290: 320-325, 1991.
- KOCISKO, D.A., COME, J.H., PRIOLA, S.A., CHESEBRO, B., RAYMOND, G.J., LANSBURY, P.T., Jr. e CAUGHEY, B. Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* 370: 471-474, 1994.
- KOO, E.H., PARK, L. e SELKOE, D.J. Amyloid β -protein as a substrate interacts with extracellular matrix to promote neurite outgrowth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4748-4752, 1993.

- KREIS, T.E. e PEPPERKOK, R. Coat proteins in intracellular membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6: 533-537, 1994.
- KRETZSCHMAR, H.A.; STOWRING, L.E.; WESTAWAY, D.; STUBBLEBINE, W.H.; PRUSINER, S.B. e DeARMOND, S.J. Molecular cloning of a human prion protein cDNA. *DNA* 5:315-324, 1986.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
- LANTOS, P.L.; MCGILL, I.S.; JANOTA, I.; DOEY, L.J.; COLLINGE, J.; BRUCE, M.T.; WHATLEY, S.A.; ANDERTON, B.H.; CLINTON, J.; ROBERTS, G.W. e ROSSOR, M.N. Prion protein immunocytochemistry helps to establish the true incidence of prion diseases. *Neurosci. Lett.* 147: 67-71, 1992.
- LIESE, P., HAGER, G., DODT, H.-U., SEPPÄLÄ, I. e ZIEGLGÄNSBERGER, W. Domain-specific antibodies against the B2 chain of laminin inhibit neuronal migration in the neonatal rat cerebellum. *J. Neurosci. Res.* 40: 199-206, 1995.
- LIESI P. Extracellular matrix and neuronal movement. *Experimentia* 46: 900-907, 1990.
- LIESE, P., NÄRVÄNEN, A., SOOS, J., SARIOLA, H. e SNOUNOU, G. Identification of a neurite outgrowth-promoting domain of laminin using syntetic peptides. *FEBS Lett.* 244: 141-148, 1989.
- LIESE, P., SEPPÄLÄ, I. e TRENKNER, E. Neuronal migration in cerebellar microcultures is inhibited by antibodies against a neurite outgrowth domain of laminin. *J. Neurosci. Res.* 33: 170-176, 1992.
- LINKE, R.P., HUHN, D., CASANOVA, S. e DONINI, U. Immunoelectron microscopic identification of human AA-type amyloid: exploration of various monoclonal AA-antibodies, method of fixation, embedding and of other parameters for the protein-A gold method. *Lab. Invest.* 61: 691-697, 1989.
- LIOTTA, L.A., RAO, C.N. e WENER, U.M. Biochemical interactions of tumor cell with the basement membrane. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 1037-1057, 1986.
- LISANTI, M.P., SCHERER, P.E., TANG, Z. e SARGIACOMO, M. Caveolae, caveolin and caveolin-rich domains: a signalling hypothesis. *Trends in Cell Biology*, 4: 231-235, 1994.
- LLEDO, P.-M., TREMBLAY, P., DeARMOND, S.J., PRUSINER, S.B. e NICOLL, R.A. Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2403-2407, 1996.

- LUCKENBILL-EDDS, L. Lamini and the mechanism of neuronal outgrowth. *Brain Res. Rev.* 23: 1-27, 1997.
- LUGARESI, E.; MEDORI, R.; MONTAGNA, P.; BARUZZI, A.; CORTELLI, P.; LUGARESI, A.; TINUPER, P.; ZUCCONI, M. e GAMBETTI, P. Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *New Eng. J. Med.* 315: 997-1003, 1986.
- LYON, A.W., NARINDRASORASAK, S., YOUNG, I.D., ANASTASSIADES, T., COUCHMAN, J.R., MCCARTHY, K. e cols. Co-deposition of basement membrane components during the induction of murine splenic AA amyloid. *Lab. Invest.* 64: 785-790, 1991.
- MA, J. e LINDQUIST, S. *De novo* generation of a PrP^{sc}-like conformation in living cells. *Nat. Cell Biol.* 1: 358-361, 1999.
- MANETTO, V.; MEDORI, R.; CORTELLI, P.; MONTAGNA, P.; BARUZZI, A.; HAUW, J.; RANCRUEL, G.; VANDERHAEGHEN, J.J.; MAILLEUX, P.; BUGIANI, O.; TAGLIAVINI, F.; BOURAS, C.; RIZZUTO, N.; LUGARESI, E. e GAMBETTI, P. Fatal familial insomnia: clinical and pathological study of five new cases. *Neurology* 42: 312-319, 1992.
- MANSON, J.; WEST, J.D.; THOMSON, V.; MCBRIDE, P.; KAUFMAN, M.H. e HOPE, J. The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development* 115: 117-122, 1992.
- MANSON, J.C., CLARKE, A.R., HOOPER, M.L., AITCHISON, L., MCCONNELL, I. e HOPE, J. 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol. Neurobiol.* 8: 121-127, 1994.
- MANSON, J.C., HOPE, J., CLARKE, A.R., JOHNSTON, A., BLACK, C. e MacLEOD, N. PrP gene dosage and long term potentiation. *Neurodegeneration* 4: 113-115, 1995.
- MANUELIDIS, L., SKLAVIADIS, T., AKOWITZ, A. e FRITCH, W. Viral particles are required for infection in neurodegenerative Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5124-5128, 1995.
- MARCOTTE, E.M. e EISENBERG, D. Chicken prion tandem repeats form a stable, protease-resistant domain. *Biochemistry* 38: 667-676, 1999.
- MARSH, R.F. e KIMBERLIN, R.H. Comparison of scrapie and transmissible mink encephalopathy in hamsters. II. Clinical signs, pathology, and pathogenesis. *J. Infect. Dis.* 131:104-110, 1975

- MARTINS, V.R.; GRANER, E.; GARCIA-ABREU, J.; SOUZA, S.J.; MERCADANTE, A.F.; VEIGA, S.S.; ZANATA, S.M.; MOURA-NETO, V. e BRENTANI, R.R. Complementary hydropathy identifies a cellular prion protein receptor. *Nat. Med.* 3: 1376-1382, 1997.
- MASTERS, C.L. e RICHARDSON, E.P.Jr. Subacute spongiform encephalopathy (Creutzfeldt-Jakob disease). The nature and progression of spongiform change. *Brain* 101: 333-344, 1978.
- MASTERS, C.L.; GAJDUSEK, D.L. e GIBBS, C.J.Jr. The familial occurrence of Creutzfeldt-Jakob disease and Alzheimer's disease. *Brain* 104: 535-558, 1981.
- MATHEWS, J.D.; GLASSE, R. e LINDENBAUM, S. Kuru and cannibalism. *Lancet*: 449-452, 1968.
- McBRIDE, P.A., WILSON, M.I., EIKELBOOM, P., TUNSTALL, A. e BRUCE, M.E. Heparan sulfate proteoglycan is associated with amyloid plaques and neuroanatomically targeted PrP pathology throughout the incubation period of scrapie-infected mice. *Exp. Neurol.* 149: 447-454, 1998.
- McKINLEY, M.P.; HAY, B.; LINGAPPA, V.R.; LIEBEBURG, I. e PRUSINER, S.B. Developmental expression of prion protein gene in brain. *Dev. Biol.* 121: 105-110, 1987.
- MEYER, N., ROSENBAUM, V., SCHMIDT, B., GILLES, K., MIRENDA, C., GROTH, D., PRUSINER, S.B. e RIESNER, D. Search for a putative scrapie genome in purified prion fractions reveals a paucity of nucleic acids. *J. Gen. Virol.* 72: 37-49, 1990.
- MEYER, R.K., MCKINLEY, M.P., BOWMAN, K.A., BRAUNFELD, M.B., BARRY, R.A. e PRUSINER, S.B. Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2310-2314, 1986.
- MEZIANE, H., DODART, J.-C., MATHIS, C., LITKE, S., CLEMENS, J., PAUL, S.M. e UNGERER, A. Memory-enhancing effects of secreted forms of the β -amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 12683-12688, 1998.
- MINER, J.H. e PATTON, B.L. Laminin-11. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 31: 811-816, 1999.
- MIURA, T.; HORI-I, A. e TAKEUCHI, H. Metal-dependent alpha-helix formation promoted by the glycine-rich octapeptide region of prion protein. *FEBS Lett* 396:248-52, 1996.

- MOBLEY, W.C.; NEVE, R.L.; PRUSINER, S.B. e MCKINLEY, M.P. Nerve growth factor increases mRNA levels for the prion protein and the beta-amyloid protein precursor in developing hamster brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 9811-9815, 1988.
- MURAMOTO, T., SCOTT, M., COHEN, F. e PRUSINER, S.B. Recombinant scrapie-like prion protein of 106 amino acids is soluble. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:15457-15462, 1996.
- MURAMOTO, T.; KITAMOTO, T.; HOQUE, M.Z.; TATEISHI, J. e GOTO, I. Species barrier prevents an abnormal isoform of prion protein from accumulating in follicular dendritic cells of mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Virol.* 67: 6808-6810, 1993.
- MURTOMAKI, S., RISTELI, J., RISTELI, L., KOIVISTO, U.M., JOHANSSON, S. e LIESE, P. Laminin and its neurite outgrowth-promoting domain in the brain in Alzheimer's disease and Down's syndrome patients. *J. Neurosci. Res.* 32: 261-273, 1992.
- NARINDRASORASAK, S., ALTMAN, R.A., GONZALEZ-DEWHITT, P., GREENBERG, B.D. e KISILEVSKY, R. An interaction between basement membrane and Alzheimer amyloid precursor proteins suggests a role in the pathogenesis of Alzheimer disease. *Lab. Invest.* 72: 272-282, 1995.
- NARINDRASORASAK, S., LOWERY, D.E., ALTMAN, R.A., GONZALEZ-DEWHITT, P., GREENBERG, B.D. e KISILEVSKY, R. Characterization of high affinity binding between laminin and Alzheimer's disease amyloid precursor proteins. *Lab. Invest.* 67: 643-652, 1992.
- NEGRO, A., DE FILIPPIS, V., SKAPER, S.D., JAMES, P. e SORGATO, M.C. The complete bovine prion protein highly expressed in *Escherichia coli*: biochemical and structural studies. *FEBS Lett.* 412: 359-364, 1997.
- NISHIDA, N., KATAMINE, S., SHIGEMATSU, K., NAKATANI, A., SAKAMOTO, N., HASEGAWA, S., NAKAOKE, R., ATARASHI, R., KATAOKA, Y. e MIYAMOTO, T. Prion protein is necessary for latent learning and long-term memory retention. *Cell. Mol. Neu.* 17: 537-545.
- OESCH, B., TELOW, D.B., STAHL, N., SERBAN, D., HOOD, L.E. e PRUSINER, S.B. Identification of cellular proteins binding to the scrapie prion protein. *Biochemistry* 29: 5848-5855, 1990.
- OESCH, B.; WESTAWAY, D.; WALCHLI, M.; MCKINLEY, M.P.; KENT, S.B.H.; AEBERSOLD, R.; BARRY, R.A.; TEMPST, P.; TELOW, D.B.; HOOD, L.E.; PRUSINER, S.B. e WEISSMANN, C. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40: 735-746, 1985.

- PAN, K-M.; BALDWIN, M.; NGUYEN, J.; GASSET, M.; SERBAN, A.; GROTH, D.; MEHLHORN, I.; HUANG, Z.; FLETTERICK, R.J. e COHEN, F.E. Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the *scrapie* prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10962-10966, 1993.
- PASQUALINI, R., CHAMONE, D.F. e BRENTANI, R.R. Determination of the putative binding site for fibronectin on platelet glycoprotein IIb-IIIa complex through a hydrophobic complementary. *J. Biol. Chem.* 264: 14566-14570, 1989.
- PERETZ, D., WILLIAMSON, R.A., MATSUNAGA, Y., SERBAN, H., PINILLA, C., BASTIDAS, R., ROZENSHTEYN, R., JAMES, T.L., HOUGHTEN, R.A., COHEN, F.E. e cols., A conformational transition at the N terminus of the prion protein features in formation of the *scrapie* isoform. *J. Mol. Biol.* 273: 614-622, 1997.
- PERLMUTTER, L.S., BARRON, E., SAPERIA, D. e CHUI, H.C. Association between vascular basement membrane components and the lesions of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 30: 673-681, 1991.
- PIERSCHBACHER, M.D. e ROUSLAHTI, E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 309: 30-33, 1984.
- POWELL, S.K. e KLEINMAN, H.K. Neuronal laminins and their receptors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29: 401-414, 1997.
- PRUSINER, S.B., MCKINLEY, M.P., BOWMAN, K.A., BOLTON, D.C. BENDHEIN, P.E. GROTH, D.F. e GLENER, G.G. *Scrapie* prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 35: 349-358, 1983.
- PRUSINER, S.B. Genetic and infectious prion diseases. *Arch. Neurol.* 50: 1129-1153, 1993.
- PRUSINER, S.B. Molecular biology and transgenetics of prion diseases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26: 397-438, 1991a.
- PRUSINER, S.B. Molecular Biology of prion diseases. *Science* 252: 1515-1522, 1991b.
- PRUSINER, S.B. Novel proteinaceous infectious particles cause *scrapie*. *Science* 216: 136-144, 1982.
- PRUSINER, S.B. Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13363-13383, 1998.
- PRUSINER, S.B. *Scrapie* prions. *Annu. Rev. Microbiol.* 43:345-374, 1989.
- PRUSINER, S.B. The prion diseases. *Scientific American* 272: 30-37, 1995.

- PRUSINER, S.B., BOLTON, D.C., GROTH, D.F., BOWMAN, K.A., COCHRAN, S.P. e McKINLEY, M.P. Further purification and characterization of *scrapie* prions. *Biochemistry* 21: 6942-6950, 1982a.
- PRUSINER, S.B., COCHRAN, S.P., GROTH, D.F., DOWNEY, D.E., BOWMAN, K.A. e MARTINEZ, H.M. Measurement of the scrapie agent using an incubation time interval assay. *Ann. Neurol.* 11: 353-358, 1982b.
- PRUSINER, S.B., FUZI, M., SCOTT, M., SERBAN, D., SERBAN, H., TARABOULOS, A., GABRIEL, J.-M., WELL, G., WILESMITH, J., BRADLEY, R. e cols. Immunologic and molecular biologic studies of prion proteins in bovine spongiform encephalopathy. *J. Infect. Dis.* 167: 602-613, 1993.
- PRUSINER, S.B., GROTH, D.F., COCHRAN, S.P., MASIARZ, F.R., McKINLEY, M.P. e MARTINEZ H.M. Molecular properties, partial purification, and assay by incubation period measurements of the hamster scrapie agent. *Biochemistry* 19: 4883-4891 1980.
- PRUSINER, S.B., SCOOT, M.R., DeARMOND, S.J. e COHEN, F.E. Prion protein biology. *Cell* 93: 337-348, 1998.
- REICHDART, L.F. e TOMASELLI, K.J. Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neuronal development. *Ann. Rev. Neurosci.* 14: 531-570, 1991.
- RICHARDSON, E.P.Jr. e MASTERS, C.L. The nosology of Creutzfeldt-Jakob disease and conditions related to the accumulation of PrP^{Sc} in the nervous system. *Brain Pathol.* 5: 33-41, 1995.
- RIEGER, R., EDENHOFER, F., LASMÉZAS, C.I. e WEISS, S. The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat. Med* 3: 1383-1388, 1997.
- RIEK, R., HORNEMANN, S., WIDER, G., BILLETER, M., GLOCKSHUBER, R. e WÜTHRICH, K. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP (121-231). *Nature* 382: 180-182, 1996.
- ROESLER, R., WALZ, R., QUEVEDO, J., de-PARIS, F., ZANATA, S.M., GRANER, E., IZQUIERDO, I., MARTINS, V.R. e BRENTANI, R.R. Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP(C). *Brain Res. Mol. Brain Res.* 71: 349-353, 1999.
- ROGERS, M., TARABOULOS, A., SCOTT, M., BORCHELT, D., SERBAN, D., GYURIS, T. e PRUSINER, S.B. Modification and expression of prion proteins in cultured cells, p. 457-469, in *Prion diseases of human and animals*, 1ª ed. Ellis Horwood, New York, 1992.

- ROGERS, M., YEHIELY, F., SCOTT, M. E PRUSINER, S.B. Conversion of truncated and elongated prion proteins into the scrapie isoform in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3182-3186, 1993.
- SAFAR, J., WILLE, H., ITRI, V., GROTH, D., SERBAN, H., TORCHIA, M., COHEN, F.E. e PRUSINER, S.B. Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat. Med.* 4: 1157-1165, 1998.
- SAKAGUCHI, S., KATAMINE, S., NISHIDA, N., MORIUCHI, R., SHIGEMATSU, K., SUGIMOTO, T., NAKATANI, A., KATAOKA, Y., HOUTANI, T., SHIRABE, S., OKADA, H., HASEGAWA, S., MIYAMOTO, T. e NODA, T. Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* 380: 528-531, 1996.
- SAMAIA, H.B.; MARI, J.J.; VALLADA, H.P.; MOURA, R.P.; SIMPSON, A.T.G. e BRENTANI, R.R. A prion-linked Psychiatric Disorder. *Nature* 390: 241 1997.
- SASAKI, M., KATO, K., GEORGE, R.M. e YAMADA, Y. Sequence of the cDNA encoding the laminin B1 chain reveals a multidomain protein containing cysteine-rich repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 935-939, 1987.
- SASAKI, M., KLEINMAN, H.K., HUBER, H., DEUTZMANN, R. e YAMADA, Y. Laminin, a multidomain protein. *J. Biol. Chem.* 263: 16536-16544, 1988.
- SCATHARD, G. The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. NY Acad. Sci.* 51: 660-672, 1949.
- SCOTT, M.; FOSTER, D.; MIRENDA, C.; SERBAN, D.; COUFAL, F.; WALCHLI, M.; TARCHIA, M.; GROTH, D.; CARLSON, G.; DEARMOND, S.J.; WESTAWAY, D. e PRUSINER, S.B. Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell* 59: 847-857, 1989.
- SCOTT, M.R., WILL, R., IRONSIDE, J., NGUYEN, H.O., TREMBLAY, P., DEARMOND, S.J. e PRUSINER, S.B. Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy in prions to humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 15137-15142, 1999.
- SHAUL, P.W. e ANDERSON, R.G.W. Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am. J. Physiol.* 275: L843-L851, 1998.
- SHMERLING, D., HEGYI, I., FISCHER, M., BLÄTTLER, T., BRANDNER, S., GÖTZ, J., RÜLICKE, T., FLECHSIG, E., COZZIO, A., VON MERING, C., HANGARTNER, C., AGUZZI, A. e WEISSMANN, C. Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell* 93: 203-214, 1998.

