

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**Instituto de Química**

**A PROTEÍNA PRION CELULAR E SEUS LIGANTES -  
VITRONECTINA, STI1 E LAMININA - NOS MECANISMOS DE  
PLASTICIDADE NEURONAL.**

**GLAUCIA NOELI MAROSO HAJJ**

Tese de doutorado

**ORIENTADORA: DRA. VILMA REGINA MARTINS**

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Hajj, Glauca Noeli Maroso  
H154p A proteína prion celular e seus ligantes-vitronectina, STII  
e laminina - nos mecanismos de plasticidade neuronal / Glauca  
Noeli Maroso Hajj -- São Paulo, 2004.  
203p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade  
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.  
Orientador : Martins, Vilma Regina

1. Prioncelular : Bioquímica 2. Apoptose : Patologia  
3. Neuroquímica : Fisiologia humana I. T. II. Martins,  
Vilma Regina, orientador.

574.19245 CDD

*“A proteína prion celular e seus ligantes – vitronectina, STI1 e laminina – nos mecanismos de plasticidade neuronal ”*

**GLÁUCIA NOELI MAROSO HAJJ**

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(a) por:**

---

Profa. Dra. VILMA REGINA MARTINS  
Ludwig  
(Orientadora e Presidente)

---

Profa. Dra. BETTINA MALNIC  
IQ – USP

---

Profa. Dra. ANA MARIA MOURA DA SILVA  
Butantã

---

Prof. Dr. MARCO ANTONIO MAXIMO PRADO  
UFMG

---

Profa. Dra. MARGARET HAIGANOUCHE MAGDESIAN  
UFRJ

SÃO PAULO  
19 de NOVEMBRO 2004

*Aos meus pais, José e Olga, pelo apoio carinho e dedicação.*

*Ao meu marido, Leonardo pelo amor e apoio em todos os momentos.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Ricardo Renzo Brentani, por trazer ao Brasil e cuidar tão bem de um instituto tão importante para a ciência nacional. Também pelas idéias revolucionárias e pelo estilo de fazer ciência, marcado pela generosidade e colaboração, que se infiltraram na essência desta tese.

À Dra. Vilma Regina Martins, por ser orientadora e educadora. Por estar presente na medida certa, sem exagerar nos cuidados nem ser ausente. Por todas as oportunidades de trabalho e viagens que sempre foram abundantes e por oferecer sempre o máximo que nós podíamos aproveitar.

À minha amiga Marilene, por estar sempre ao meu lado para tudo, nos momentos bons, nos momentos ruins, para passear e para trabalhar (muito!). Por verdadeiramente compartilhar uma vida e por ser praticamente uma irmã.

À Ana Paula Lepique, por me mostrar o mundo da ciência de forma tão brilhante, sendo sempre um exemplo de talento, garra, humildade e generosidade.

Aos amigos Adriana Mercadante, Silvio Zanata e Kil Sun Lee por me receberem de braços abertos no laboratório, por servirem de exemplo de dedicação, sabedoria, generosidade e respeito ao próximo.

A Carol Lembke por me mostrar que a ciência nacional tem futuro e por me mostrar o prazer de ensinar.

Ao Prof. Saul Jacchieri (em memória) por compartilhar conosco sua sabedoria.

Ao Prof. Rafael Linden e Luciana Chiarini, Prof. Silvio S. Veiga, Prof. Ivan Izquierdo e alunos pelas gratificantes colaborações que geraram tantos frutos no trabalho e na amizade.

Aos colegas do laboratório de Biologia Celular de Molecular: Adriana, Angelita, Camila, Cinthia, Cleiton, Eliane, Fernanda, Flávia, Gabriel, Michele, Pâmela, Regina, Rosa, Tatiana pela companhia, amizade e respeito.

Aos colegas do laboratório da Virologia: Enrique, Laura, Lara, Patrícia Sávio, Tatiana e demais alunos pelas risadas (que foram muitas), pela amizade e pelos empréstimos.