- SHYNG, S.L., LEHMANN, S., MOULDER, K.L. e HARRIS, D.A. Sulfated glycans stimulate endocytosis of the cellular isoform of the prion protein, PrPC, in cultured cells. *J. Biol. Chem.* 270: 30221-30229, 1995a.
- SHYNG, S-L., HAUSER, J.E. e HARRIS, D.A. A glycolipid-anchored prion proteins endocytosed via clathrin-coated pits. *J. Cell Biol.* 125: 1239-1347, 1994.
- SHYNG, S-L., MOUDLER, K.J., LAESKO, A. e HARRIS, D.A. The N-terminal domain of a glycolipid-anchored prion protein is essencial for its endocytosis via clathrin-coated pits. *J. Biol. Chem.* 270: 14793-14800, 1995b.
- SMITH, D.B. e JOHNSON, K.S., Single-step purification of polypeptides expressed in *Eschericha coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67:31-40, 1988.
- SMITH, D.B. Purification of glutathione S-tranferase fusion proteins. *Methods Mol. Cell. Biol.* 4: 220-229, 1993.
- SNOW, A.D., WIGHT, T.N., NOCHLIN, D. e KOIKE, Y. Immunolocalization of heparan sulfate proteoglycans to the prion protein amyloid plaques of Gerstmann-Straussler syndrome, Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie. *Lab Invest.* 63: 601-611, 1990.
- TALHOUK, R.S., BISSEL, M.J. e WERB, Z. Coordinated expression of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution. *J. Cell Biol.* 118: 1271-1282, 1992.
- TARABOULOS, A., ROGERS, M., BORCHELT, D.R., MCKINLEY, M.P., SCOTT, M., SERBAN, D. e PRUSINER, S.B. Acquisition of protease resistance by prion proteins in scrapie-infected cells does not require asparagin-linked glycosilation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8262-8266, 1990.
- TASHIRO, K-I, SEPHEL, G.C., WEEKS, B., SASAKI, M., MARTIN, G,R., KLEINMAN, H.K. e YAMADA, Y. A syntetic peptide containing the IKVAV sequence from the A chain of laminin mediates cell attachment, migration, and neurite outgrowth. *J. Biol. Chem* 264: 16174-16182, 1989.
- TELLING, G.C.; SCOTT, M.; MASTRIANNI, J.; GABIZON, R.; TORCHIA, M.; COHEN, F.E.; DeARMOND, S.J. e PRUSINER, S.B. Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 83: 79-90, 1995.
- TIMPL, R., ROHDE, H., ROBEY, P.G., RENNARD, R.I., FOIDART, J-M e MARTIN, G. Laminin, a glycoprotein from basement membranes. *J. Biol. Chem.* 254: 9933-9937, 1979.

- TOBLER, I., GAUS, S.E., DEBOER, T., ACHERMANN, P., FISCHER, M., RÜLICHE, T., MOSER, M., OESCH, B., MCBRIDE, P.A. e MANSON, J.C. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380: 639-642, 1996.
- TURK, E.; TELOW, D.B.; HOOD, L.E. e PRUSINER, S.B. Purification and properties of the cellular and *scrapie* hamster prion proteins. *Eur. J. Biochem.* 176: 21-30, 1988.
- VENSTRON, K.A. e REICHARDT, L.F. Extracellular matrix 2: role of extracellular matrix molecules in their receptors in the nervous system. *FASEB J.* 7: 996-1003, 1993.
- VEY, M., PILKUHN, S., WILLE, H., NIXON, R., DeARMOND, S.J., SMART, E.J., ANDERSON, R.G.W., TARABOULOS, A. e PRUSINER, S. Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14945-14949, 1996.
- VÖLKEL, D., BLANKENFELDET, W. e SCHOMBURG, D. Large-scale production, purification and refolding of the full-length cellular prion protein from Syrian golden hamster in *Escherichia coli* using the glutathione S-transferase-fusion system. *Eur. J. Biochem.* 251: 462-471, 1998.
- VON DE MARK, K. e KUHL, U. Laminin and its receptor. *Biochem. Biophys. Acta* 823: 147-160, 1985.
- WALZ, R., AMARAL, O.B., ROCKENBACH, I.C., ROESLER, R., IZQUIERDO, I., CAVALHEIRO, E.A., MARTINS, V.R. e BRENTANI, R.R. Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. *Epilepsia* 40:1679-1682, 1999.
- WEISS, S. FAMULOK, M., EDENHOFER, F., WANG, Y-H., JONES, I.M., GROSCHUP, M. e WINNACKER, E-L. Overexpression of active syrian golden hamster prion protein PrP^C as a glutathione S-transferase fusion in heterologous system. *J. Virology* 69: 4776-4783, 1995.
- WELLS, G.A.H. e WILESMITH, J.W. The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. *Brain Pathol.* 5: 91-103, 1995.
- WESTAWAY, D., GOODMAN, P.A., MIRENDA, C.A., McKINLEY, M.P., CARLSON, G.A. e PRUSINER, S.B. Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell* 51: 651-662, 1987.
- WHITTINGTON, M.A., SIDLE, K.C.L., GOWLAND, I., MEADS, J., HILL, A.F., PALMER, M.S., JEFFEYRS, J.G.R. e COLLINGE, J. Rescue of neurophysiological phenotype seen in PrP null mice by transgene encoding human prion protein. *Nat. Genet.* 9: 197-207, 1995.

- WILESMITH, J.W., RYAN, J.B. e ATKINSON, M.J. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet. Rec.* 128:199-203, 1991.
- YAMAGUCHI, H., YAMAZAKI, T., LEMERE, C.A., FROSCH, M.P. e SELKOE, D.J. Beta-amyloid is focally deposited within the outer basement membrane in the amyloid angiopathy of Alzheimer's disease: an immunoelectron microscopic study. *Am. J. Pathol.* 141: 249-259, 1992.
- ZAHN, R., VON SCHROETTER, C. e WÜTHRICH, K. Human prion proteins expressed in *Escherichia coli* and purified by high-affinity column refolding. *FEBS Lett.* 417: 400-404, 1997.
- ZHANG, H., KANEKO, K., NGUYEN, J.T., LIVSHITS, T.L., BALDWIN, M.A., COHEN, F.E., JAMES, T.L. e PRUSINER, S.B. Conformational transitions in peptides containing two putative alpha-helices of the prion protein. *J. Mol. Biol.* 250: 514-526, 1995.

CURRICULUM VITAE

Nome: Adriana Frohlich Mercadante

Local e data de nascimento: São Paulo, SP, 08/11/1972

Educação: Colégio Santa Cruz, São Paulo (1988-1990)

Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo - Bacharelado em Ciências Biológicas (1991-1994).

Faculdade de Educação, Universidade de São Paulo - Licenciatura em Ciências Biológicas (1993-1997)

Instituto de Química, Universidade de São Paulo - Pós Graduação em Bioquímica, Mestrado (1995-1997).

Instituto de Química, Universidade de São Paulo - Pós Graduação em Bioquímica, Doutorado (1997-2000).

Ocupação: Bolsista da FAPESP, DRII (nº processo 97/06832-3), até 03/2000.

Publicações:

MARTINS, V.R.; GRANER, E.; GARCIA-ABREU, J.; SOUZA, S.J.; MERCADANTE, A.F.; VEIGA, S.S.; ZANATA, S.M.; MOURA-NETO, V. e BRENTANI, R.R. Complementary hydropathy identifies a cellular prion protein receptor. *Nat. Med.* 3: 1376-1382, 1997.

GRANER, E., MERCADANTE, A.F., ZANATA, S.M., FORLENZA, O.V., CABRAL, A.L.B., VEIGA, S.S., JULIANO, M.H., ROESLER, R., WALZ, R., MINETTI, A., IZQUIERDO, I., MARTINS, V.R. e BRENTANI, R.R. Cellular Prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Mol. Brain Res.* 76: 85-92, 2000.

ROESLER, R., WALZ, R., MINETTI, A., MARQUES, R., SANABRIA, E.R.G., GRANER, E., MERCADANTE, A.F., ZANATA, S.M., JULIANO, M.H., CAVALHEIRO E.A., MARTINS, V.R., IZQUIERDO, I. e BRENTANI, R.R. Cellular prion protein interaction with laminin is involved in long-term potentiation and memory, submetido, 2000.

GRANER, E., MERCADANTE, A.F., ZANATA, S.M., JAY D.J., MARTINS, V.R. e BRENTANI, R.R. Inactivation of cellular prion protein inhibits laminin-induced cell adhesion, differentiation and promotes neurite retraction, submetido, 2000.

ANEXOS

I) Artigos publicados

II) Artigos submetidos para publicação

I) ARTIGOS PUBLICADOS

Research report

Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis

Edgard Graner ^a, Adriana F. Mercadante ^a, Silvio M. Zanata ^a, Orestes V. Forlenza ^b,
Ana L.B. Cabral ^a, Silvio S. Veiga ^{a,1}, Maria A. Juliano ^c, Rafael Roesler ^d, Roger Walz ^d,
Alejandra Minetti ^d, Ivan Izquierdo ^d, Vilma R. Martins ^e, Ricardo R. Brentani ^{a,*}

^a Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo Branch, Rua Prof. Antônio Prudente 109 / 4A, 01509-010, São Paulo, SP, Brazil

^b Laboratório de Investigações Médicas (LIM-27), Instituto de Psiquiatria, Faculdade de Medicina da USP, Avenida Dr. Arnaldo 455, São Paulo, SP, Brazil

^c INFAR, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^d Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Avenida Ramiro Barcelos 2600, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

^e Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Cancer, Rua Prof. Antônio Prudente 109 / 4A, 01509-010, São Paulo, SP, Brazil

Accepted 23 November 1999

Abstract

Laminin (LN) plays a major role in neuronal differentiation, migration and survival. Here, we show that the cellular prion protein (PrPc) is a saturable, specific, high-affinity receptor for LN. The PrPc–LN interaction is involved in the neuritogenesis induced by NGF plus LN in the PC-12 cell line and the binding site resides in a carboxy-terminal decapeptide from the γ -1 LN chain. Neuritogenesis induced by LN or its γ -1-derived peptide in primary cultures from rat or either wild type or PrP null mice hippocampal neurons, indicated that PrPc is the main cellular receptor for that particular LN domain. These results point out to the importance of the PrPc–LN interaction for the neuronal plasticity mechanism. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Cellular prion protein; Extracellular matrix; Hippocampal neuron; Laminin; Neurite outgrowth; PC-12 cell line

1. Introduction

Laminin (LN), a 800-kDa heterotrimeric glycoprotein made up by two short and one long polypeptide chains, predominantly found in basement membranes has been shown to play a pivotal role in cell proliferation, differentiation, migration and death. Today an ever increasing family of related proteins is called LNs, comprised by differing short and long chains which can associate into distinct heterotrimers [50].

The cellular responses triggered by LN are mediated by its interaction with cell membrane receptors. The best known receptors are themselves heterodimers called integrins. This interaction is highly promiscuous in that the same integrin can bind distinct LNs and vice versa [29]. LN non-integrin receptors have also been described, in

bacteria, like *Staphylococcus aureus* [25], protozoa [6] and in a variety of eukaryotic cells [3,28,29].

In the central nervous system, LN has likewise been shown to mediate neuronal differentiation through its interaction with integrins, characterized by neurite formation and extension [51], to promote migration of neurons both in vitro [23,41] and in vivo [21], to mediate neuronal as well as axonal regeneration [45] and to prevent neuronal death after glutamate analogue injections. Actually, in the latter model, neuronal death ensued after tissue plasminogen activator (tPA) induction, which converts plasminogen into plasmin which consequently degrades LN. The effect was not observed in animals where the tPA genotype has been ablated, nor in wild-type animals in the presence of a tPA inhibitor, but was elicited in the latter by anti-LN antibodies, indicating that neuronal detachment from LN mediated either by its proteolytic degradation or by antibody-mediated steric hindrance was lethal [5]. The nature of the cellular LN receptor however, was not established even though the authors ruled out integrins. We have recently shown that the severity of seizures and the conse-

* Corresponding author. Fax: 55-11-270-7001; e-mail: ludwig0@nodel.com.br

¹ Present address: Universidade do Paraná, Centro Politécnico, Setor de Ciências Biológicas, Curitiba, PA, Brazil.

quent mortality induced by the same glutamate analogue, kainic acid, as well as two other convulsing agents with different action mechanisms was far greater in mice in which the gene coding for the cellular prion protein (PRNP) was ablated than wild-type mice [56].

Recently, a specific binding between LN and the Amyloid Precursor Protein (APP) has been established [32]. Moreover, APP and β -amyloid peptide (1–40) interaction with extracellular matrix promotes neurite outgrowth, suggesting that the complex plays a normal physiological role in the brain [18,20]. APP is the precursor of the amyloid peptide involved in Alzheimer's disease and shares some homology [16] and properties [17] with the prion protein, which is responsible for another type of neurodegenerative disease.

Prions are infectious particles responsible for a group of transmissible spongiform encephalopathies composed by a post-translationally modified isoform (PrP^{Sc}) of the cellular prion protein (PrP^C), a normal cell membrane sialoglycoprotein [38]. Hereditary or spontaneous mutations in the *PRNP* gene can also lead to neurological [37] and possibly, psychiatric disorders [46]. The biological function(s) of the PrP^C, however, still eludes us.

Here, we provide evidence for the capacity of PrP^C to bind LN in a high-affinity, specific, and saturable fashion. Our results also suggest that PrP^C plays a role in neuronal differentiation evidenced by its participation in neurite outgrowth promotion by LN, both in the well established rat pheochromocytoma PC-12 cell line, and in primary cultures of rat hippocampal neurons. Moreover, with the aid of synthetic peptides we demonstrate that PrP^C recognizes a carboxy-terminal domain on the LN γ -1 chain, previously shown to stimulate neurite outgrowth, to modulate electrical activity of neocortical pyramidal neurons and to be highly expressed in rat neocortical and hippocampal neurons [15,22]. Furthermore, comparison of the neuritogenesis induced by LN or its γ -1-derived carboxy-terminal peptide alone, using primary cultures of hippocampal neurons from either wild-type mice or mice in which the *PRNP* gene has been ablated [4] indicate strongly that PrP^C is the main cellular receptor for that particular LN domain.

2. Material and methods

2.1. Binding assays between 125 I-LN and PrP^C

EHS-LN [35] was radiolabeled with Na 125 I (Amersham) as previously described [34] to a specific activity of 2.6×10^6 cpm/ μ g. In binding curve assays, increasing concentrations of 125 I-LN were incubated with 0.2 μ g of heterologous expressed GST-PrP^C fusion protein or GST alone [27], both immobilized on glutathione-Sepharose (Pharmacia), in 0.5 ml of TBS (20 mM Tris, pH 7.4 and 150 mM NaCl). The incubation was carried overnight at 4°C.

After three washes with 1 ml of TBS at room temperature, Sepharose pellets were resuspended and their incorporated radioactivity measured in a 1275 Minigamma counter (LKB-Wallac). Two curves were obtained: a total one that results from the binding between LN and the fusion protein GST-PrP^C, and a non-specific one, which was determined from the binding between LN and GST. Specific binding was obtained by the subtraction of non-specific values from the respective total ones. Data were analyzed by the Scatchard method [47] to determine the equilibrium dissociation constant (K_d).

2.2. Competition assays using synthetic LN peptides

Increasing amounts of synthetic peptides (5.4×10^{-5} to 10.8×10^{-4} M or 30–300 μ g), corresponding to specific LN regions and with established physiological functions (IKVAV, YIGSR and RNIAEIIKDI), were preincubated with 0.2 μ g of GST-PrP^C or GST (as a control), coupled to glutathione-Sepharose for 2 h at 4°C. After that, 1.3×10^{-8} M of 125 I-LN was added, and incubation carried out for another 16 h at 4°C. Radioactivity within the Sepharose pellets was determined by using a gamma counter, after three washes with 1 ml of TBS, at room temperature.

2.3. Neurite outgrowth assays

PC-12 cells were primed with NGF- β (50 ng/ml in DMEM plus 10% FCS, during 5 days), harvested and resuspended in DMEM 2.5% FCS (2×10^4 cells per well) and plated on 24-well tissue culture plates (Costar) coated overnight with 10 μ g/ml EHS-LN solution in PBS at 4°C. After 30 min the medium was changed to DMEM 2.5% FCS containing purified IgG from anti-GST-PrP^C (14 μ g/ml), anti-GST (14 μ g/ml), anti-PrP^C R-340 (7 μ g/ml) (a kind gift from Dr. Charles Weissmann (Neurogenetics Unit, Imperial College School of Medicine at St. Mary's, London, UK), non-immune purified IgG (7 μ g/ml) and cells incubated at 37°C in 5% CO $_2$ for 24 h. The specificity of anti-GST-PrP^C towards non-denatured PrP^C protein was confirmed by immunofluorescence and flow cytometry (not shown). The cells were then fixed with a 3.7% paraformaldehyde and 0.12 M sucrose solution for 15 min, washed three times with PBS and stained with toluidine blue. To determine the effect of the respective antibody treatments on PC-12 neurite outgrowth, each test well was analyzed under 200 $\times$ magnification by phase contrast microscopy (Olympus IMT2-NIC). Sample fields of each well were systematically defined for cell count, corresponding to a diametric scan of 10 microscope fields, ranging from the periphery through the center of each test well. The percentage of cells containing neurites among the total cell count was then calculated. A PC-12 cell neurite was defined as a process with the length equal or greater than the cell body length. Primary rat hippocampal cultures were obtained from embryonic brains

(E17/18), aseptically dissected in Hank's Balanced Salt Solution (Gibco BRL), treated with trypsin (0.5 mg/ml for 15 min at 37°C) and mechanically dissociated. The cell suspension was washed 3 times in a buffer solution containing 10 μ g/ml deoxyribonuclease I (Sigma), heat-inactivated horse serum (Sigma) 10% (v/v), 8 mM MgCl_2 , and 10 mM Hepes buffer (Sigma). Cells were then resuspended in neurobasal medium (Gibco BRL) containing B-27 supplement (Gibco BRL), glutamine (2 mM), penicillin (100 IU), streptomycin (100 μ g/ml), and 5% (v/v) FCS. Primary mouse hippocampal cultures from wild-type mice (crossing between 129/SV and C57BL/6J) and PrP null mice (kind gift from Dr. Charles Weissmann, Neurogenetics Unit, Imperial College School of Medicine at St. Mary's, London, UK) [4] were obtained in a similar way to that used for rat cultures excepted that they were mechanically dissociated in the absence of trypsin and resuspended in neurobasal medium (Gibco BRL) containing B-27 supplement (Gibco BRL), glutamine (2 mM), penicillin (100 IU), streptomycin (100 μ g/ml) without FBS.

Both rat and mouse cultures were plated over glass slides (8-well Lab-Tek chamber slide, Nalge Nunc International) pretreated with 3-aminopropyltrimethoxysilane (APS) as described by Aplin and Hughes [1] with some modifications. Slides were treated briefly with 0.1 M APS for 4 min, washed with PBS and covered with glutaraldehyde 0.25% for 30 min at room temperature. Slides were then washed three times with PBS, incubated overnight at 4°C with 10 μ g/ml LN or 0.2 μ g/ml γ -1 peptide coupled with bovine serum albumin (BSA) as previous described [24] and blocked with BSA 1.5% for 1 h. After three washes with PBS, 2×10^4 cells were plated per well and incubated for 3 h (rat cells) or 12–16 h (mouse cells) at 37°C and 5% CO_2 . Half of the medium was changed by the same medium plus purified IgG from anti-GST or anti-GST-PrPc serum to a final concentration of 14 μ g/ml and incubated for 12 h for rat cells or 48 h for mouse cells. The cells were then fixed and stained as described above. A neurite was defined as a process with a length 4 or more times greater than the respective cell body. The percentage of neurites within the cell count was used to ascertain the effect of treatments on neurite outgrowth. The results represent the average and standard deviations of three independent experiments in which 15 fields per well of triplicate samples were counted.

2.4. Flow cytometry

PC-12 cells growing for 5 days in DMEM plus NGF (50 ng/ml) were incubated with mouse anti-PrPc (serum against recombinant mouse PrPc produced in PrP⁰ mice at 1:200 dilution for 1 h at 4°C. After three washes with PBS, cells were incubated with anti-mouse IgG FITC conjugated at 1:80 dilution for 1 h at 4°C and again washed three times with PBS. Analyses were carried out using a Becton Dickinson FACScan Cytometer with an

argon laser tuned at 488 nm (San Jose, CA). Data acquisition from 10,000 cells was performed with the Consort 32 system, Lysis II software (Becton Dickinson). After setting a live gate, a control gate was established using rabbit non-immune serum. The frequency of PrPc-positive cells was determined by subtracting the percentage of cells staining with control reagents from the percentage staining positively after labeling with anti-PrPc.

2.5. Statistical analysis

Binding experiments were analyzed using Student's *t*-test for paired samples. Neuritogenesis was analyzed using the Mann-Whitney test for unpaired samples. In all comparisons, $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. PrPc is a LN receptor

In order to determine the LN binding capacity of PrPc, we performed binding curves of iodinated LN to both immobilized recombinant GST-PrPc and GST protein alone. Fig. 1 shows a saturable, specific, high-affinity

Fig. 1. PrPc binds LN in a saturable and specific manner. Binding curve of iodinated EHS-LN to PrPc. ^{125}I -LN (0.1 to 2.7×10^{-8} M) was incubated with 0.2 μ g of heterologously expressed GST-PrPc fusion protein (total) or GST alone (non-specific), both immobilized on glutathione-Sepharose. After several washes, the radioactivity of Sepharose pellets was measured in a gamma counter. Non-specific binding ($\bullet$ – $\bullet$) was subtracted from the total binding ($\blacksquare$ – $\blacksquare$) to yield PrPc-specific binding to LN ($\blacktriangle$ – $\blacktriangle$). Data were replotted according to the method of Scatchard, giving a K_d of 2×10^{-8} M (insert).

binding curve with an equilibrium dissociation constant (K_d) equal to 2×10^{-8} M, as determined by a Scatchard plot (Fig. 1, insert). Overlay assays using dot-blotted non-denatured basal membrane proteins confirmed the PrPc–LN binding and its specificity since fibronectin and type IV collagen were unable to bind PrPc (data not shown). The purity and identity of the recombinant protein has been described elsewhere [27]. CD spectroscopy [55] has shown that the PrPc moiety of the recombinant fusion protein displays the same conformation as the native PrPc thus validating its use.

3.2. PrPc mediates LN-induced neuritogenesis

Taking into consideration that APP, another amyloidogenic protein that shares some similarities with PrPc [16,17] and is also related to neurodegeneration, specifically binds LN [32] to promote neurite outgrowth [20], we next investigated the role of PrPc–LN interaction in the neuronal differentiation using the well-known PC-12 cell model. PC-12 cells were isolated many years ago from a rat adrenal pheochromocytoma by their ability to differentiate after at least 1 week of NGF treatment [12]. Since then, most of the studies regarding PC-12 neurite outgrowth on LN include a cell pretreatment with NGF [22,39,48,54]. We observed that neuritogenesis over LN is more efficient when cells are pretreated for 5 days with NGF (data not shown). This treatment leads to a 25% increase in the membrane bound levels of PrPc as determined by flow cytometry with the aid of anti-PrPc antisera (Fig. 2A), which is in agreement with previous observations that NGF increases PrPc mRNA levels [30]. These data suggest that the increment of PrPc at the cell surface increases the amount of a LN ligand which could be important for the phenomenon described above.

Since LN is involved with cell differentiation models [21,23,41,51], in particular with neuritogenesis, we next studied the effect of anti-PrPc antisera on neurite extension induced by LN plus NGF in PC-12 cells [52,53]. As shown in Fig. 2B, a 50–70% inhibition ($p < 0.05$) of neuritogenesis was observed with distinct anti-PrPc antisera (anti-GST–PrPc or R340) in agreement with the results shown above, showing a direct interaction between PrPc and LN. Serum raised against GST present in the recombinant protein and rabbit non-immune IgG did not have any effect on the neuritogenesis process.

3.3. PrPc recognizes a neurite outgrowth promoting peptide in the γ -1 LN chain

LN is a very large molecule and a great number of peptides comprising several domains present in the three polypeptide chains can be generated, some of them having been shown to interact with distinct integrin and non-integrin receptors in a number of experimental models. Three peptides derived from LN are well known to medi-

Fig. 2. Antisera against PrPc protein block PC-12 neuritogenesis over LN. (A) PrPc expression at the surface of PC-12 cells before (b) or after treatment for 5 days with 50 ng/ml NGF (c) was measured using flow cytometry. The fluorescence profiles were compared to the one obtained after incubation with non-immune serum (a) or with anti-PrPc antibody (b and c). Reactions were developed with a conjugated FITC anti-mouse IgG antibody and measured using a Becton Dickinson FACScan cytometer. (B) Effect of antibodies against PrPc on the neuritogenesis induced by EHS–LN on PC-12 cells after 24 h of treatment. LN-dependent neurite extension by PC-12 cells is inhibited by antisera against PrPc. Values represent the average of at least three experiments, horizontal bars represent standard deviations. *, **: Significantly different from the respective controls (Mann–Whitney test for unpaired samples, $p < 0.05$).

ate some of the physiological roles of the entire molecule. IKVAV and RNIAEIIKDI are localized respectively at the α -1 and γ -1 chains and have been extensively demonstrated to be involved with neuritogenesis [22,49]. Interestingly, the neurite outgrowth mediated by APP seems to occur via the IKVAV site of LN [18,20]. YIGSR, from the β -1 chain has been described to inhibit cell adhesion to LN [11] but unable to promote neurite outgrowth [49]. To investigate the PrPc binding site on LN molecule, we performed competition assays using the three peptides described above as competitors of the intact LN in its binding to PrPc. Peptide RNIAEIIKDI (Gamma-1 peptide) was used at molar concentrations 5.4×10^{-5} to 5.4×10^{-4} M (4000–40,000 times higher than LN); IKVAV and YIGSR were added at 10.8×10^{-5} to 10.8×10^{-4} M (8000–80,000 times higher than LN) (Fig. 3). The requirement of large amounts of peptides to inhibit protein bind-

Fig. 3. Inhibition of PrPc-LN binding by LN synthetic peptides. LN peptides, IKVAV (10.8×10^{-4} M or 300 μ g), YIGSR 1 (10.8×10^{-4} M or 300 μ g) or RNIAEIIKDI (5.4×10^{-5} M or 30 μ g) were pre-incubated with 0.2 μ g of GST-PrPc or GST alone, both coupled to glutathione-Sepharose followed by incubation with 1.3×10^{-8} M 125 I-LN. Specific binding between PrPc and LN was considered 100% (control) for each experiment and results expressed as the relative percentage of the binding produced by competition with each peptide. Values represent the average of three experiments, vertical bars represent standard deviations. *, Significantly different from control (Student's *t*-test for paired samples, $p < 0.05$).

ing to specific receptors has been described before [36]. The only tested peptide that was able to inhibit binding was RNIAEIIKDI. The percentage of binding decreased to about 26% at 5.4×10^{-5} M (30 μ g) peptide concentration (Fig. 3) and inhibition was complete with 10.8×10^{-5} M (60 μ g) (data not shown). Our results indicate that RNIAEIIKDI is a binding site for the PrPc-LN interaction. This observation is particularly important because the γ -1 chain is the most conserved in all types of LN [26], suggesting that the PrPc-LN interaction could be important in a variety of tissues where both PrPc and different LN isoforms are expressed.

Fig. 4. Antisera against PrPc protein blocks neuritogenesis from primary neuronal rat cells culture on LN and on the carboxy-terminal peptide from γ -1 LN chain. LN and the carboxy-terminal peptide from γ -1 LN chain mediate neuritogenesis in primary hippocampal cultures from rat cells at similar levels, which is inhibited by anti-GST-PrPc purified IgG and not affected by anti-GST control IgG. Values represent the average of three experiments, horizontal bars represent standard deviations. *, **: Significantly different from control (Mann-Whitney test for unpaired samples, $p < 0.05$).

3.4. PrPc antibodies inhibit neuritogenesis over LN and γ -1 peptide in hippocampal neurons

Since PC-12 is a tumor cell line, it was important to show that PrPc would be equally involved in the LN-dependent neuritogenesis of primary culture of neurons in order to establish the biological relevance of such an interaction. For this purpose, we also examined the effect of anti-PrPc antisera on neurite extension of rat embryo hippocampal neurons in primary culture. It is noteworthy that strong positivity for the γ -1 LN chain peptide in rat hippocampus was recently demonstrated by confocal microscopy [15]. As depicted in Fig. 4, an inhibitory effect (around 50%) could be observed when PrPc protein was blocked with anti-GST-PrPc serum for cells grown on LN. However, when cells were grown on the carboxy-terminal γ -1 LN peptide alone, inhibition by anti-GST-PrPc anti-

Fig. 5. LN and carboxy-terminal peptide from γ -1 LN chain mediate neuritogenesis in primary neuronal culture cells derived from PrP null mice to a lesser extension than that produced in wild-type animals. (a) LN mediates neuritogenesis in primary hippocampal cells derived from wild-type mouse (+/+), which is inhibited by anti-GST-PrPc purified IgG and not affected by anti-GST control IgG. PrP null mice cells (-/-) presented neurite outgrowth on LN to a lesser extension than wild-type cells, which is not abrogated by anti-GST-PrPc purified IgG. Values represent the average of three experiments, horizontal bars represent standard deviations. *, **: Significantly different from control (Mann-Whitney test for unpaired samples, $p < 0.05$). (b) Carboxy-terminal peptide from γ -1 LN chain mediates neuritogenesis in primary hippocampal cultures from wild-type mouse cells (+/+), which is completely inhibited by anti-GST-PrPc purified IgG and not affected by anti-GST control IgG. PrP null mice cells (-/-) failed to produce neurites when plated on γ -1 peptide. Values represent the average of three experiments, horizontal bars represent standard deviations. *, **: Significantly different from control (Mann-Whitney test for unpaired samples, $p < 0.05$).

bodies was significantly higher than that observed on LN (around 80%), indicating that PrPc mediated cell responses towards this peptide.

3.5. Neuritogenesis on carboxy-terminal γ -1 LN peptide is abrogated in PRNP null mice

To further validate the above assumption, we determined the neuritogenesis elicited by either substrate in primary cultures of hippocampal neurons derived both from wild-type (PrP +/+) or PRNP null (PrP -/-) mice. Behavioral parameters of the PrP -/- used in this study were previously described by our group. These animals have normal short- and long-term retention of an inhibitory avoidance task, normal anxiety and exploratory behavior, a slight increase in locomotor activity [42], and seem to be more sensitive in developing epilepsy induced by excitatory drugs [56]. Wild-type neurons responded in a similar fashion as rat neurons, i.e., anti-GST-PrPc antibodies, significantly inhibited (40–50%) neuritogenesis induced by intact LN (Fig. 5a) and almost abolished (85–90%) the one induced by the γ -1 derived peptide alone (Fig. 5b). On the other hand, PrP -/- neurons extended neurites in response to intact LN but this neuritogenesis was significantly lower than that observed for wild-type animals and unaffected by anti-PrPc antibodies (Fig. 5a). Furthermore, PrP -/- neurons were almost completely unable to extend neurites when grown upon the γ -1 LN peptide (Fig. 5b) substantiating our claim that PrPc is the main cellular receptor for this specific domain of the LN molecule.

4. Discussion

4.1. Is PrPc a true LN receptor?

LN is known to be a highly adhesive molecule, binding to a variety of extracellular matrix components including LN itself as well as a number of cell surface molecules. The relatively high-affinity constant (one order of magnitude greater than that reported for integrin binding [36]), and most importantly, the saturable nature of the binding curve, strongly indicate that PrPc might be a true LN receptor. The physiological consequence of the interaction between LN and PrPc was demonstrated in the experiments depicted in Figs. 2, 4 and 5. Neuritogenesis, a hallmark of neuronal in vitro differentiation, is strongly dependent on LN particularly its γ -1 carboxy-terminal domain binding to PrPc, as evidenced when measuring the neuritogenesis elicited by intact LN or its γ -1-derived peptide both from wild-type or PrP -/- mice cells in the presence or absence of anti-PrPc antibodies.

4.2. What is the nature of PrPc's true ligand(s) in the brain?

As shown in Fig. 1, purified PrPc binds LN 1 (α 1, β 1, γ 1) in a specific, high-affinity, and saturable fashion. This

interaction is physiologically important since PC-12, rat and mouse cell neuritogenesis over LN, is inhibited by anti-PrPc antibodies. Moreover, treatment of PC-12 cells with NGF upregulates PrPc mRNA expression [30] and protein levels measured by flow cytometry (our results, Fig. 2a) increasing the neuritogenesis induced by LN alone (data not shown). Since LN-PrPc binding is inhibitable by a peptide known to be carboxy-terminal to the γ -1 LN chain [22], it is conceivable that this domain is the one involved in LN binding by PrPc. As a matter of fact, the experiments shown in Figs. 4 and 5b substantiate this assumption since the addition of anti-PrPc antibody abolished neuritogenesis induced by this peptide alone (both of rat or wild-type mouse hippocampal neurons). Furthermore, hippocampal neurons derived from PrP -/- mice failed to extend neurites in response to this peptide. Four other peptides located in the amino terminal half of γ -1 LN chain have been shown to promote adhesion of several cell lines including PC-12 but failed to promote neurite outgrowth in the latter and thus were not included in the present study [33]. Whereas earlier work indicated the presence of LN only in the walls of brain vasculature [2], work with anti-LN antibodies generated against LN from other sources than the EHS murine tumor, as well as with monoclonal antibodies reactive towards specific domains of diverse LN isoforms, has shown that strong immune reactivity is displayed by hippocampal structures [13,57], in particular corresponding to the α -2 LN chain [14]. At the same time, while the α -2 chain seems present at synaptic buttons and dendrites, both β -1 and mainly γ -1 chains are distributed throughout the entire brain but are concentrated in cellular bodies or proximal extensions. Since both α -1 and α -2 LN chains can associate with the same β and γ LN chains, the results we present here are consistent with the presence of LN 2 in the hippocampus and the reactivity of PC-12 cells and primary hippocampal neurons towards LN 1 in vitro. The distinct distribution and concentration of individual LN chains reported above have been explained before by either assuming that the turnover of individual LN chain differs as shown in other models, or that the α -2 chain might, in the brain, associate itself to hitherto undiscovered short chain molecules [14]. In fact, in recent years new LN α and γ chains have been discovered (adding to the possible complexity of the LN family [8]), but no peptide homologous to the γ -1 peptide described herein can be found in LN γ -2 or γ -3 [19].

4.3. What is the role of PrPc in neuritogenesis?

Our results indicate that PrPc participates in the neurite formation together with other LN ligands, since blocking PrPc with antibodies only partially inhibits the neuritogenesis in LN among normal mouse neurons. On the other hand, the other LN ligands are unable to fully replace PrPc, since the neuritogenesis induced by LN on PrP

–/– derived neurons is statistically smaller than that induced in PrP +/+ derived neurons. PrPc, however, seems to compensate signals elicited by these other LN ligands since neurite outgrowth on LN or γ -1 peptide is similar both in rat and wild-type mice. The results presented here would therefore, seem contradictory to the normal development and behavior of mice from which the *PRNP* gene has been removed [4]. This lack of phenotypic changes upon gene ablation has been found in several other models [7,9,10,31] and can be easily explained by replacement of the missing protein by others in order to fulfill the former's function or by redundancy in the signaling pathways that elicit a given phenotype [43]. Thus, in the PrP –/– mouse, neuritogenesis must entail other LN-independent pathways or perhaps other LN ligands, the effectiveness of which may not be complete since it is known that PrP –/– mice are not totally normal [44]. Moreover, in the context of our findings, they are more sensitive to various convulsing agents [56] including kainic acid, previously shown to act via LN degradation [5].