Prof. Luis Fernando Lima Reis, Adriana Abalen, Alex Fiorini, Suzana, Vladimir, Luciana, Bia e demais alunos, pelas conversas animadas, pela ajuda em momentos difíceis e pelos reagentes emprestados.

Aos colegas Roseli, Carlinhos e Myiuki pela competência e dedicação durante todo este tempo.

A todos os funcionários do Instituto Ludwig, em especial Léia, Isabel, Sr. Eudes, Sr. Luís, Sr. Sampaio, Sr. Vanderlei, Sr. Ricardo e Sr. João pela pronta atenção e auxílio.

À minha família, meus avós tios e primos, por todos estes anos de carinho e apoio incondicional.

A todos aqueles que participaram dos trabalhos aqui inclusos, pela fortuita colaboração e pela extrema competência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro.

## Sumário

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
PREFÁCIO.....	9
ABREVIATURAS.....	11
I. INTRODUÇÃO.....	13
I.1- Prion e Prion Celular.....	14
I.2- Prion e Doenças Priônicas.....	19
I.3- PrPc - Estrutura e Padrão de Expressão.....	24
I.4- PrPc- Funções.....	27
I.5 - PrPc e Laminina.....	30
I.6 - Vitronectina.....	32
I.7 - PrPc e STI1.....	38
I.8 - O Sistema Nervoso.....	39
II. OBJETIVOS.....	44
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
III.1 - Caracterização Bioquímica e Funcional da Interação PrPc-Vn.....	47
III.2 - Ensaio Adicional do Estudo da Ligação PrPc-Vn.....	88
III.2.1 - Estudos sobre a conservação evolutiva da ligação PrPc-Vn.....	90
III.2.2- O efeito de Vn e Ln sobre neurônios de sistema nervoso central ou periférico.....	93
III.2.3- Ação de STI1 no sistema nervoso periférico e combinação dos três ligantes neste modelo.....	97
III.3 - Caracterização da Proteína STI1 como Ligante de PrPc e Evidências de seu Papel na Neuroproteção da Retina.....	107
III.4 - O Papel da Interação PrPc-STI1 no Mecanismo de Formação de Neuritos e Neuroproteção.....	119
III.5 - O Papel da Interação PrPc-Ln no Mecanismo de Formação da Memória.....	147
IV. CONCLUSÕES.....	175
V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	178
CURRICULUM VITAE.....	199



## Resumo

Prions são agentes etiológicos das encefalopatias espongiformes transmissíveis, doenças que acometem tanto homens quanto animais. A proteína infecciosa, PrP<sup>sc</sup>, é uma isoforma de uma proteína celular normal denominada PrP<sup>c</sup>.

As funções de PrP<sup>c</sup> ainda causam controvérsia na literatura, mas já foi demonstrada a participação de PrP<sup>c</sup> em uma variedade de fenômenos biológicos, como homeostase de íons cobre, proteção contra estresse oxidativo, sinalização celular e neuritogênese entre outros.

A interação de PrP<sup>c</sup> com laminina, uma proteína de matriz extracelular, leva a formação e manutenção de neuritos em neurônios hipocâmpais. Seguindo este caminho, demonstramos no presente trabalho a interação de PrP<sup>c</sup> com outra proteína de matriz extracelular, vitronectina (Vn). Esta interação também leva ao crescimento neurítico, tanto em células do sistema nervoso central quanto do sistema nervoso periférico. No sistema nervoso periférico, a ausência de PrP<sup>c</sup> é compensada por integrinas, no fenômeno da neuritogênese.

Relatamos também que a interação de PrP<sup>c</sup> com STI1, uma co-chaperonina, leva tanto a neuritogênese quanto a neuroproteção por vias de sinalização distintas.

A ligação de PrP<sup>c</sup> com Vn e STI1 se dá através de domínios contíguos, de modo que as interações são excludentes sendo aquela com Vn mais favorável, como observado em ensaios de ligação *in vitro*, quanto através do fenômeno de neuritogênese.