Further work is required to determine the intracellular signaling pathway triggered by the PrPc–LN interaction responsible for neurite outgrowth. The signal may be generated by PrPc alone or through other interacting membrane protein (like integrins for example). Moreover, two cell-surface PrPc receptors have been described [27,40]. However, the participation of these molecules in the PrPc–LN interaction described here remains to be clarified. The results reported here provide a fuller explanation of the response to excitotoxic drugs and contribute to a better understanding of neuronal differentiation. The role of PrPc–LN interaction involving the carboxy-terminal peptide of the latter's γ -1 chain in more complex neuronal phenotypes and in prion-related disorders remains to be established.

Acknowledgements

We thank Drs. Rafael Linden, Radovan Borojevic (Universidade Federal do Rio de Janeiro) and Luis F.L. Reis (Ludwig Institute for Cancer Research) for critical reading of the manuscript and Regina Nomizo (Fundação Antônio Prudente) for the flow cytometric analyses. This work is partially supported by grants from FAPESP, CNPq and PRONEX. A.F.M., A.L.B.C. and S.M.Z. are supported by FAPESP fellowships.

References

- [1] J.D. Aplin, R.C. Hughes, Protein-derivatized glass coverslips for the study of cell-to-substratum adhesion, *Anal. Biochem.* 113 (1981) 144–148.
- [2] A. Bignami, N.H. Chi, D. Dahl, First appearance of laminin in peripheral nerve, central blood vessels and skeletal muscle of the rat embryo, *J. Dev. Neurosci.* 2 (1984) 367–376.
- [3] G. Bryant, C.N. Rao, M.M. Brentani, V. Martins, J.D. Lopes, S.E. Martin, L.A. Liotta, E. Shiffmann, A role for laminin receptor in leukocyte chemotaxis, *J. Leukocyte Biol.* 42 (1987) 220–227.
- [4] H. Büeller, M. Fischer, Y. Lang, H. Bluethmann, H.-P. Lipp, S.J. DeArmond, S.B. Prusiner, M. Aguet, C. Weissmann, Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein, *Nature* 356 (1992) 577–582.
- [5] Z.-L. Chen, S. Strickland, Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalysed degradation of laminin, *Cell* 91 (1997) 917–925.
- [6] F.F. Costa e Silva, W. De Souza, J.D. Lopes, Presence of laminin-binding proteins in trichomonads and their role in adhesion, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85 (1988) 8042–8046.
- [7] T. Elkins, K. Zinn, L. McAllister, F.M. Hoffmann, C.S. Goodman, Genetic analysis of a *Drosophila* neural cell adhesion molecule: interaction of fasciclin I and Abelson tyrosine kinase mutations, *Cell* 60 (1990) 565–575.
- [8] E. Engvall, U.M. Wewer, Domains of laminin, *J. Cell Biochem.* 61 (1996) 493–501.
- [9] E.L. Ferguson, H.L. Horvitz, The multivulva phenotype of certain *Caenorhabditis elegans* mutants results from defects in two functionally redundant pathways, *Genetics* 123 (1989) 109–121.
- [10] M.G. Goebel, T.D. Petes, Most of the yeast genomic sequences are not essential for cell growth and division, *Cell* 46 (1986) 983–992.
- [11] F. Graf, Y. Iwamoto, M. Sakaki, G.R. Martin, H.K. Kleinman, F.A. Robey, Y. Yamada, Identification of an amino acid sequence in laminin mediating cell attachment, chemotaxis, and receptor binding, *Cell* 48 (1987) 989–996.
- [12] L. Greene, A.S. Tischler, Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which responds to nerve growth factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73 (1976) 2424–2428.
- [13] T. Hagg, D. Muir, E. Engvall, S. Varon, M. Manthorpe, Laminin-like antigen in rats CNS neurons: distribution and changes upon brain injury and nerve growth factor treatment, *Neuron* 3 (6) (1989) 721–732.
- [14] T. Hagg, C. Portera-Cailliau, M. Jucker, E. Engvall, Laminins of the adult mammalian CNS; laminin alpha-2 (merosin-M) chain immunoreactivity is associated with neuronal processes, *Brain Res.* 764 (1997) 17–27.
- [15] G. Hager, H. Pawelzik, G.W. Kreutzberg, W. Zieglgänsberger, A peptide derived from a neurite outgrowth-promoting domain on the γ -1 chain of laminin modulates the electrical properties of neocortical neurons, *Neuroscience* 86 (1998) 1145–1154.
- [16] H. Han, P.H. Whinreb, P.T.J. Lansbury, The core Alzheimer's peptide NAC forms amyloid fibrils which seed and are seeded by amyloid: is NAC a common trigger or target in neurodegenerative disease?, *Chem. Biol.* 2 (1995) 163–169.
- [17] K.K. Hsiao, From prion diseases to Alzheimer's disease, *J. Neural Transm.* 49 (1997) 135–144.
- [18] M.C. Kibbey, M. Jucker, B.S. Weeks, R.L. Neve, E.V. Nostrand, H.K. Kleinman, β Amyloid precursor protein binds to the neurite-promoting IKVAV site of laminin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (1993) 10150–10153.
- [19] M. Koch, P.F. Olson, A. Albus, W. Jin, D.D. Hunter, W.J. Brunken, R.E. Burgeson, M.-F. Champlaud, Characterization and expression of the laminin γ 3 chain: a novel non-basement membrane-associated, laminin chain, *J. Cell Biol.* 145 (1999) 605–617.
- [20] E.H. Koo, L. Park, D.J. Selkoe, Amyloid β -protein as a substrate interacts with extracellular matrix to promote neurite outgrowth, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 190 (1993) 4748–4752.
- [21] P. Liesi, G. Hager, H.U. Dodt, I. Seppälä, W. Zieglgänsberger, Domain-specific antibodies against the B2 chain of laminin inhibit neuronal migration in the neonatal rat cerebellum, *J. Neurosci. Res.* 40 (1995) 199–206.
- [22] P. Liesi, A. Närvänen, J. Soos, H. Sariola, G. Snounou, Identifica-

- tion of a neurite outgrowth-promoting domain of laminin using synthetic peptides, *FEBS Lett.* 224 (1989) 141–148.
- [23] P. Liesi, I. Seppälä, E. Trenkner, Neuronal migration in cerebellar microcultures is inhibited by antibodies against a neurite outgrowth domain of laminin, *J. Neurosci. Res.* 33 (1992) 170–176.
 - [24] F.T. Liu, M. Zinnecker, T. Hamaoka, D. Katz, New procedures for preparation and isolation of conjugates of proteins and a synthetic copolymer of D-aminoacids and immunochemical characterization of such conjugates, *Biochemistry* 18 (1979) 690–697.
 - [25] J.D. Lopes, M. Reis, R.R. Brentani, Presence of laminin receptor in *Staphylococcus Aureus*, *Science* 229 (1985) 275–277.
 - [26] L. Luckenbill-Edds, Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth, *Brain Res. Rev.* 23 (1997) 1–27.
 - [27] V.R. Martins, E. Graner, J. Garcia-Abreu, S.J. de Souza, A.F. Mercadante, S.S. Veiga, S.M. Zanata, V.M. Neto, R.R. Brentani, Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor, *Nat. Med.* 3 (1997) 1376–1382.
 - [28] S. Ménard, V. Castronovo, E. Tagliabue, M.E. Sobel, New insights into metastasis-associated 67 kDa laminin receptor, *J. Cell. Biochem.* 67 (1997) 155–165.
 - [29] A.M. Mercurio, Laminin receptors: achieving specificity through cooperation, *Trends Cell Biol.* 5 (1995) 419–423.
 - [30] W.C. Mobley, R.F. Neve, S.B. Prusiner, M.P. McKinley, Nerve growth factor increases mRNA levels for the prion protein and the β -amyloid protein precursor in developing hamster brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85 (1988) 9811–9815.
 - [31] S. Nagase, K. Shimamune, S. Shumiya, Albumin-deficient rat mutant, *Science* 205 (1979) 590–591.
 - [32] S. Narindrasorasak, D.E. Lowery, R.A. Altman, P.A. Gonzalez-De-Whitt, B.D. Greenberg, R. Kisilevsky, Characterization of high affinity binding between laminin and Alzheimer's disease amyloid precursor proteins, *Lab. Invest.* 67 (1992) 643–652.
 - [33] M. Nomizu, Y. Kuratomi, S.Y. Song, M.L. Ponce, M.P. Hoffman, S.K. Powell, K. Miyoshi, A. Otaka, H.K. Kleinman, Y. Yamada, Identification of cell binding sequences in mouse laminin gamma 1 chain by systematic peptide screening, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 32198–32205.
 - [34] R. Pasqualini, D.F. Chamone, R.R. Brentani, Determination of the putative binding site for fibronectin on platelet glycoprotein IIb–IIIa complex through a hydrophatic complementary approach, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 14566–14570.
 - [35] M. Paullson, M. Aumailley, R. Deutzmann, R. Timpl, K. Beck, J. Engel, Laminin–nidogen complex extraction with chelating agents and structural characterization, *Eur. J. Biochem.* 166 (1987) 11–19.
 - [36] M.D. Pierschbacher, E. Rouslahti, The cell attachment of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule, *Nature* 309 (1984) 30–33.
 - [37] S.B. Prusiner, Genetic and infectious prion diseases, *Arch. Neurol.* 50 (1993) 1129–1153.
 - [38] S.B. Prusiner, K. Hsiao, Human prion diseases, *Ann. Neurol.* 35 (1994) 385–395.
 - [39] B.L. Richard, M. Nomizu, Y. Yamada, H.K. Kleinman, Identification of synthetic peptides derived from laminin $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains with cell type specificity for neurite outgrowth, *Exp. Cell Res.* 228 (1996) 98–105.
 - [40] R. Rieger, F. Edenhofer, C.I. Lasmézas, S. Weiss, The human 37 kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells, *Nat. Med.* 3 (1997) 1383–1393.
 - [41] R.J. Rivas, M.E. Hatten, Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons, *J. Neurosci.* 15 (1995) 981–989.
 - [42] R. Roesler, R. Walz, J. Quevedo, F. de-Paris, S.M. Zanata, E. Graner, I. Izquierdo, V.R. Martins, R.R. Brentani, Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrPc, *Mol. Brain Res.* 71 (1999) 349–353.
 - [43] A. Routenberg, Knockout mouse fault lines, *Nature* 374 (1995) 314–315.
 - [44] S. Sakagushi, S. Katamine, N. Nishida, R. Moriuchi, K. Shigematsu, T. Sugimoto, A. Nakatani, Y. Kataoka, T. Houtani, S. Shirabe, H. Okada, S. Hasegawa, T. Miyamoto, T. Noda, Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene, *Nature* 380 (1996) 528–531.
 - [45] V. Salonen, J. Peltonen, M. Röttä, I. Virtanen, Laminin in traumatized peripheral nerve: basement membrane changes during degeneration and regeneration, *J. Neurocytol.* 16 (1997) 713–720.
 - [46] H.B. Samaia, J.J. Mari, H.P. Vallada, R.P. Moura, A.T.G. Simpson, R.R. Brentani, A prion-linked psychiatric disorder, *Nature* 390 (1997) 241.
 - [47] G. Scatchard, The attraction of proteins for small molecules and ions, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51 (1949) 660–672.
 - [48] G.C. Sephel, K.-I. Tashiro, M. Sasaki, D. Greatorex, G.R. Martin, Y. Yamada, H.K. Kleinman, Laminin A chain synthetic peptide which supports neurite outgrowth, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162 (1989) 821–829.
 - [49] K.I. Tashiro, G.C. Sephel, B. Weeks, M. Sasaki, G.R. Martin, H.K.L. Kleinman, A synthetic peptide containing the IKVAV sequence from the A chain of laminin mediates cell attachment, migration, and neurite outgrowth, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 16174–16182.
 - [50] R. Timpl, J. Brown, The laminins, *Matrix Biol.* 14 (1994) 275–281.
 - [51] K.J. Tomaselli, L.F. Reichardt, Peripheral motoneuron interactions with laminin and Schwann cell-derived neurite-promoting molecules: developmental regulation of laminin receptor function, *J. Neurosci. Res.* 21 (1988) 275–285.
 - [52] K.J. Tomaselli, C.H. Damsky, L.F. Reichardt, Interactions of neuronal cell line (PC-12) with LN, collagen IV and fibronectin: identification of integrin-related glycoproteins involved in attachment and process outgrowth, *J. Cell. Biol.* 105 (1987) 2358.
 - [53] D.C. Turner, L.A. Flier, S. Carbonetto, Identification of a cell-surface protein involved in PC-12 cell-substratum adhesion and neurite outgrowth on LN and collagen, *J. Neurosci.* 9 (1989) 3287–3296.
 - [54] D.C. Turner, L.A. Flier, S. Carbonetto, Magnesium-dependent attachment and neurite outgrowth by PC-12 cells on collagen and LN substrata, *Dev. Biol.* 121 (1987) 510–525.
 - [55] D. Völkel, W. Blankenfeldt, D. Schomburg, Large-scale production, purification and refolding of the full-length cellular prion protein from Syrian golden hamster in *Escherichia coli* using the glutathione *S*-transferase-fusion system, *Eur. J. Biochem.* 25 (1998) 462–471.
 - [56] R. Walz, O.B. Amaral, T.C. Rockenbach, R. Roesler, I. Izquierdo, E.A. Cavalheiro, V.R. Martins, R.R. Brentani, Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein, *Epilepsia* 40 (12) (1999) 1679–1682.
 - [57] T. Yamamoto, Y. Iwasaki, H. Yamamoto, H. Konno, M. Isemura, Intraneuronal laminin-like molecule in the central nervous system: demonstration of its unique differential distribution, *J. Neurol. Sci.* 84 (1988) 1–13.

Complementary hydropathy identifies a cellular prion protein receptor

VILMA R. MARTINS^{1,*}, EDGARD GRANER^{2,*}, JOSÉ GARCIA-ABREU³, SANDRO J. DE SOUZA²,
ADRIANA F. MERCADANTE², SILVIO S. VEIGA², SILVIO M. ZANATA¹,
VIVALDO MOURA NETO¹ & RICARDO R. BRENTANI²

¹Fundação Antônio Prudente and ²Ludwig Institute for Cancer Research, Rua Prof. Antônio Prudente,
109/4A, 01509-010, São Paulo, SP, Brazil

³Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Anatomia, Centro de Ciências da Saúde,
Bloco F, Ilha do Fundão, UFRJ 21949-900, Rio de Janeiro, Brazil

S.J.d.S. present address: Biological Laboratories, Harvard University, Cambridge, Massachusetts 02138, USA

*These authors contributed equally to this work.

Correspondence should be addressed to R.R.B.

Prions, the etiological agents for infectious degenerative encephalopathies, act by entering the cell and inducing conformational changes in PrP^c (a normal cell membrane sialoglycoprotein), which result in cell death. A specific cell-surface receptor to mediate PrP^c and prion endocytosis has been predicted. Complementary hydropathy let us generate a hypothetical peptide mimicking the receptor binding site. Antibodies raised against this peptide stain the surface of mouse neurons and recognize a 66-kDa membrane protein that binds PrP^c both *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, both the complementary prion peptide and antiserum against it inhibit the toxicity of a prion-derived peptide toward neuronal cells in culture. Such reagents might therefore have therapeutic applications.

Prions have long been known as the causative agents for a group of diseases named spongiform encephalopathies, which are infections in livestock and humans but also inheritable in the latter¹. Their composition, which is devoid of nucleic acid, has since been firmly established as consisting of a single protein termed PrP^{Sc} (ref. 2, 3). It has been shown that there are no amino acid sequence differences between PrP^{Sc} and the normal counterpart PrP^c, a normal cell membrane sialoglycoprotein⁴. The only relevant difference observed between PrP^{Sc} and PrP^c concerns their secondary structures, the former displaying a much higher proportion of β -sheet conformational domains than the latter, which is mostly α -helical⁵.

The pathological aggregate form of the prion protein, PrP^{Sc}, is generated from the normal cellular isoform by a process that occurs after translation and probably in endosomes⁶. Studies with knockout mice in which the *PrP^c* gene was deleted showed that its expression is indispensable for disease manifestation pursuant to prion infection⁷.

The cell-surface form of the prion protein, PrP^c, is anchored to the plasma membrane by a glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) moiety. Conflicting data showed that its internalization is mediated either by clathrin-coated pits⁸ or by caveolae-like membranous domains⁹. However, both pathways seem to require a third protein (a receptor or a prion binding protein) either to make the connection between the GPI-anchored molecule to clathrin⁸ or to convert PrP^c into PrP^{Sc} (ref. 9, 10).

Among the distinct domains of the prion protein that can adopt a β -sheet conformation, one peptide consisting of residues 106 to 126 of the human prion protein reproduces, in cultured cells, all the pathological effects of intact prion¹¹. A shorter human prion-derived peptide, 106–114 was found not to be neu-

rotoxic¹¹. It is interesting to note that the neurotoxic region in human prion (residues 106–126) corresponds in the larger chicken molecule to a region that is critical for its internalization (residues 117–135)¹². Moreover, this region is the most conserved among species¹³. We speculated that the basis for this selective neurotoxicity was because prion peptide 106–126 contains the binding site recognized by the putative cell receptor and thus is the only one capable of entering the cell.

We sought to identify the cellular prion protein receptor by exploiting complementary hydropathy. This concept stipulates that peptides encoded by complementary DNA strands bind one another^{14,15}. More than forty examples of ligand characterization based on complementary hydropathy have been reported in the literature¹⁶, and we ourselves have demonstrated such interactions between fibronectin and two of its integrin receptors^{17,18}, as well as between collagen and collagenase¹⁹.

The peptide encoded by the DNA strand complementary to that of the *PrP* gene containing the neurotoxic and internalization signals was deduced (HVATKAPHHGPCRSSA), chemically synthesized and used to immunize mice. Immunofluorescence and confocal microscopy approaches showed that a mouse antiserum raised against this theoretical peptide recognizes an antigen in primary neuron cultures, which is localized at the cell membrane. Western blots of membrane extracts from mouse brain showed that this antiserum recognizes a specific protein of 66 kDa. *In vitro* overlay assays showed that PrP^c and the protein recognized by serum against complementary prion peptide (the putative prion protein receptor) could bind one another. *In vivo* experiments using flow cytometry showed that membrane extracts inhibited recognition of cellular PrP^c in cultured neuroblastoma cells (N2a) by anti-PrP antiserum. This in-

inhibition could be reversed by pretreating such membrane extracts with anti-complementary prion peptide antiserum. Moreover, both the complementary prion peptide and the serum raised against it are able to block *in vivo* the neurotoxic effects mediated by the human prion peptide 106–126.

These results strongly suggest the existence of a specific receptor for prion proteins that could be responsible for their internalization and for the cellular responses mediated by PrP^C.

Complementary prion peptide antiserum reactivity

By using prion nucleotide sequence data¹, the peptide (HVATKAPHHGPCRSSA) encoded by the complementary DNA strand from the human prion gene (Fig. 1), spanning residues 114 to 129, was chemically synthesized, coupled to keyhole limpet hemocyanin and used to immunize mice¹⁷. The resulting antibodies reacted with all mouse neurons (Fig. 2c). This binding activity is consistent with recognition of a PrP receptor protein that should be neuronally expressed. Neuronal identity of labeled cells was verified by staining with anti- β -tubulin III antibody (Fig. 2b). The localization of this putative receptor was investigated by confocal microscopy, which demonstrated antibody binding to the cell membrane (Fig. 2, f–h). When complementary prion peptide is incubated with its antiserum, the reaction is almost completely inhibited (2j), indicating its specificity. Moreover, nonimmune serum did not show any reactivity (2i). Cytoplasmic staining was observed when cells were permeabilized (Fig. 3b), suggesting that the protein recognized by anti-complementary prion peptide antiserum can be found both in the membrane and in the cytoplasm.

A membrane 66-kDa protein binds PrP^C *in vitro*

To further identify the receptor and confirm its cellular localization, we performed western blots of the membrane fraction, as well as of total cell extracts from mouse brain, using the anti-complementary prion peptide antiserum. In the purified membrane fraction, the purity of which was confirmed by transmission electron microscopy (data not shown), a signal corresponding to a molecule of 66 kDa was recognized (Fig. 4a, lane 2). A signal was also detected corresponding to a molecule

Fig. 1 Deducing a prion-binding peptide by complementary hydropathy. The nucleic acid sequences represent the human prion region spanning amino acid residues 114 to 129 and its complementary sequence. The complementary peptide was synthesized and used to produce the antibodies used in these studies (a). Hydropathy plots of both the neurotoxic and the complementary peptide (b).

of 60 kDa in total brain extracts (Fig. 4b, lane 2) corroborating the localization suggested by confocal microscopy. Therefore, the membrane-associated form of the receptor molecule had a higher molecular weight (66 kDa) than that detectable in total extracts. Moreover, the putative receptor was also detectable in the cytoplasmic fraction (data not shown). In this case, the apparent molecular weight of the protein is the same as that found in total extracts (60 kDa). These results suggest that two forms of the protein are present in mouse brain cells. The membrane form is less abundant and is therefore detected only when purified fractions are analyzed. Densitometric scans of the western blots from both fractions, exposed for the same time and corrected by the protein concentration of the respective cell fractions, indicate that 6% of the putative receptor is present in the membrane. The major signal observed in total extracts is probably derived from the predominant form found in cytoplasmic fractions. Nonimmune mouse serum does not recognize molecules of these sizes in membrane and total extracts from mouse brain (Fig. 4, a and b, lanes 1, respectively).

In order to establish that the receptor is functional, it was crucial to show that the putative prion protein receptor was able to bind to PrP^C. For this purpose, we determined its capacity to bind to recombinant PrP^C. Binding of recombinant GST–PrP^C (glutathione S-transferase–PrP^C) fusion protein, labeled with ¹²⁵I, to a mouse brain membrane fraction after electrophoretic separation is shown in Fig. 4a, lane 3. PrP^C bound to several prominent bands of 100–110 kDa, 40 kDa and 66 kDa, the latter aligning with a band reactive with our antiserum (Fig. 4a, lane 2). The binding observed is specific for PrP^C, as no reaction was observed when ¹²⁵I-labeled GST was used (Fig. 4, a and b, lanes 4). Recombinant PrP^C was not able to bind to total cell extracts (Fig. 4b, lane 3) under the same experimental conditions. However, incubating the membrane fraction with electrophoretically separated recombinant GST–PrP^C and developing with anti-complementary prion peptide antiserum revealed reactivity with a band displaying the mobility expected for the fusion protein (Fig. 4c, lane 7). A very low reactivity could be detected under the same experimental conditions by incubating the fusion protein with total cell extracts (Fig. 4c, lane 8). Only after prolonged exposure was binding to this fraction detected (data not shown). This could be explained by increased dilution of the active receptor in this fraction as compared with the membrane, or by a decreased affinity for PrP^C of the lower molecular weight isoform. Control reactions showed that the fusion protein GST–PrP^C was recognized by prion antiserum³⁰ (Fig. 4c, lane 4), whereas no reactivity was observed with GST (Fig. 4c, lane 3). Anti-complementary prion peptide antiserum (Fig. 4c, lane 6) or mouse nonimmune serum (Fig. 4c, lane 5) did not recognize immobilized GST–PrP^C when the nitrocellulose membranes were exposed for the same time as in the overlay experiments (Fig. 4c, lanes 7 and 8).

To show that cellular PrP^C behaved similarly to the recombinant protein, we fractionated total cellular extracts with am-

Fig. 2 Indirect immunofluorescence of rat hippocampal neurons. Phase-contrast microscopy (horizontal scale bar, 50 μ m) (a); neuronal cells from the hippocampus of 18-day-old rat embryos yield a positive indirect immunofluorescence image by reaction with anti- β tubulin III antibody (b); positive indirect immunofluorescence of neurons with anti-complementary prion peptide antiserum (c); confocal microscopy of a preparation identical to that shown in c (f-h). Complementary prion peptide was incubated with its anti-serum and reacted with neurons (j), phase contrast of the cells was included (e). i, Negative controls where the cells were reacted with mouse nonimmune serum and the respective phase contrast (d). Confocal analysis were performed using a LSM 310 Zeiss laser microscope (horizontal scale bar, 25 μ m).

The membrane 66-kDa protein binds PrP^C *in vivo*

To demonstrate that the 66-kDa protein in its native form is able to bind cellular PrP^C we performed flow cytometric analyses of cultured neuroblastoma cells (N2a). Figure 5b shows strong positivity (94% of the cells) when such cells are incubated with anti-PrP antiserum. When the cells are preincubated with a purified membrane fraction prepared from mouse brain before they react with anti-PrP antiserum, a strong inhibition of the signal (57% positivity) is observed (Fig. 5c), indicating that there is a component in this fraction that binds to PrP^C, precluding its recognition by the antiserum. The effect was not due to competition with PrP^C present in the membrane fraction for the anti-PrP^C antiserum, as higher concentrations of the latter antiserum did not revert signal inhibition (data not shown). If, however, this membrane fraction is itself preincubated with anti-complementary prion peptide antiserum (Fig. 5d), fluorescence intensity is mostly restored (92% positivity), suggesting that the membrane component that binds to PrP^C is the receptor recognized by our anti-complementary prion peptide antiserum. This result provides further corroboration that membrane inhibition is not attributable to its own PrP^C content.

Blocking prion 106–126 neurotoxicity

To further verify the functional role of the 66-kDa receptor, it was necessary to show that its interaction with intact PrP^C or with prion-derived fragments would be biologically relevant. For this purpose we studied the effects of both our complementary peptide and the antiserum raised against it on the neurotoxicity of the prion peptide 106–126. Figure 6a shows that both reagents, while inert by themselves, were equally effective in reducing toxicity of this peptide toward cultured rat hippocampal neurons. Thus, although about 70–80% of the neurons were killed following incubation with the neurotoxic peptide alone or in the presence of preimmune serum, preincubation with the anti-complementary prion peptide antiserum significantly reduced neurotoxicity to about 44% ($P = 0.0128$). Likewise, whereas the complementary prion peptide itself was devoid of toxicity toward neurons, its preincubation with the neurotoxic peptide before exposure to neurons, significantly reduced the latter's toxicity to about 38% ($P = 0.0123$). Dimethyl sulfoxide (DMSO), used to help solubilize the neurotoxic peptide, did not exhibit significant toxicity. A dose-response curve is represented in Fig. 6b. The prion 106–126 peptide neurotoxicity is inhibited by complementary prion peptide in a almost linear, dose-dependent manner. When their ratio was 1:1.5, respectively, neurotoxicity was completely blocked, since there is no difference ($P < 0.05$) between this treatment and DMSO alone. The results indicate

monium sulfate. The fraction precipitated between 45 and 55% saturation contained both forms of the protein (Fig. 4d, lane 2), which reacts with the mouse antiserum against the complementary prion peptide but does not contain PrP^C protein (Fig. 4d, lanes 2 and 1, respectively). The fraction precipitated with 30% ammonium sulfate saturation, however, contains PrP^C isoforms characterized as such by their reactivity toward an anti-prion rabbit antiserum²⁰ (Fig. 4d, lane 5). This fraction does not contain material reactive with the mouse anti-complementary prion peptide antiserum (Fig. 4d, lane 4). When the 30% fraction is incubated with electrophoretically separated proteins from the 55% fraction, reactivity toward rabbit anti-prion antiserum is detectable (Fig. 4d, lane 3) in the 66-kDa region, indicating that PrP^C binds to the heavier form of the putative prion protein receptor predominantly localized at the cell membrane. It is also clear that the rabbit anti-prion antiserum does not recognize material in the 30- to 33-kDa region, because, as shown in lane 1, the 55% fraction does not contain PrP^C.

Fig. 3 Indirect immunofluorescence of permeabilized rat hippocampal neurons. Phase-contrast microscopy (horizontal scale bars, 25 μ m) (a), cells fixed with paraformaldehyde were permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS and incubated with anti-complementary prion peptide antiserum (1:100, vol/vol) (b). Insets a' and b' represent a phase-contrast image and a reaction with anti-complementary prion peptide antiserum of a single cell, respectively (horizontal scale bars, 10 μ m). Confocal analyses were performed using a LSM 310 Zeiss laser microscope.

that competition of the interaction between the neurotoxic peptide and the putative receptor binding site blocks the neurotoxic effect of the prion peptide 106–126. Moreover, they suggest that the binding constants of the complementary prion peptide and of the putative receptor are within the same order of magnitude.

Discussion

Complementary hydropathy predicts the PrP receptor binding site. In the present report we have used this concept in an operational sense, that is purely to derive a peptide that, according to theory, should bind to the neurotoxic domain of prion. No claim is being made herein as to the genomic localization of the candidate gene for the putative prion protein receptor, despite the fact that an open reading frame has been reported to exist on the complementary strand of the prion gene²¹. Indeed, as depicted in Fig. 1, a peptide can be thus deduced, which in-

deed displays a hydropathic profile, which is in fact complementary to that of the neurotoxic peptide.

A 66-kDa prion protein receptor mediates neurotoxicity.

Antisera generated against the complementary prion peptide do recognize a neuronal antigen, localized at the cell membrane as indicated by indirect immunofluorescence and confocal microscopy (Figs. 2 and 3). Further substantiation of the cellular localization is provided by the experiments shown in Fig. 4, which depict western blots of total brain extracts and purified membrane fractions therefrom, identified by using the same antisera. The membrane form of the protein binds to PrP^C *in vitro* and *in vivo*, establishing that these molecules are able to interact. It is noteworthy that the membrane isoform is slightly larger than that recovered from cytoplasmic extracts, indicating some form of intracellular processing, similar to what occurs with PrP^C after entry in the endosome, leading to a reduction in its molecular

Fig. 4 The protein recognized by anti-complementary prion peptide antiserum binds recombinant and cellular PrP^C. Mouse brain membrane, 400 μ g (a) or total extracts, 600 μ g (b) were electrophoretically separated. Western blots using nonimmune serum (lane 1) or anti-complementary prion peptide antiserum (lane 2) were performed. Lanes 3 and 4 were overlaid with iodinated GST–PrP^C fusion protein or GST, respectively, and autoradiographed. c, Proteins (5 μ g) expressed in heterologous system, GST (lanes 1 and 3) or GST–PrP^C (lanes 2, 4–8) were electrophoretically separated, dyed with Ponceau S (1 and 2) or reacted with anti-prion serum (3

and 4), mouse nonimmune serum (5) or anti-complementary prion peptide antiserum (6). Lanes 7 and 8 were overlaid with membrane and total extracts, respectively, and then reacted with anti-complementary prion peptide antiserum. d, Ammonium sulfate fractions at 45–55% (1, 2 and 3) or 30% (4 and 5) saturation were reacted with anti-prion serum (1 and 5) or anti-complementary prion peptide serum (2 and 4). The electrophoretically separated 45–55% fraction was overlaid with a solution containing the 30% fraction followed by a reaction with anti-prion antiserum. Experiments were developed using enhanced chemiluminescence.

Fig. 5 PrP^C binding to the 66-kDa receptor *in vivo*. PrP^C expression at the surface of N2a cells was measured using flow cytometry. The fluorescence profile is compared when cells were incubated with *a*, rabbit nonimmune serum; *b*, anti-PrP antibody; *c*, purified membrane fraction from mouse brain followed by anti-PrP^C antibody; or *d*, purified membrane fraction pretreated with anti-complementary prion peptide antiserum followed by anti-PrP^C antibody. Reactions were developed with anti-rabbit antiserum FITC-conjugated and measured using a Becton Dickinson FACScan cytometer.

weight²². Whether the proposed intracellular receptor processing is relevant for its ability to bind PrP^C or not is unknown.

As reported in the literature^{10,21} and indeed as shown in Fig 4*a*, several proteins bind to PrP^C. Some of these have not been shown to be integral membrane components^{10,21} and thus could not constitute a true receptor. Nonetheless, in order to substantiate our claim that the molecule we have described herein is indeed a receptor for prion proteins, it was important to show some biological consequence of its interaction with PrP^C. Since the physiological role of PrP^C is still unclear, we decide to explore the neurotoxic effect of human prion peptide 106–126. If as we claimed, such a peptide would be neurotoxic because it contained the binding site for the receptor, allowing its internalization, then both the complementary peptide, by binding to it in solution, as well as the antiserum raised against the latter peptide, by binding to the cellular receptor, should inhibit its neurotoxicity. That this is indeed the case is depicted in Fig. 6. Thus we are presenting evidence for the existence of a cell-surface receptor for PrP^C that seems to be involved in the neurotoxicity of a prion-derived peptide.

PrP receptor: normal cellular function and prion infection. Further work is required to establish the physiological consequences of PrP^C docking to the receptor. It is possible that the role of the receptor is to allow internalization of PrP^C (ref. 12), as well as prion, aiding the latter in promoting the structural modifications of the former, which lead to accumulation and disease²⁴. It is, however, also tempting to speculate that, since PrP^C tends to accumulate in postsynaptic vesicles²⁵, both PrP^C and its receptor participate in heterophilic interneuronal cell adhesion leading to neuronal networking.

It is noteworthy that glycosaminoglycans (GAGs) have been shown to play a role in the internalization of recombinant

chicken PrP^C by N2a neuroblastoma cells in culture, but despite this finding, the major role of a cell-surface receptor of proteic nature remained undisputed since GAGs were found to account for at most 50% of internalized PrP^C (ref. 26).

Today, the diseases known as prion-related are basically disorders of PrP^C catabolism, because the mutated isoforms are protease resistant and tend to deposit in the cytoplasm. It is not clear, at the present date, how the mutated isoforms, which are also expressed at the cell membrane level, affect PrP^C function, but it is possible to envisage that defects in receptor expression will likewise alter PrP^C function.

Methods

Peptide and mice immunization. The peptide (HVATKAPHHGPCRSSA) encoded by the complementary DNA strand of the human prion gene, corre-

Fig. 6 Inhibition of PrP^C 106–126 neurotoxicity. *a*, The effect of the complementary peptide and the antiserum against it on the toxicity of prion 106–126 on rat hippocampal neurons in culture. Prion 106–126 and complementary prion peptide ratio is 1:1. *b*, Dose-response analysis of death

in cells incubated with 80 μ M of prion 106–126 alone or together with 40, 80, 104 and 120 μ M (1:0, 1:0.5, 1:1.3 and 1:1.5, respectively) of the complementary prion peptide. Experiments were performed in triplicate; scale bars, s.d. **P* < 0.05.

sponding to residues 114–129, was chemically synthesized by Neosystems (Strasbourg, France), coupled to keyhole limpet hemocyanin and used to immunize mice as previously described¹⁷.

Primary neuronal culture and indirect immunofluorescence microscopy. Rat neuronal cells prepared as previously described¹⁸ were placed onto 10-mm diameter glass coverslips previously coated with polyornithine (Sigma, 41 kDa, 1.5 µg/ml) in a mixture of DMEM-F12 (1:1, both from Gibco BRL, Gaithersburg, MD) complemented with glucose, glutamine, sodium bicarbonate and 10% fetal calf serum as reported¹⁸. After 24 h, extensive development of neurons could be seen. The mouse antiserum raised against the complementary prion peptide (HVATKAPHHGCRSSA) was added to the medium (1:100, vol/vol) alone or associated with 80 mM of the complementary prion peptide for binding to living cells¹⁹. Mouse nonimmune serum (1:100, vol/vol) was used as a negative control. After 1 h of incubation, excess antiserum was removed, and cells were fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer pH 7.6 for 30 min. In parallel experiments cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS and incubated overnight with a monoclonal anti-β-Tubulin III (Sigma) antibody diluted 1:100 or with antiserum raised against the complementary prion peptide. Both groups were incubated with FITC-labeled secondary antibodies for 2 h. Coverslips were mounted in glycerol-propylgallate/PBS (9:1, vol/vol). Observations were made on a Zeiss Axioplan microscope with epifluorescence attached (Jena, Germany). Confocal analysis were performed using a Zeiss laser microscope (LSM 310).