Já a ligação de laminina se dá em um domínio distante daqueles de ligação à Vn e STI1. Assim, pode ser observada cooperatividade entre laminina e STI1 no fenômeno da neuritogênese. Por fim, demonstra-se que a interação PrP<sup>c</sup>-laminina *in vivo* é importante para os mecanismos de consolidação da memória.

## Abstract

Prions are involved in numerous neurodegenerative diseases in humans and animals called transmissible spongiform encephalopathies. PrP<sup>sc</sup>, the infectious protein, is an isoform of a normal cellular protein named PrP<sup>c</sup>.

PrP<sup>c</sup> functions are still under debate, among them Cu<sup>++</sup> homeostase, protection against oxidative stress, cell survival signaling and neuritogenesis.

PrP<sup>c</sup> interaction with laminin (Ln), an extracellular matrix protein, leads to neurite growth and maintenance. PrP<sup>c</sup> interaction with another extracellular matrix protein, vitronectin (Vn) is here demonstrated. This association leads to neurite growth in hippocampal and dorsal root ganglia cells. In dorsal root ganglia cells, PrP<sup>c</sup> ablation can be compensated by integrins, at least in the neuritogenesis phenomenon.

PrP<sup>c</sup> is also a cellular ligand for STI1, a co-chaperone, mediating neuritogenesis or neuroprotection, depending on the activated cell signaling pathway.

Vn and STI1 binding sites at the PrP<sup>c</sup> molecule are localized in contiguous domains what makes their binding to PrP<sup>c</sup> mutually exclusive. The first is more favorable, as observed *in vitro* and *ex vivo*.

On the other hand, Ln binding site at PrP<sup>c</sup> is confined to a domain distinct from those where Vn or STI1 associate. Furthermore, laminin and STI1 have additive effects on neurite outgrowth. The importance of PrP<sup>c</sup>-Ln interaction is also observed *in vivo*, since the complex participates in memory consolidation mechanisms.

## Prefácio

Esta tese somente pôde ter sido realizada através da união entre a pós-graduação do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e o Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer. Seguindo o espírito destes Institutos, a colaboração com outros colegas foi marca deste trabalho e resultou num número de resultados bastante relevantes no entendimento do modelo de estudo. Muito disto não seria atingido sem a participação de vários colegas e colaboradores que serão citados ao longo deste trabalho.

Assim sendo, esta tese compreende cinco trabalhos independentes. Os dois primeiros constituem-se no que foi o principal objeto de estudo desta tese e os demais apresentam projetos colaborativos para os quais esta autora apresentou significativa contribuição. Além disso, estes trabalhos contribuem para que se possa ter uma visão mais ampla dos fenômenos estudados pelo grupo: a biologia da proteína prion celular. Por estas duas razões, incluiu-se nesta tese trabalhos que não formam seu objetivo inicial.

O primeiro trabalho está apresentado sob a forma de manuscrito submetido para publicação, o segundo apresenta resultados que ainda não formam um conjunto ideal para ser convertido em manuscrito, mas que, no entanto, enriquece o conhecimento sobre o fenômeno biológico que gostaríamos de aqui demonstrar. O terceiro trabalho é um manuscrito já publicado em revista científica e os dois últimos estão na forma de manuscritos submetidos à publicação.

A formatação desta tese foi feita da seguinte forma: uma introdução completa, objetivos, e um capítulo que agrupa resultados e discussão, onde se encontram os trabalhos descritos acima. Uma conclusão sobre o conjunto dos cinco trabalhos e o panorama até agora traçado sobre a biologia da proteína prion celular será feita no capítulo final. A fim de poupar os leitores desta tese de repetições desnecessárias os materiais e métodos somente serão descritos nos

manuscritos que aqui se encontram. As referências bibliográficas de cada manuscrito acompanham-no e aquelas que são parte do texto integral da tese agrupam-se no capítulo de referências bibliográficas.

## Abreviaturas

BSE- encefalopatia espongiforme bovina  
cAMP - adenosina monofosfato cíclico  
CREB - “cAMP response element binding protein”  
CJD- doença de Creutzfeld-Jakob  
DNA- ácido desoxirribonucléico  
DRG - gânglio da raiz dorsal  
ECM - matriz extracelular  
FAK - “focal adhesion kinase”  
FFI- insônia familiar fatal  
FGF - fator de crescimento de fibroblastos  
GFP- proteína fluorescente verde  
GPI- glicosil-fosfatidil-inositol  
GSS- doença de Gerstmann-Sträussler-Scheinker  
Hop - “human heat shock cognate protein 70”  
Hsp70 - proteína de choque térmico de 70kDa  
Hsp90 - proteína de choque térmico de 90kDa  
IGFs- “insulin-like growth factors”  
kDa- kiloDalton  
Ln - laminina  
MAPK- proteína quinase ativada por mitógenos  
nCAM- “neural cell adhesion molecule”  
NMR - ressonância nuclear magnética  
nNOS- óxido nítrico sintase neuronal  
p53- proteína de 53 kiloDaltons  
PAI-1 - inibidor do ativador de plasminogênio 1  
PKC -proteína quinase C  
PDGF - fator de crescimento derivado de plaquetas

PI3K- fosfatidil-inositol-3 quinase  
Pint1- "Prion interactor 1"  
PKA - proteína quinase dependente de AMP cíclico  
PrPc- proteína prion celular  
PrPsc - proteína prion scrapie  
PrPres - proteína prion resistente à proteólise limitada  
*Prnp*- gene da proteína prion celular  
RGD - tripeptídeo arginina- glicina -ácido aspártico  
RNA- ácido ribonucléico  
SAF- fibrilas associadas a Scrapie  
SOD- superóxido dismutase  
STI1- "Stress Inducible Protein 1"  
vCJD - nova variante da doença de Creutzfeld-Jakob  
Vn - vitronectina  
TNF - fator de necrose tumoral  
TSEs- encefalopatias espongiformes transmissíveis  
uPA- ativador de plasminogênio tipo uroquinase  
uPAR - receptor de uPA

## I. Introdução

Prions são conhecidos como partículas infecciosas exclusivamente protéicas e sua importância reside principalmente no próprio conceito de sua existência, que provoca a quebra do dogma central da biologia molecular, o qual diz que o DNA e o RNA são as únicas moléculas a transmitir informações hereditárias.

Outro fator que coloca os prions em um grau elevado de importância é o seu papel como agente causador de muitas doenças neurodegenerativas tanto hereditárias quanto transmissíveis, que são denominadas TSEs ou encefalopatias espongiformes transmissíveis, que acometem tanto homens quanto animais.

A literatura a respeito dos prions, as doenças relacionadas, mecanismos de disseminação e sobre sua isoforma celular normal têm crescido muito nos últimos anos. Esta avalanche de estudos sobre o tema (a entrada “prion” no sistema de busca PubMed nos traz 6.149 trabalhos sobre o tema, em pesquisa realizada no dia 7 de Outubro de 2004) o que torna muito difícil abordarmos nesta tese profundamente todos os aspectos que se conhece hoje sobre a biologia dos prions. Será feita uma breve introdução sobre as doenças priônicas, seu mecanismo de transmissão e um histórico sobre a descoberta dos prions como proteínas capazes de transmitir informação de um organismo para outro. O foco desta tese, no entanto, será dado para a proteína prion celular, PrP<sup>c</sup>. Esta proteína, de função desconhecida até a alguns anos atrás também foi amplamente estudada e nos dias de hoje, suas funções revelam-se mais amplas e complexas do que se imaginava, passando por proteção contra estresse oxidativo, neuroproteção, apoptose, neuritogênese, proliferação celular, metabolismo de íons cobre e câncer.