Western blot analyses of total mouse brain extract, ammonium sulfate fractions and purified membrane. The total extract was obtained after brain homogenization in 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.2% sodium deoxycholate, 0.5% Triton X-100, 1 mM aprotinin, 1 mM leupeptin, 1 mM PMSF and 1 mM benzamide and centrifugation at 12,000g for 30 min. For some experiments this material was submitted to successive precipitations at 30%, 45% and 55% ammonium sulfate saturation. The membrane extract was prepared as previously described¹⁰ with some modifications. Briefly, brains were homogenized in 10 mM HEPES pH 7.4, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM aprotinin, 1 mM leupeptin, 1 mM PMSF and 1 mM benzamide and centrifuged at 600g for 15 min. The supernatant was further diluted 5 times with the same buffer plus 0.7 mM EDTA and centrifuged over a 0.3 M sucrose cushion at 825g for 15 min. The pellet was resuspended in 1.38 M sucrose and centrifuged under a 0.3 M sucrose solution at 105,000g for 1 h. The interface was collected and suspended in 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 120 mM NaCl, 1 mM leupeptin, 1 mM PMSF, 1 mM aprotinin and 1 mM benzamide. Samples were resolved by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Blots were exposed to anti-complementary prion peptide antibody (1:300) or anti-prion rabbit serum (for which the authors are deeply indebted to Albert Taraboulos, Hadassah Medical School, Jerusalem, and Stanley Prusiner, University of California at San Francisco) for 3 h at room temperature washed 3 times with TBST (40 mM Tris pH 7.4, 120 mM NaCl and 0.05% Tween 20) followed respectively by anti-mouse or anti-rabbit peroxidase. Reactions were developed using enhanced chemiluminescence (Amersham Corp., Arlington Heights, IL), and X-ray films were exposed to the blots.

Prion expression in an heterologous system. A 646-bp DNA fragment containing nucleotides coding for amino acids 23 to 238 of the mouse PrP^C protein was amplified by PCR from mouse brain DNA. The fragment was cloned in *Bam*HI-*Eco*RI restriction sites of pGEX-4T-3 (ref. 31), which was transformed and amplified in *Escherichia coli* DH5α. Expression, purification and elution of the fusion protein were performed as previously described¹⁷. Characterization of the fusion protein was done by western blotting using a specific anti-prion antiserum¹⁰.

Overlay assays. The assay using fusion protein expressed in heterologous system was performed after its separation in SDS-PAGE and immobilization in nitrocellulose membranes. Blots were incubated with total brain extracts and membrane fraction overnight at 4 °C. After three washes with TBST, nitrocellulose membranes were reacted with anti-complementary prion peptide antiserum or mouse nonimmune serum for 3 h at room temperature. Reactions were developed using anti-mouse peroxidase and enhanced chemiluminescence (Amersham Corp.). The heterologous expressed pro-

teins glutathione S-transferase (GST) and fusion protein GST-PrP^C were radiolabeled with Na¹²⁵I (ref. 19) to a specific activity of 6.9 × 10⁵ c.p.m./µg. Membrane and total extracts were resolved in SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and reacted with 0.8 × 10⁵ c.p.m. of GST or GST-PrP^C overnight at 4 °C. After 5 washes with TBST at room temperature X-ray films were exposed to the blots. Overlay with ammonium sulfate fractions was made by incubating the solubilized 30% fraction (20 mM Tris pH 7.4, 120 mM NaCl, 0.05% Tween) on blots from the 45–55% fraction previously submitted to SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membranes were exposed to anti-prion serum¹⁰ followed by anti-rabbit peroxidase and developed using enhanced chemiluminescence (Amersham Corp.).

Flow cytometric analysis. Neuroblastoma cells (N2a) were incubated for 1 h at 4 °C with anti-PrP^C antibody R340 (kindly provided by Charles Weissmann, Institute für Molekularbiologie I, Universität Zürich) at 1:200 dilution in the absence or presence of 300 µg of purified membrane fraction from mouse brain or 300 µg of the membrane fraction, which was preincubated for 1 h at 4 °C with anti-complementary prion peptide antiserum at 1:50 dilution. After 3 washes with PBS cells were incubated with anti-rabbit FITC conjugated at 1:80 dilution for 1 h at 4 °C and washed again for 3 times with PBS. Analysis were carried out using a Becton Dickinson FACScan cytometer with a argon laser tuned at 488 nm (San Jose, CA). Data acquisition from 10,000 cells was performed with Consort 32 system, Lysis II software (Becton Dickinson). After setting a live gate, a control gate was established using rabbit nonimmune serum. The frequency of PrP^C-positive cells was determined by subtracting the percentage of cells staining with control reagents from the percentage staining positively after labeling with anti-PrP^C.

Neuronal culture treatment with peptides and antibody. Hippocampal neurons from 18-day-old rat fetus were grown in basal Eagle's medium (BME) enriched with 30 mM glucose, 3 mM glutamine and 30 mM sodium bicarbonate. Approximately 5 × 10⁵ cells were plated in 16-mm diameter glass coverslips previously coated with 1.5 µg/ml polyornithine (Sigma). Cells were maintained in BME supplemented with 2 mM glutamine and 10% fetal calf serum at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. After 4 days, proliferation of nonneuronal cells was inhibited with 10⁻⁵ M arabinosyl cytoside. Prion 106–126 peptide was used to a final concentration of 80 µM (0.8% DMSO) alone or associated to 40, 80, 104 and 120 µM of the complementary prion peptide (in 10 mM HEPES pH 7.4). Prion 106–126 peptide (80 µM) was also associated to anti-complementary prion peptide antiserum or mouse nonimmune serum (1:100, vol/vol). All these treatments were added to the culture on days 1, 3, 5 and 7. On day 8, cell viability was determined with 0.4% trypan blue in PBS. Cell death was measured in triplicates and the results shown are the average of three separated experiments.

Acknowledgments

We thank Andrew Simpson for helpful suggestions and critical reading of the manuscript and Regina Nomizo from Fundação Antonio Prudente for the flow cytometric analyses. A.F.M., S.J.d.S. and S.M.Z. are supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and S.S.V. is supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

RECEIVED 23 JUNE; ACCEPTED 15 SEPTEMBER 1997

1. Prusiner, S.B. Genetic and infectious prion diseases. *Arch. Neurol.* **50**, 1129–1153 (1993).
2. Prusiner, S.B. Molecular biology of prion diseases. *Science* **252**, 1515–1522 (1991).
3. Weissman, C. Molecular biology of prion diseases. *Trends Cell Biol.* **4**, 10–14 (1994).
4. Baster, K. et al. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* **46**, 417–428 (1986).
5. Pan, K.-M. et al. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10962–10966 (1993).
6. Borchelt, D.R., Taraboulos, A. & Prusiner, S.B. Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* **267**, 16188–16199 (1992).
7. Bueler, H. et al. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**, 1339–1347 (1993).
8. Shyng, S.-L., Heuser, J.E. & Harris, D.A. A glycolipid-anchored prion proteins endo-

- cytosed via clathrin-coated pits. *J. Cell Biol.* 125, 1239–1250 (1994).
9. Vey, M. *et al.* Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14945–14949 (1996).
 10. Yehiely, F. *et al.* Identification of candidate proteins binding to prion protein. *Neurobiol. Dis.* 3, 339–355 (1997).
 11. Forloni, G. *et al.* Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 362, 543–546 (1993).
 12. Shyng, S.-L., Moulder, K.J., Laesko, A. & Harris, D.A. The N-terminal domain of a glycolipid-anchored prion protein is essential for its endocytosis via clathrin-coated pits. *J. Biol. Chem.* 270, 14793–14800 (1995).
 13. Gabriel, J.-M., Oesch, B., Kretzschmar, H., Scott, M. & Prusiner, S.B. Molecular cloning of a candidate for chicken prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9097–9101 (1992).
 14. Brentani, R.R. Biological implications of complementary hydropathy of amino acids. *J. Theor. Biol.* 135, 495–499 (1988).
 15. Brentani, R.R. Complementary hydropathy and the evolution of interacting polypeptides. *J. Mol. Evol.* 31, 239–243 (1990).
 16. Baranyi, L. *et al.* The antisense homology box: A new motif within proteins that encodes biologically active peptides. *Nature Med.* 1, 894–901 (1995).
 17. Pasqualini, R., Chamone, D.F. & Brentani, R.R. Determination of the putative binding site for fibronectin on platelet glycoprotein IIb-IIIa complex through a hydrophobic complementary. *J. Biol. Chem.* 264, 14566–14570 (1989).
 18. Brentani, R.R. *et al.* Characterization of the cellular receptor for fibronectin through a hydrophobic complementary approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 364–367 (1988).
 19. Souza, S.J. & Brentani, R.R. Collagen binding site in collagenase can be determined using the concept of sense-antisense peptide interactions. *J. Biol. Chem.* 267, 13763–13767 (1992).
 20. Serban, D., Taraboulos, A., DeArmond, S.J. & Prusiner, S.B. Rapid detection of Creutzfeldt-Jacob disease and scrapie prion proteins. *Neurology* 40, 110–177 (1990).
 21. Goldgaber, D. Anticipating an anti-prion protein. *Nature* 351, 106 (1991).
 22. Harris, D.A. *et al.* Processing of a cellular prion protein: Identification of N and C-terminal cleavage sites. *Biochemistry* 32, 1009–1016 (1993).
 23. Oesch, B. Characterization of the PrP binding proteins. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 343, 443–445 (1994).
 24. Gasset, M. *et al.* Predicted alpha-helical regions of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10940–10944 (1992).
 25. Askanas, V., Bilak, M., Engel, W.K., Leclec, A. & Tome, F. Prion protein is strongly immunolocalized at the postsynaptic domain of the human neuromuscular junctions. *Neurosci. Lett.* 159 (1–2), 111–114 (1993).
 26. Shyng, S.-L., Lehmann, S., Moulder, K.L. & Harris, D.A. Sulfated glycans stimulate endocytosis of the cellular isoform of the prion protein, PrP^c, in cultured cells. *J. Biol. Chem.* 270, 30221–30229 (1995).
 27. Moura Neto, V., Mallat, M., Jeantet, C. & Prochiantz, A. Microheterogeneity of tubulin proteins in neuronal and glial cells from the mouse brain in culture. *EMBO J.* 2, 1243–1248 (1983).
 28. Garcia-Abreu, J., Moura Neto, V., Carvalho, S.L. & Cavalcante, L.A.J. Regionally specific properties of midbrain glia. I. interactions with midbrain neurons. *Neurosci. Res.* 40, 471–477 (1995).
 29. Halfter, W., Reinhard, E., Liverani, D., Ortman, R. & Monard, D. Immunocytochemical localization of glia-derived nexin, laminin and fibronectin on the surface of extracellular matrix of C6 rat glioma cells. *Eur. J. Neurosci.* 1, 297–308 (1989).
 30. Arvan, P., Cameron, R.S. & Castle, D. Secretory membranes of the rat parotid gland: Preparation and comparative characterization. *Methods Enzymol.* 98, 75–87 (1983).
 31. Smith, D.B. & Johnson, K.S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusion with glutathione S-transferase. *Gene* 67, 31–40 (1988).
 32. Weiss, S. *et al.* Overexpression of active Syrian golden hamster prion protein PrP^c as a glutathione S-transferase fusion in heterologous systems. *J. Virol.* 69, 4776–4783 (1995).

II) ARTIGOS SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO

Cellular prion protein interaction with laminin is involved in long-term potentiation and memory

Running Title: PrPc interaction with laminin mediates LTP and memory

Rafael Roesler*, Roger Walz*, Alejandra Minetti*, Ricardo Marques†, Emílio R. Garrido Sanabria†, Edgard Graner‡, Adriana F. Mercadante‡§, Silvio M. Zanata‡§, Maria A. Juliano||, Esper A. Cavalheiro†, Vilma R. Martins¶, Ivan Izquierdo* and Ricardo R. Brentani‡#

*Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Avenida Ramiro Barcelos 2600, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

†Laboratório de Neurologia Experimental, Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, Rua Botucatu 862, 04023-900, S.P., Brazil

‡Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo Branch, Rua Prof. Antônio Prudente 109/4A, 01509-010, São Paulo, SP, Brazil.

§ Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Lineu Prestes, 748 –05599-970, S.P. Brazil

|| INFAR, Universidade Federal de São Paulo, SP, Brazil

¶ Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Cancer, Rua Prof. Antônio Prudente 109/4A, 01509-010, São Paulo, SP, Brazil.

To whom correspondence should be addressed

The cellular prion protein (PrPc) plays a role in the etiology of both transmissible and inherited spongiform encephalopathies¹ and possibly psychiatric disorders². We³ and others⁴ have shown that it is also involved in neuronal survival, which is dependent upon adhesion to laminin (LN)⁵. Given the exquisite abundance of PrPc¹ and LN⁶ in the hippocampus, a brain region long known to be involved in memory⁷ and the recent demonstration by us that PrPc is a high affinity receptor for LN, in particular for the carboxy-terminal domain of the LN γ -1 chain⁸, we decided to investigate whether the PrPc-LN interaction might play a role in memory. Herein we report that antisera against both macromolecules inhibit long-term synaptic potentiation (LTP) and memory in an inhibitory avoidance learning, which is largely dependent on the hippocampus⁹. These effects of anti-PrPc antibodies are abolished by co-administration of the *per se* inactive γ -1 carboxy-terminal LN peptide, indicating that the PrPc-LN interaction plays a pivotal role in memory.

A considerable body of evidence has linked long-term potentiation (LTP), a form of synaptic plasticity, to learning and memory¹⁰. At the same time, both LTP and memory have been correlated to extensive synapse morphological remodeling and formation of new dendrites and synapses, thus requiring protein synthesis^{11, 12}. Indeed, synapse specific protein synthesis has been demonstrated in aplysia¹³. Consistent with the remodeling observed, one of the early genes found to be activated upon LTP induction is tPA (tissue-type plasminogen activator), also found to be elicited in kainate-induced seizure¹⁴. In the latter model, the protease was found to act by converting plasminogen into plasmin which subsequently degraded laminin. Even though the cell receptor involved was not identified, it was clear that detachment of neurons from a laminin substrate was the determinant of neuronal cell

death characteristic of seizure models⁶. It was recently shown that neuronal cell cultures derived from mice in which the cellular prion protein gene (Prn-p) had been ablated were far more sensitive than wild-type derived cultures to serum deprivation¹ and we have shown that such “knock-out” mice were also far more sensitive to four different convulsant agents³. We also have shown that PrPc is a specific, high affinity, saturable receptor for laminin (LN), in particular for the carboxi-terminal decapeptide (RNIAEIIKDI) of the laminin γ -1 chain⁸. Thus, neurite extension by primary hippocampal neuron cultures in the presence of intact LN-1 was quite sensitive to anti-PrPc antibodies, whereas that elicited by the carboxiterminal peptide was completely inhibited by such antibodies. Furthermore, the neuritogenesis elicited by intact LN-1 from neurites obtained from mice in which the PrPc gene (Prn-p) had been ablated was substantially decreased and not inhibited by anti-PrPc antibodies, whereas no neuritogenesis could be elicited from such neurons by the carboxi-terminal peptide alone.

While the nature of the extracellular matrix (ECM) ligand has not been established, binding to the ECM could participate in neuronal plasticity such as required for LTP in the hippocampus¹¹, given the inhibitory effect of anti-integrin antibodies and RGD peptides¹¹ and the demonstration that *volado* a new *Drosophila* memory mutant encodes a new alpha-integrin¹⁵. We therefore decided to investigate whether the interaction between PrPc and LN could participate as well in LTP and memory formation. For this purpose we first studied the effect of antibodies to both LN and PrPc on LTP elicited in rat hippocampal slices *in vitro*. Figure 1b shows that indeed both antibodies are strongly inhibitory at the concentrations used. To demonstrate that the inhibitory effect of these antibodies is due to the inhibition of the interaction between the two corresponding antigenic ligands, we next studied the effect of the carboxy-terminal LN-derived peptide on LTP. Figure 1c shows that while the peptide itself did not affect LTP, its addition together with anti PrPc antibodies completely

abolished the latter's inhibitory effect (1d), suggesting that in fact the LN-PrPc interaction is involved in LTP.

The cellular prion protein was recently shown to play a role in memory to the extent that mice in which the coding sequence plus 900bp of the second intron were ablated, had a significant impairment of retention both in a water-finding latent learning task and a step-through inhibitory avoidance task¹⁶. In order to demonstrate that the PrPc-LN interaction has biological relevance we evaluated the effects of intra-hippocampal infusions of anti-PrPc and anti-LN antibodies and of the LN γ -1 derived peptide RNIAEIIKDI on memory for a step-down inhibitory avoidance task, an aversively motivated learning task, in rats⁹. Figure 2a shows that when infused bilaterally into the CA1 area of the hippocampus immediately after step-down inhibitory avoidance training, both anti-PrPc (0.90 μ g) and anti-LN (0.09 μ g) antibodies impaired retention of that task measured 24h after training, suggesting that both PrPc and LN in the dorsal hippocampus are involved in memory for that task. The differences in antibody concentrations able to produce an effect when injected in the hippocampus are due to their titer differences. It was still necessary however to demonstrate that the involvement of both macromolecules in memory depended on their binding one another. Infusion of the LN γ -1 derived peptide (0.04 μ g) alone did not affect memory retention. However, the impairing effect of the anti-PrPc antibody infusion on retention was prevented by co-infusion of the LN γ -1 peptide (Fig. 2b). A control scrambled γ -1 peptide was unable to modify either the normal memory retention or the impairment effect of anti-PrPc antibody.

These results indicate that the LN-PrPc interaction is not only involved in neuronal cell survival and differentiation but also in LTP and memory. Previous work has shown that memory still exists in mice devoid of the PrP gene (Prn-p)¹⁷ even though deficits both in LTP¹⁸ and some learning tasks¹⁶ have been shown. This can be explained by the obvious redundancy that must exist in order to

preserve such an important phenotype¹⁷. Another point to be clarified is the addition of PrPc to the range of LN receptors thought to be involved in these processes. While it has not been shown that anti-integrin antibodies have any effect on working memory models, their effect on LTP¹¹, the discovery of the *Drosophila* memory mutant encoding a new integrin¹⁵ and the known role of at least $\alpha 8 \beta 1$ integrin in neurite extension¹⁹ strongly suggest that integrins have to be considered as possible participants in plastic events such as memory formation. Since no integrin has hitherto been shown to bind anywhere but the alpha chain of laminins²⁰ it is possible to speculate, to the extent that preventing PrPc adhesion to LN is completely amnesic (see Fig. 2) that docking of PrPc to the LN γ -1 chain is the nucleating event which must be followed by integrin binding elsewhere in the LN trimer. The model would thus resemble the multimolecular dystrophin complex, also shown to bind laminin at the neuromuscular junction²¹. Complete reversal by the itself inactive carboxy-terminal decapeptide from the LN γ -1 chain of the inhibition elicited by intra hippocampal injections of anti-PrPc antibodies can be interpreted in two ways: 1- besides constituting a nucleating event, followed by further interactions between other cell surface receptors with other LN domains or even other extracellular matrix constituents, the PrPc-LN γ -1 interaction seems to compensate further interactions as previously demonstrated in the neuritogenesis model⁸. 2- by binding onto the PrPc docking site denuded by the detachment from extracellular matrix LN elicited by anti PrPc antibodies, the LN γ -1 peptide elicits an inward signal, thus effectively replacing the natural binding to extracellular LN. Further studies to understand the signaling mechanisms entailed are needed.

References

- 1- Prusiner, S.B., Scott, M.R., DeArmond, S.J. & Cohen, F.E. *Cell* **93**, 337-348 (1998).
- 2- Samaia, H.B., *et al.* *Nature* **390**, 241 (1997).
- 3- Walz, R. *et al.* *Epilepsia* **40**, 1679-1682 (1999).
- 4- Kuwahara, C. *et al.* *Nature* **400**, 225-226 (1999).
- 5- Frost, E.E., Buttery, P.C., Milner, R. & Ffrench-Constant, C. *Curr Biol.* **9(21)**, 1251-1254 (1999).
- 6- Chen, Z.-L. & Strickland, S. *Cell* **91**, 917-925 (1997).
- 7- Izquierdo, I., Barros, D.M., Souza, T.M., Izquierdo, I. & Medina, J.H. *Nature* **393**, 635 (1998).
- 8- Graner, E. *et al.* *Mol. Brain Res.* in press
- 9- Izquierdo, I. *et al.* *Europ. J. Neurosci.* **9**, 786-793 (1997).
- 10- Bliss, T.V.P. & Collingridge, G.L. *Nature* **361**, 31-39 (1993).
- 11- Lynch, G. *Neurobiolol. Learn. Mem.* **70**, 82-100 (1998).
- 12- Mayford, M. & Kandel, E.K. *Trends Genet* **15 (11)**, 463-470 (1999).
- 13- Martin, K.C. *et al.* *Cell* **91**, 927-938 (1997).
- 14- Quian, Z., Gilbert, M.E., Colicos, M.A., Kandel, R.E. & Kuhl, D. *Nature* **361**, 453-457 (1993).
- 15- Grotewiel, M.S., Beck C.D.O., Wu K.H., Zhu X-R and Davis R.L. *Nature* **391**, 455-460 (1998).
- 16- Nishida, N. *et al.* *Cell. Mol. Neurobiol.* **17**, 537-545 (1997).
- 17- Büller, H. *et al.* *Nature* **356**, 577-582 (1992).
- 18- Collinge, J. *et al.* *Nature* **370**, 295-297 (1994).
- 19- Reichardt, L.F. & Tomaselli, K.J. *Ann. Rev. Neurosci.* **14**, 531-570 (1991).
- 20- Giancotti, F.G. *Nat. Cell Biol.* **2**, E13-E14 (2000).
- 21- Tinsley, J.M., Blake, D.J., Zuelling, R.A. & Davies, K.E. *Proc Natl. Aca. Sci USA* **91**, 8307-8313 (1994).

22- Jensen, M.S., Azouz, R. & Yaari, Y. *J Neurophysiol* **71**(3),831-8399 (1994)

Acknowledgments

This work is partially supported by grants from FAPESP, CNPq and PRONEX, A.F.M and S.M.Z. are supported by FAPESP fellowships.

Figure Legends

Figure 1 PrPc-LN binding mediates long term potentiation

Hippocampal slices were treated with saline as a control (●), affinity purified pre immune IgG (2.5 µg/ml) (▼), affinity purified anti GST IgG (2.5 µg/ml) (○), affinity purified anti GST-PrPc IgG (2.5 µg/ml) (◆), affinity purified anti-LN IgG (0.25 µg/ml) (□), LN γ -1 derived peptide (0.08 µg/ml) (■), LN γ -1 derived peptide (0.08 µg/ml) associated with affinity purified anti GST-PrPc IgG (2.5 µg/ml) (Δ), were applied in ACSF and tested 10 min before HFS. Antibodies anti PrPc and anti LN decreased LTP (b) while irrelevant IgG (a), anti-GST (a, b, c), or γ -1 peptide (c) did not have any activity. The γ -1 peptide addition together with anti PrPc antibodies completely abolished the latter's inhibitory effect (d).

METHODS. Hippocampal slices were prepared from Wistar rats as previously described²². Extracellular recordings of the evoked field excitatory post-synaptic potentials (fEPSP) were obtained from the *stratum radiatum* layer of the CA1 hippocampal subfield. Standard extracellular recordings were made in 5-10 M Ω NaCl filled glass microelectrodes (80-100 M Ω). The signal was recorded and amplified (Axoclamp-2B amplifier; Axon Instruments and Neurolog System, NL104, Digitimer Ltd); displayed on a storage oscilloscope, digitized using a data acquisition system (DIGIDATA 1200, Axon Inst, Inc) and stored for later analysis (PCLAMP, Axon Instruments). CA1 fEPSPs were evoked by orthodromic stimulation of Schaffer-collateral afferents. Stimulation of the *stratum radiatum* was accomplished by teflon-insulated nichrome bipolar electrodes (125µm diameter). Stimulus pulses lasted 80-100µs at constant current (0.05 Hz). Before each LTP experiment, input/output (I/O) curves were constructed by series of ascendant stimulus intensities.

The stimulus strength of pulses was adjusted to produce 30-40% of maximal response. This parameter was kept constant throughout the experiment. Recording sections started 20-30 min period after equilibration of the field potentials. Baseline values for normalization were obtained during 30 min., before high-frequency stimulation (HFS) pulse (1 s duration, 100Hz) used to induce LTP. Drugs were applied in ACSF and tested 10 min before HFS. For data analysis, four successive individual fEPSP were averaged and the initial slopes measured off-line using a Pclamp program CLAMPFIT. Normalized slopes analyzed and plotted for group comparisons. Experimental values of normalized slopes in different groups were expressed as mean $\pm$ S.E.M. ANOVA tests were applied as appropriate (when differences were detected a Scheffé pos-hoc test was necessary) and $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Figure 2. PrPc-LN binding mediates long-term memory

Affinity purified anti PrPc IgG (0.36 and 0.90 $\mu\text{g}/\text{side}$) and anti LN IgG (0.09 $\mu\text{g}/\text{side}$) inhibited long term memory while no effect was observed with pre immune IgG (0.90 $\mu\text{g}/\text{side}$) (a). LN γ -1 derived peptide (0.04 $\mu\text{g}/\text{side}$) association with affinity purified anti-PrPc IgG (0.90 $\mu\text{g}/\text{side}$) reverts the latter's inhibitory activity, while infusion of the LN γ -1 derived peptide (0.04 μg) did not affect memory retention. A control scrambled γ -1 peptide was unable to modify either the normal memory retention or the impairment effect of anti-PrPc antibody (b). Data are median (interquartile range) of retention test step-down latencies. * Significantly different from purified pre immune serum IgG group (Mann-Whitney test, $p < 0.05$). Bars indicate the minimum and maximum latencies for each group of animals

METHODS. Ninety adult male Wistar rats (200-300g) were bilaterally implanted under thionembatal anesthesia (30mg/kg, i.p.) with 9.0 mm guide cannulae aimed 1.0mm above the CA1

area of the dorsal hippocampus at coordinates A-4.3, L4.0, V2.0 from bregma as described else⁹. Three to seven days after surgery, rats were placed on a 7cm wide, 2.5cm high platform in a 50 x 25x25 cm acrylic inhibitory avoidance box, the floor of which consisted of parallel calibre stainless steel bars (1 mm diameter) spaced 1 cm apart. Latency to step down on the grid with all four paws was measured with an automatic device. In the training sessions, immediately after stepping down on the grid, the animals received a 0.4 mA, 2.0 s scrambled foot shock. In test sessions, carried out 24 h. after training, no footshock was administered and the step-down latency (maximum 180 s) used as a measure of retention⁹. Details of the infusion procedure were described in previous reports⁹. Immediately after training, an infusion cannula was fitted into the guide cannula. The tip of the infusion cannula protruded 1.0 mm beyond the guide cannula and was aimed at the pyramidal cell layer of the CA1 area of the dorsal hippocampus. Through the infusion cannulae animals received bilateral 0.5 μ l infusions of saline, pre immune IgG (0.90 or 0.09 μ /side), anti-PrPc IgG (0.36 or 0.90 μ g/side), anti-LN IgG (0.09 μ g/side), LN γ -1 derived peptide (0.04 μ g/side) or LN γ -1 derived peptide (0.04 μ g/side) co-infused with anti-PrPc IgG (0.90 μ g/side). Scrambled LN γ -1 derived peptide (0.04 μ g/side) was infused alone or associated with anti-PrPc IgG (0.90 μ g/side) as a negative control. After the behavioral procedures, 0.5ul of a solution of 4% methylene blue in saline was infused through the cannulae. Animals were sacrificed by decapitation and their brains processed for histology⁹. Infusion placements were within 1.5 mm³ of the intended site in 81 of the animals (data not shown). Only data from these animals were included in the final analysis. The experiments were performed by comparisons of both training and test session latencies between groups using a Kruskal-Walis analysis of variance and the Mann-Whitney U test if necessary. Comparisons between training and test sessions were done with a Wilcoxon test. In all comparisons, $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

Fig. 1

a

b

c

d

Fig. 2

Inactivation of cellular prion protein inhibits laminin-induced cell adhesion, differentiation and promotes neurite retraction

Edgard Graner,¹ Adriana F. Mercadante,^{1,2} Sílvia M. Zanata,^{1,2} Vilma R. Martins,³

Daniel G. Jay,⁴ and Ricardo R. Brentani¹

¹ Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo Branch, Rua Prof. Antonio Prudente 109/4A, 01509-010, São Paulo, SP, Brazil, ² Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Lineu Prestes, 748 –05599-970, S.P. Brazil, ³ Centro de Tratamento e Pesquisa, Hospital do Câncer, Rua Prof. Antonio Prudente 109/4A, 01509-010, São Paulo, SP, Brazil, and ⁴ Department of Physiology, Tufts University, School of Medicine, 136 Harrison Avenue, Boston, MA, 02111, USA.

Abbreviated title: PrPc role in cell adhesion and differentiation.

Number of text pages: 18; Number of figures: 4; Number of tables: 1

Number of words in the abstract: 155; Number of words in the introduction: 408; Number of words in the discussion: 663.

Correspondence should be addressed to Dr. Ricardo R. Brentani, Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo Branch, Rua Prof. Antonio Prudente 109/4A, 01509-010, Fax: (55)-11-270 7001, telephone: (55)-11-270 4922, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: ludwig0@node1.com.br

Acknowledgements: This work was partially supported by grants from FAPESP, CNPq and PRONEX. AFM and SMZ are supported by FAPESP fellowships.

Prions, the etiological agents for infectious degenerative encephalopathies, act by inducing structural modifications in the cellular prion protein (PrP^c), a cell surface sialoglycoprotein. Recently, we demonstrated that PrP^c binds the extracellular matrix glycoprotein laminin (LN) and that this interaction mediates the differentiation of primary cultured hippocampal neurons obtained from rats and mice. Here we confirm, with the aid of the recombinant His₆-PrP^c protein, the specificity of such an interaction. In the present study we have used the PC-12 cell model to further explore the biological role of LN-PrP^c interaction. Antibodies against PrP^c significantly inhibit cell adhesion to LN-coated cell culture plaques. In addition, chromophore-assisted laser inactivation (CALI) of cell surface PrP^c perturbs LN-induced differentiation and also promotes retraction of LN-induced mature neurites. Taken together, these results point out to the importance of PrP^c as a cell surface ligand for LN, mediating adhesion and differentiation processes as well as maintenance of LN-induced PC-12 cell mature neurites.

Key words: cellular prion protein; laminin; extracellular matrix; neurite outgrowth; PC-12 cell line

Prions are unprecedented infectious pathogens that cause a group of invariably fatal neurodegenerative diseases by an entirely novel mechanism, which involves posttranslational structural modification of PrP^c, leading to the deposition of an insoluble and protease-resistant isoform (PrP^{Sc}) within the central nervous system (Prusiner et al., 1998).

LN plays a major role in neuronal differentiation, characterized by neurite formation and extension (Tomaselli and Reichardt, 1988), migration (Liesi et al., 1992; Rivas and Hatten, 1995) and regeneration (Salonen et al., 1987). In the central nervous system, besides the basement membranes of brain vasculature, LN is apparently expressed by hippocampal neurons (Yamamoto et al., 1988; Chen and Strickland, 1997). We have recently demonstrated that PrPc binds LN in a high-affinity, specific and saturable fashion (Graner et al., 2000). This interaction seems to be essential for the differentiation of PC-12 cells as well as of rat and mouse hippocampal neurons. Chen and Strickland (1997) showed that laminin immunolabeling disappears from the rat hippocampus after excitotoxin injection. This event precedes neuronal death and can be blocked by tPA deficiency or infusion of plasmin inhibitor, suggesting that LN-neuron interactions prevent cell death. Very recently, Kuwahara *et al.* (1999) demonstrated that PrPc prevents serum deprivation-dependent apoptosis of neurons in culture. They further suggested that PrPc might be similarly involved in neurite extension by these cells. We on the other hand have shown that PrPc-null mice, in which the *PRNP* gene has been ablated, are far more sensitive to four distinct seizure-inducing models (Walz et al., 1999). Moreover, we also demonstrated decreased neuritogenesis over LN in primary hippocampal cultures from these animals when compared with wild type (Graner et al., 2000).

Chromophore-assisted laser inactivation (CALI) of protein function has been successfully applied in different models (Jay and Keshishian, 1990; Liao et al., 1993; Schmucker et al., 1994; Liao et al., 1995; Chang et al., 1995; Takei et al., 1999) with a high degree of spatial and temporal resolution. This technique uses laser energy to inactivate a

single protein following its binding with antibodies labeled with the chromophore malachite green, which generates short lifetime hydroxyl free radicals (Liao et al., 1993).

Herein we provide evidence that specific antibodies against PrPc inhibit cell adhesion to LN. Also, the same antibodies, coupled with malachite green, inhibit LN-mediated cell differentiation and promotes retraction of pre-extended LN-induced neurites after laser application. In addition, the data here presented confirm the specificity of the LN-PrPc interaction using a different PrPc recombinant molecule (His₆-PrPc).

MATERIALS AND METHODS

Expression and purification of recombinant His₆-PrP. A 648 bp DNA fragment containing nucleotides coding for residues 23 to 238 of murine PrPc was subcloned in Bam HI-Eco RI restriction sites of pTRC-His A vector (Invitrogen), PrPc expressed as histidine tail fusion protein into inclusion bodies of *E.coli* (DH5 α) and purified as described (Zahn et al., 1997).

Binding assay. LN from EHS tumors was adsorbed (0.1 μ g/well) on plastic microtiter plates for 24h, at 4°C. After treatment with 2% bovine serum albumin (BSA) solution for 2h at room temperature, each test well was incubated overnight at 4°C with increasing amounts of ¹²⁵I-labeled His₆-PrPc in TBS (150mM NaCl, 20mM Tris-HCL, pH 7.4) and extensively washed with the same buffer. Radioactive material bound to the plate was determined using a gamma counter (total curve). For the non-specific curve, plates with LN were pre-incubated with 3 fold more non-labeled His₆-PrPc, before addition of ¹²⁵I-labeled His₆-PrPc. The specific curve was obtained by subtraction of non-specific from total values. Dot blots were performed with 4.5 pmol of each purified protein (EHS-laminin, fibronectin, collagen type I and BSA). Membranes were blocked with TCM

(150mM NaCl, 50 mM Tris, 5mM MgCl₂, 2.5 mM Ca Cl₂, pH7.4) plus 5% non-fat milk, followed by overnight incubation with ¹²⁵I-labeled His₆-PrPc (2μg/ml). After extensive wash, membranes were exposed to radiographic films (Kodak) and the signals quantified by densitometry and normalized by mol of each protein.

Cell culture. PC-12 cells (kindly provided by Dr. Paulo Lee Ho - Instituto Butantan - SP - Brazil) were primed during 5 days with NGF-β (Sigma) (50ng/ml in Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM - plus 10% fetal calf serum - FCS), harvested, resuspended in DMEM and used for the large-scale CALI assays. For the microscale-CALI analysis, cells were primed as described above and differentiated for 24–48 h on slide coverslips coated with poly-L-lysine plus LN in DMEM 2.5% FCS containing 50ng/ml NGF-β.

Immunofluorescence. PC-12 cells were differentiated as described above on glass chamber slides (Nunc), incubated for 1h at 4°C with anti-GST-PrPc or anti-GST sera (Martins et al., 1997) (diluted 1:80 in DMEM), washed with PBS and fixed in 3.7% paraformaldehyde solution. Cells were then incubated with anti-rabbit FITC-conjugated IgG (Sigma) diluted 1:80 in PBS for 1h at room temperature, washed again and documented with a fluorescence microscope.