## I.1- Prion e Prion Celular

O estudo das doenças priônicas e dos prions começou no início do século XX, mas até hoje nem todas as questões encontram-se esclarecidas. Na tabela 1, estão citados os trabalhos que mais contribuíram para criar o modelo que temos hoje.

O mecanismo de ação dos prions começou a ser estudado a partir da criação de um modelo experimental de transmissão de *scrapie*, uma doença neurodegenerativa que atinge ovelhas e cabras e que é conhecida há cerca de 300 anos. Isto se deu primeiramente com a transmissão experimental de *scrapie* para cabras e ovelhas (Cuille and Chelle, 1939), seguido pela criação de um modelo murino da doença (Chandler, 1961). O modelo murino das doenças priônicas deu impulso às pesquisas na área, pela facilidade de manipulação destes animais e por abreviar significativamente o curso da doença.

A partir da criação dos modelos experimentais, os avanços na pesquisa foram dados pela purificação e caracterização do agente infeccioso a partir de extratos de cérebros de animais infectados. Na década de 1980, Prusiner e colaboradores conseguiram obter uma fração muito enriquecida do agente infeccioso através de centrifugação diferencial, extrações com detergentes, proteólise limitada, precipitação com sulfato de amônio e eletroforese (Prusiner et al., 1980). O material obtido mostrou-se insolúvel e com características de material amilóide (coloração por vermelho Congo e birrefringência sob luz polarizada). Em microscopia eletrônica da transmissão o agente infeccioso mostrou-se como pequenos agregados fibrilares conhecidos como SAF (*scrapie* associated fibrils) ou “prion rods” (Merz et al., 1981; Prusiner et al., 1983). Estes agregados também foram observados em material proveniente de CJD e kuru (Merz et al., 1984). A característica mais marcante, no entanto, deste material, é



sua resistência a proteólise limitada, que origina um fragmento protéico de peso molecular aparente de 27-30 kDa (Bolton et al., 1982;McKinley et al., 1983).

A partir destes dados e da observação de que a infectividade de extratos contendo o agente infeccioso causador do *scrapie* não é sensível a agentes que sabidamente inativam DNA (Alper et al., 1967), Stanley Prusiner propôs a hipótese de infecção mediada apenas por proteína (protein only hypothesis). Esta diz que o agente causador do *scrapie* seria uma partícula protéica infecciosa, denominada “proteinaceous infectious particle” ou prion (Prusiner, 1982). Embora esta hipótese já tivesse sido sugerida uma década antes (Griffith, 1967;Gibbons and Hunter, 1967), ela tomou força somente após as purificações do agente infeccioso realizadas por Prusiner e seus colaboradores.

O agente infeccioso purificado foi então utilizado para a produção de anticorpos. Estes foram capazes de, assim como esperado, reconhecer uma proteína de 27-30kDa em extratos de cérebro de animais infectados e submetidos à proteólise limitada que estava ausente nos extratos de animais não infectados. Curiosamente, nos extratos protéicos não submetidos à proteólise, os anticorpos reconheciam uma banda com cerca de a 30-35kDa, tanto de animais infectados quanto de animais não infectados. Isto indicava que em animais normais havia algum homólogo do agente infeccioso (Oesch et al., 1985). O sequenciamento da proteína reconhecida por este anticorpo tornou possível a síntese de oligonucleotídeos e a clonagem de um gene que codifica para este homólogo do agente infeccioso. Assim, a proteína infecciosa foi denominada proteína prion *scrapie*, ou PrP<sup>sc</sup>, e sua isoforma celular normal proteína prion celular ou PrP<sup>c</sup> (Basler et al., 1986).