Cell adhesion assay. Non-differentiated PC-12 cells were harvested and incubated for 1 h at 4°C with sera against GST, GST-PrPc, α1, α3 and β1 integrin chains (Chemicon) or normal rabbit serum (diluted 1:100 in DMEM). After plating on LN-treated 96-well culture plaques (Costar) and incubation for 1 h at 37°C, cells were uniformly washed 7-10 times with PBS, the remaining cells fixed as described above, stained with toluidine blue and washed several times with distilled water. Cells were then incubated for 15 min. at

37°C with 100µl of 1% SDS solution and the OD of the supernatants analyzed with the aid of an ELISA reader at 580 nm.

Chromophore-assisted laser inactivation (CALI). Large scale CALI (Schmucker et al., 1994; Liao et al., 1995): A Quanta Ray GCR-11 laser (Spectra Physics. Corp., Mountain View, CA) was used to drive a dye laser containing the fluorescent laser dye DCM (Exciton Corp., Dayton, OH) to generate a 620 nm pulsed laser beam with a pulse width of 3.5ns at a frequency of 10 Hz and a peak pulse energy of 15 mJ. PC-12 cells were incubated during 1 hour at 4°C with malachite green (MG)-labeled anti-PrPc antibodies (anti-GST-PrPc; anti-prion N-10 - kindly provided by Dr. Stanley Prusiner, University of California at San Francisco - or purified rabbit IgG, Sigma). After the incubation, the cells (3.5×10^4 /well) were pelleted and washed to remove unbound MG-labeled antibodies, resuspended and transferred into 96-well prong plates (Intermed, Denmark) for CALI treatment. Wells were then subjected to 1 min. of continuous laser pulsing at 15 mJ/pulse. After laser treatment, PC-12 cells were pooled, pelleted, resuspended in 300 µl of DMEM 2.5% FCS and plated on 24-well plates (Costar) previously coated with poly-L-lysine (Sigma) plus EHS-LN. After incubations of 8 hours at 37°C and 5% CO₂, the cells were fixed as described above and triplicate wells analyzed by phase-contrast microscopy. The number of cells with neurites was counted in 15 fields per well. Microscale-CALI (Chang et al., 1995; Takei et al., 1999): 24-48h after plated over the LN substrate, differentiated PC-12 cells were kept at 37°C at a phase contrast microscope with the aid of a stage incubator during the microscale-CALI manipulations. Laser energy for microscale-CALI was comparable to that used in large scale experiments (nitrogen-driven dye laser - VSL - 337 - Laser Science Co., Newton, MA). Growth cone behavior was observed by time-lapse

video microscopy. Image enhancement was aided by the NIH Scion Image Software. The results represent the behavior of 9 anti-PrPc-treated and 9 normal IgG-treated PC-12 cells.

RESULTS

Since both PrPc and LN seem to mediate neuronal survival (Chen and Strickland, 1997; Kuwahara et al., 1999) and are expressed in the hippocampus (Yamamoto et al., 1988; Fournier et al., 1995; Chen and Strickland, 1997; Sales et al., 1998), we decided to further investigate the possibility that PrPc was one of the neuronal LN receptors. For this purpose we made use of recombinant PrPc in binding assays with LN. EHS-derived LN immobilized in microtiter plates was incubated with increasing amounts of 125 I-recombinant His₆-PrPc, previously shown to have a similar conformation as PrPc (Zahn et al., 1997). The specific binding curve shows that LN interacts with His₆-PrPc in a specific and saturable manner (Fig. 1 A). A K_d of 4.8×10^{-8} M (Fig. 1 B) was obtained when specific data were replotted according to the Scatchard method (Scatchard, 1949). In order to confirm the specificity of the interaction between PrPc and LN we incubated 125 I-His₆-PrPc with nitrocellulose membranes containing LN, fibronectin, collagen type I and BSA (Fig. 1 C).

PC-12 rat pheochromocytoma cells, a well characterized model of neuronal differentiation (Tomaselli et al., 1993), express PrPc on their surface both in LN-differentiated and non-differentiated state (Fig. 2). Treatment of PC-12 cells with anti-GST-PrPc antiserum, before plating the cells on LN-coated culture plates, inhibits cell adhesion by 30% ($p < 0.05$) (Fig. 3). Serum raised against the GST protein contained in the fusion protein GST-PrPc (data not shown) and non-immune serum did not cause any effect on cell adhesion. Positive controls using sera against the integrin chains $\alpha 1$, $\alpha 3$ and $\beta 1$ also

showed a 30-35% inhibition ($p < 0.05$) (Fig. 3), similar to what has been previously reported (Tomaselli et al., 1987). These findings suggest that PrPc may have a role on cell adhesion to LN.

We have identified the binding site of PrPc at the LN molecule as the decapeptide RNIAEIIKDI located in the carboxyl-terminal domain of the $\gamma 1$ chain (Graner et al., 2000), previously demonstrated to play a role in neuronal differentiation (Liesi et al., 1989). To confirm the participation of the LN-PrPc interaction in PC-12 neurite outgrowth, we next used the CALI technique. The specific laser inactivation of PrPc at the surface of PC-12 cells promoted a significant inhibition of neurite extension (Fig. 4 A). These results strongly suggest that PrPc is involved in LN-induced neurite extension. To address whether PrPc function could modulate LN-induced mature neurite behavior, we used the microscale-CALI technique. As shown in Fig. 4 B (1-5) and Table 1, laser inactivation of PrPc on the growth cone of pre-extended LN-induced neurites promotes a significant reduction of neurite length. Such a retraction was not achieved when microscale-CALI was performed using dye-labeled non-immune rabbit IgG (Fig. 4 B, 6-10).

DISCUSSION

The interaction between LN and PrPc was recently demonstrated by our group using the GST-PrPc fusion protein (Graner et al., 2000). Here we show, using the His₆-PrPc recombinant protein, that this interaction is in fact specific, which is particularly evident by the similar K_d values obtained using these different recombinant protein expression systems (2×10^{-8} M for LN-GSP-PrPc and 4.8×10^{-8} M for LN-His₆-PrPc, Fig. 1 B). Moreover, fibronectin, another extracellular matrix glycoprotein found in embryonic brain also related with neuronal attachment and neurite outgrowth (Liesi et al., 1990), binds PrPc

with at least 10 times lower intensity than LN while no binding was observed with collagen type I or BSA (Fig. 1 C).

LN has been found to promote cell adhesion *in vitro* and a number of cell surface receptor proteins such as integrins and other non-integrin LN receptors (Luckenbill-Edds, 1997; Powell and Kleinman, 1997) have been identified as mediators of this activity. Here we used the PC-12 cell line, a well established model of neuronal differentiation (Tomaselli, 1993) that expresses PrPc on its surface (Fig. 2), to address the interaction between LN and PrPc.

At least two distinct neuritogenesis pathways have been described in the literature: activation of the growth of cellular processes by b-FGF plus cyclic AMP (cAMP) (Ho and Raw, 1992) or NGF plus LN (Tomaselli et al., 1987; Turner et al., 1987). In order to determine the possible involvement of PrPc in neuritogenesis, we tested the inhibitory effect of anti-PrPc antibodies on the process formation induced by both pathways in PC-12 cells. There was no inhibition of the neuritogenesis induced by b-FGF and cAMP (data not shown) but a 50 to 70% inhibition was previously achieved with anti-PrPc antisera on that dependent on NGF plus LN (Graner et al., 2000). Pre-immune serum or serum raised against GST present in the recombinant molecule do not have any effect on the neuritogenesis process for either condition. These data further support a direct interaction between PrPc and LN. Moreover, we have previously observed using flow cytometry (Graner et al., 2000) that NGF-treated PC-12 cells express 25% more PrPc than non-differentiated ones, in agreement with the PrPc mRNA levels described in the literature (Mobley et al., 1988). Thus, it is conceivable that the NGF-induced increase in cell surface

PrPc (achieved by priming PC-12 cells with this soluble factor for 5 days) may facilitate differentiation after plating the cells on LN substrate.

CALI is a method of protein ablation induced by photochemical damage directed by malachite green-conjugated antibodies, without any effect on other cellular components or living cells by itself (Chang et al., 1995). This technique avoids compensatory mechanisms that may be elicited in genetically modified animals or cells. To perturb PrPc function at the PC-12 cell surface, we pre-incubated NGF-primed (non-differentiated) or LN-differentiated cells with dye-labeled anti-PrPc antibodies and submitted cells to laser irradiation. Full inhibition of neurite outgrowth was probably not achieved because integrins have been also shown to mediate LN binding in this model (Powell and Kleinman, 1997) (Fig. 4 A). Furthermore, other neural adhesion molecules as L1 and NCAM-180 seem also to be closely related with neurite outgrowth control (Takei et al., 1999). We also show in the present work that PrPc is important for the maintenance of mature LN-induced neurites (Fig. 4 B and Table 1), since laser inactivation of PrPc promotes a reduction in neurite length. Taken together these results suggest that, besides LN-PrPc binding participation in the early phase of neurite outgrowth, maintenance of pre-extended PC-12 neurites is, at least in part, also modulated by LN-PrPc interaction.

Our results contribute to a fuller understanding of the participation of PrPc in neuronal survival by mediating adhesion and phenotypic modifications of such cells through its interaction with LN. However, further work will be necessary to identify the cell-signaling pathway triggered by LN-PrPc binding at the cell surface. This new emphasis on the role of PrPc may also help to clarify the pathogenesis of prion-related disorders.

REFERENCES

- Chang HY, Takei K, Sydor AM, Born T, Rusnak F, Jay DG (1995) Asymmetric retraction of growth cone filopodia following focal inactivation of calcineurin. *Nature* 376: 686-690.
- Chen Z-L, Strickland S (1997) Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell* 91: 917-925.
- Fournier JG, Escaig-Haye F, Billete de Villemeur T, Robain O (1995) Ultrastructural localization of cellular prion protein (PrPc) in synaptic boutons of normal hamster hippocampus. *C R Acad Sci III* 318: 339-344.
- Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Forlenza OV, Cabral ALB, Veiga SS, Juliano MA, Roesler R, Walz R, Minetti A, Izquierdo I, Martins VR, Brentani RR (2000) Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Mol Brain Res* 76: 85-92.
- Ho PL, Raw I (1992) Cyclic AMP potentiates bFGF-induced neurite outgrowth in PC-12 cells. *J Cell Physiol* 150: 647-656.
- Jay DG, Keshishian H (1990) Laser inactivation of fasciclin I disrupts axon-adhesion of grasshopper pioneer neurons. *Nature* 348: 548-550.
- Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T, Haraguchi K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Saeki K, Matsumoto Y, Yokoyama T, Itohara S, Onodera T (1999) Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* 400: 225-226.
- Liao JC, Berg LJ, Jay DG (1995) Chromophore-assisted laser inactivation of subunits of the T-cell receptor in living cells is spatially restricted. *Photochem Photobiol* 62: 923-929.

- Liao JC, Roider J, Jay DG (1993) Chromophore-assisted inactivation of proteins is mediated by the photogeneration of free radicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2659-2663.
- Liesi P (1990) Extracellular matrix and neuronal movement. *Experimentia* 46: 900-907.
- Liesi P, Närvänem A, Soos J, Sariola H, Snounou G (1989) Identification of a neurite outgrowth-promoting domain of laminin using synthetic peptides. *FEBS Lett* 244: 141-148.
- Liesi P, Seppälä I, Trenkner E (1992) Neuronal migration in cerebellar microcultures is inhibited by antibodies against a neurite outgrowth domain of laminin. *J Neurosci Res* 33: 170-176.
- Luckenbill-Edds L (1997) Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth. *Brain Res Rev* 23: 1-27.
- Martins VR, Graner E, Garcia-Abreu J, de Souza SJ, Mercadante AF, Veiga SS, Zanata SM, Moura-Neto V, Brentani RR (1997) Complementary hydropathy identifies a cellular prion protein receptor. *Nature Med* 3: 1376-1382.
- Mobley WC, Neve RF, Prusiner SB, McKinley MP (1988) Nerve growth factor increases mRNA levels for the prion protein and the b-amyloid protein precursor in developing hamster brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9811-9815.
- Powell SK, Kleinman HK (1997) Neuronal laminins and their cellular receptors. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 401-414.
- Prusiner SB, Scott MR, DeArmond SJ, Cohen FE (1998) Prion protein biology. *Cell* 93: 337-348.

- Rivas RJ, Hatten ME (1995) Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 15: 981-989.
- Sales N, Rodolfo K, Hassig R, Faucheux B, Di Giamberardino L, Moya KL (1998) Cellular prion protein localization in rodent and primate brain. *Eur J Neurosci* 10: 2464-2471.
- Salonen V, Peltonen J, Røyttä M, Virtanen IJ (1987) Laminin in traumatized peripheral nerve: basement membrane changes during degeneration and regeneration. *J Neurocytol* 16: 713-720.
- Scatchard G (1949) The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 51: 660-672.
- Schmucker D, Su AL, Beermann A, Jäckle H, Jay DG (1994) Chromophore-assisted laser inactivation of patched protein switches cell fate in the larval visual system of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2664-2668.
- Takei K, Chan TA, Wang FS, Deng H, Rutishauser U, Jay DG (1999) The neural cell adhesion molecules L1 and NCAM-180 act in different steps of neurite outgrowth. *J Neurosci* 19: 9469-9479.
- Tomaselli KJ, Damsky CJ, Reichardt LF (1987) Interactions of a neuronal cell line (PC-12) with laminin, collagen IV, and fibronectin: identification of integrin-related glycoproteins involved in attachment and process outgrowth. *J Cell Biol* 105: 2347-2358.
- Tomaselli KJ, Doherty P, Emmett CJ, Damsky CH, Walsh FS, Reichardt LF (1993) Expression of beta 1 integrins in sensory neurons of the dorsal root ganglion and their functions in neurite outgrowth on two laminin isoforms. *J Neurosci* 13: 4880-4888.

- Tomaselli KJ, Reichardt LF (1988) Peripheral motoneuron interactions with laminin and Schwann cell-derived neurite-promoting molecules: developmental regulation of laminin receptor function. *J Neurosci Res* 21: 275-285.
- Turner DC, Flier LA, Carbonetto S (1987) Magnesium-dependent attachment and neurite outgrowth by PC-12 cells on collagen and laminin substrata. *Dev Biol* 121: 510-525.
- Walz R, Amaral OB, Rockenbach IC, Roesler R, Izquierdo I, Cavalheiro EA, Martins VR, Brentani RR (1999) Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. *Epilepsia* 40: 1679-1682.
- Yamamoto T, Iwasaki Y, Yamamoto H, Konno H, Isemura M (1988) Intraneuronal laminin-like molecule in the central nervous system: demonstration of its unique differential distribution. *J Neurol Sci* 84: 1-13.
- Zahn R, von Schroetter C, Wüthrich K (1997) Human prion proteins expressed in *Escherichia coli* purified by high-affinity column refolding. *FEBS Lett* 417: 400-404.

Table 1. Summary of microscale-CALI data

	IgG-MG	anti-PrPc-MG	significance level (<i>p</i>)
DL	-0.25 ($\pm$ 0.64)	-1.31 ($\pm$ 2.4)	0.17
AL	-1.15 ($\pm$ 2.79)	-2.41 ($\pm$ 2.8)	0.047*
DL+AL	-0.22 ($\pm$ 0.66)	-1.86 ($\pm$ 2.6)	0.017*

Microscale-CALI of PrPc in the growth cone of PC-12 cells differentiated with laminin. The data represent the average of changes in neurite lengths (in micrometers) during the 5-minute application of the laser beam (DL), in the next 15 minutes after the laser application (AL) and in both periods (DL+AL). * *p* values < 0.05 were considered as significant (two-tailed Student T test).

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Binding assay. *A*, Specific curve shows that recombinant His₆-PrPc binds LN in a saturable and specific manner. *B*, The $K_d=4.8 \times 10^{-8}$ obtained by the Scatchard method indicates that the interaction between PrPc and LN displays high affinity. *C*, PrPc specifically binds LN. The specificity of the interaction between PrPc and LN was checked incubating ¹²⁵I-PrPc with nitrocellulose membranes containing laminin (LN), fibronectin (FN), collagen type I (COL-I) and BSA dotted in duplicates. Spots were quantified by densitometry and normalized to the mol of each protein immobilized (relative levels).

Figure 2. Presence of PrPc on cell surfaces revealed by immunofluorescence reactions using anti-GST-PrPc antibodies. LN-differentiated (*A*) and non-differentiated (*B*) PC-12 cells. There was no immunolabeling with anti-GST serum (*C*).

Figure 3. Antibodies against PrPc (anti-GST-PrPc), as well as anti- $\alpha 1$, $\alpha 3$ and $\beta 1$ integrin chains, significantly inhibit adhesion of PC-12 cells on the LN substrate. Non-immune rabbit serum (serum) in the culture medium and bovine serum albumin as substrate for cell adhesion were used as negative controls. The results represent the average and standard deviations of three independent experiments (* $p < 0.05$; Mann-Whitney test for unpaired samples).

Figure 4. CALI of PrPc. A, Large scale CALI PC-12 cells were incubated with malachite green-labeled IgG purified antibodies anti-GST-PrPc; anti-PrPc (N-10) or purified rabbit IgG from non-immune serum (control), submitted to laser treatment and plated on LN substrate. After an incubation period of 8 hours both anti-PrPc antisera significantly inhibited LN-induced neurite outgrowth. Results represent the average and standard deviations of three independent experiments (* $p < 0.001$; Mann-Whitney test for unpaired samples). WL = without laser treatment. *B, Microscale-CALI of PrPc causes LN-induced neurite retraction (1-5).* 1: the PC-12 cell incubated with chromophore-labeled IgG purified from anti-PrPc serum had the neurite first observed for 5 min.; 2 and 3: laser irradiation of the growth cone (GC), note that the neurite starts retracting at the end of this period; 4 and 5: the neurite continues retracting in the 15 min. period after laser irradiation. Microscale-CALI with chromophore-labeled IgG purified from non-immune serum does not perturb neurite behavior (6-10). 6: the PC-12 cell neurite is observed for 5 min., 7 and 8: laser irradiated for 5 min.; 9 and 10: neurite behavior was observed in the next 15 min. after laser treatment. Arrows, laser spot; Scale bar, 10 μ m.

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4a

Fig. 4b