Posteriormente, verificou-se que ambas possuem a mesma seqüência de aminoácidos (Turk et al., 1988) no entanto com conformações diferentes; PrP<sup>c</sup> é rica em  $\alpha$ -hélices e pobre em folhas  $\beta$ , enquanto PrP<sup>sc</sup> é rica em folhas  $\beta$  e pobre em  $\alpha$ -hélices (Pan et al., 1993). A proteína normal é solúvel e susceptível à

digestão com proteases, já a forma infecciosa apresenta-se muito insolúvel e resistente à proteólise limitada (Meyer et al., 1986).

Essas propriedades bioquímicas de PrP<sup>sc</sup> favorecem a formação de agregados insolúveis e corroboram a teoria da transmissão mediada somente por proteínas proposta por Prusiner, onde a isoforma infectante formaria dímeros com a isoforma normal mudando sua estrutura. De acordo com este modelo, moléculas de PrP<sup>sc</sup> seriam exponencialmente geradas a partir de PrP<sup>c</sup>, e se depositariam lenta e progressivamente causando morte neuronal (Prusiner, 1989).

Uma das principais evidências que suporta esta hipótese é a de que animais deficientes para o gene que codifica PrP<sup>c</sup> não têm deposição de PrP<sup>sc</sup> no cérebro nem apresentam sintomas de doenças neurodegenerativas quando inoculados com extratos cerebrais de animais infectados. Além disso, a reintrodução do gene de PrP<sup>c</sup> restaura a susceptibilidade a infecção (Bueller et al., 1993).

Recentemente, outro trabalho acrescentou dados a favor da hipótese dos príons. Foram construídos animais que expressam o gene de PrP<sup>c</sup> na vida embrionária mas que, a partir de 9 semanas após o nascimento deixam de expressar a proteína somente nos neurônios. Quando animais que ainda expressam PrP<sup>c</sup> são infectados com *scrapie*, eles adquirem a doença mas a partir do momento em que o gene de PrP<sup>c</sup> deixa de ser expresso nos neurônios, todos os sintomas da doença são revertidos. Isto ocorre apesar de um grande acúmulo de partículas amilóides em todo o cérebro, demonstrando que a progressão da infecção nas células da glia não é capaz de levar a neurodegeneração (Mallucci et al., 2003).

A conversão de moléculas de PrP<sup>c</sup> recombinantes em moléculas resistentes à digestão proteolítica (PrP<sup>res</sup>) já havia sido conseguida há algum tempo (Kocisko et al., 1994). No entanto, o achado recente de que estas moléculas

podem causar infecção transmissível, é uma das provas mais contundentes a favor da teoria que supõe que o agente infeccioso seja constituído apenas de proteína (Legname et al., 2004).

As moléculas de prion não apresentam um comportamento uniforme no que se refere ao tempo de incubação necessário para produzir doenças, à distribuição das lesões e dos depósitos amilóides (Bruce, 2003). Este fenómeno levou à definição de cepas de prions e verificou-se também que estas se diferenciam por padrão eletroforético e por estrutura secundária (Aucouturier et al., 1999). A cepa original é transmitida para o hospedeiro que irá reproduzir as características do inóculo, assim, um mesmo animal é capaz de reproduzir várias cepas e apresentar os sintomas característicos de cada doença inoculada (Telling et al., 1996).

Um ponto muito discutido e pesquisado é de que forma os prions ingeridos na dieta chegam até o cérebro. Acredita-se que o prion deve se replicar em órgãos linfóides como baço e linfonodos antes de atingir o sistema nervoso, mas isto pode variar entre cada cepa de prions. Diferentes cepas podem levar à diferentes rotas de replicação periférica. Após a administração oral, há um acúmulo de PrP<sup>sc</sup> no íleo distal e nas placas de Peyer no intestino. Elementos do sistema imune como as células dendríticas foliculares e os linfócitos B também são importantes na propagação da infecção, e neste caso, haveria a transferência de PrP<sup>sc</sup> do sistema imune para o sistema nervoso periférico (Aguzzi et al., 2004). Além disso, foi recentemente demonstrada a passagem direta de PrP<sup>sc</sup> pela barreira hemato-encefálica (Banks et al., 2004).

Tabela 1: Histórico das descobertas mais relevantes na biologia dos prions.

Ano	Descoberta
1898	Primeira descrição científica do <i>scrapie</i> (Besnoit and Morel, 1898)
1920	Primeira descrição científica de CJD (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921)
1939	Transmissão experimental de <i>scrapie</i> (Cuille <i>et al.</i> , 1939)
1957	Primeira descrição científica do kuru (Gajdusek and Zigas, 1957)
1959	Similaridades entre kuru e <i>scrapie</i> são observadas (Hadlow, 1959)
1961	Múltiplas cepas do agente causador do <i>scrapie</i> (Pattison and Millson, 1961)
1961	<i>scrapie</i> é transmitido experimentalmente para camundongos (Chandler, 1961)
1963	Transmissão experimental de kuru para chimpanzés (Gajdusek <i>et al.</i> , 1966)
1966	Agente do <i>scrapie</i> é resistente à irradiação (Alper <i>et al.</i> , 1966; Alper <i>et al.</i> , 1967)
1967	Hipótese da transmissão através de proteínas (Griffith, 1967)
1968	Transmissão de CJD para chimpanzés (Gibbs, Jr. <i>et al.</i> , 1968)
1980	Extrato de <i>scrapie</i> é rico em proteína resistente à digestão (Prusiner <i>et al.</i> , 1980)
1982	Surge o conceito de prion (Prusiner, 1982)
1985	Clonado o gene que codifica PrPc (Oesch <i>et al.</i> , 1985; Chesebro <i>et al.</i> , 1985)
1986	PrPc e PrPsc são codificados pelo mesmo gene (Basler <i>et al.</i> , 1986)
1987	Primeira descrição de BSE (Wells <i>et al.</i> , 1987)
1989	Mutações no gene de PrPc causam GSS (Hsiao <i>et al.</i> , 1989)
1992	Construção de camundongo deficiente para PrPc (Bueler <i>et al.</i> , 1992)
1993	Camundongos sem PrPc não são infectados por <i>scrapie</i> (Bueler <i>et al.</i> , 1993)
1993	Diferenças estruturais entre PrPc e PrPsc (Pan <i>et al.</i> , 1993)
1994	Transformação de PrPc em PrPres em sistema acelular (Kocisko <i>et al.</i> , 1994)
1996	Descrição de vCJD (Will <i>et al.</i> , 1996)
1996	PrPsc de BSE possui padrão de glicosilação único (Collinge <i>et al.</i> , 1996)
1996	NMR de PrPc (Riek <i>et al.</i> , 1996)
1997	vCJD é causado por infecção de BSE (Bruce <i>et al.</i> , 1997; Hill <i>et al.</i> , 1997)
2000	Transmissão experimental de BSE via transfusão de sangue (Houston <i>et al.</i> , 2000)
2003	Depleção de PrPc em neurônios reverte sintomas de TSEs (Mallucci <i>et al.</i> , 2003)
2004	PrPc recombinante pode ser convertido em infeccioso (Legname <i>et al.</i> , 2004)

Adaptado de (Aguzzi and Polymenidou, 2004).

## 1.2- Prion e Doenças Priônicas

Entre os animais, o *scrapie* é a doença conhecida há mais tempo, sendo que sua primeira descrição científica data de 1898 (Besnoit et al., 1898) mas foram encontrados relatos da doença que datam do império romano (Narang, 1987a;Narang, 1996). Os animais afetados apresentam excitabilidade, coceira, ataxia e paralisia, sendo seu curso até a morte do animal acometido, muito curto após o aparecimento dos sintomas (Narang, 1987b). Assim como todas as demais doenças priônicas, o *scrapie* é incurável e fatal em 100% dos casos. O tecido nervoso apresenta modificações histopatológicas importantes, com a formação de extensos vacúolos, gliose e intensa perda de células neuronais. Além disso, também podem ser observados depósitos de amilóides (Wells and Wilesmith, 1995).

A encefalopatia espongiforme animal mais popular, entretanto é a bovina ou BSE, também chamada de “doença da vaca-louca”. Os sintomas iniciais são: ansiedade, nervosismo, comportamento apreensivo e agressão. São seguidos por alterações de marcha, dificuldade de se levantar, ataxia das patas posteriores e perda de peso. As alterações histopatológicas são as mesmas que as observadas em ovelhas com *scrapie*, sendo a extensa vacuolização do cérebro a característica mais marcante (Narang, 1996).

A BSE é uma doença relativamente nova, sendo os primeiros 10 casos descritos no sul da Inglaterra em 1986. Sua causa mais provável é a introdução de carcaças de ovelhas contaminadas com *scrapie* na manufatura de rações comerciais para o gado bovino. A modificação no processo de manufatura das carcaças para ração na década de 70, resultou na não eliminação das partículas de prions que eram então ingeridas pelo gado bovino (Wilesmith et al., 1991). Deste fato resultou uma epidemia de BSE na Inglaterra na década de 80, com

quase 400.000 animais afetados (Wells et al., 1995). A grande preocupação, no entanto, se relaciona com o longo curso da fase assintomática das doenças priônicas, que fez com que muitos animais fossem abatidos para o consumo antes do aparecimento dos primeiros sinais clínicos.

Além destes animais, outras espécies também são afetadas pelas encefalopatias. Gatos domésticos (Wyatt et al., 1991) e grandes felinos em cativeiro (“transmissible feline encephalopathy”), ruminantes em cativeiro além de primatas não humanos são acometidos por doenças priônicas de origem claramente relacionada a alimentação com carcaças de animais contaminados. Por outro lado, cervos e antílopes selvagens (“chronic wasting disease”) e martas em cativeiro (“transmissible mink encephalopathy”) são acometidos por encefalopatias de origem desconhecida, sendo que nos primeiros animais estas doenças têm ocorrência natural na população, assim como o *scrapie* (Sigurdson and Miller, 2003).

Em humanos as doenças priônicas possuem caráter adquirido, esporádico ou hereditário. Entre as doenças priônicas adquiridas a primeira a ser descrita foi o kuru. Esta foi observada na década de 1950, entre nativos da Papua Nova Guiné. Várias evidências apontam para que a doença tenha se disseminado devido aos costumes de canibalismo das tribos locais, especialmente de mulheres e crianças que ingeriam o cérebro de parentes mortos (Gajdusek et al., 1957). Suspeita-se que a transmissão tenha sido devida a ingestão de carne de algum portador de doença priônica esporádica ou hereditária. Com a extinção do canibalismo nesta região na década de 1960, a incidência de kuru diminuiu radicalmente (Gajdusek, 1977).

Esta enfermidade de curso clínico que varia de três a seis meses manifesta-se por ataxia progressiva, tremores no corpo, alterações emocionais, perda da locomoção e do controle de vários músculos do corpo. As alterações

histopatológicas presentes no cérebro dos indivíduos afetados incluem vacuolização, astrogliose e deposição de placas amilóides (Gajdusek et al., 1957).

A doença priônica que afeta o maior número de indivíduos é, sem dúvida, a doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), assim denominada pois os primeiros casos desta enfermidade foram descritos por Creutzfeldt em 1920 e por Jakob em 1921. CJD pode possuir caráter esporádico, adquirido ou hereditário, sendo a última forma responsável por aproximadamente 15% dos casos (Masters et al., 1981). CJD acomete homens e mulheres na faixa etária dos 60 anos, sendo diagnosticado um caso por 1.000.000 de pessoas por ano. A sintomatologia inclui desordens visuais, perda de memória e movimentos mioclônicos, sendo que o curso da doença é em geral de 12 meses após o aparecimento dos sintomas (Richardson, Jr. and Masters, 1995). As alterações histopatológicas são as mesmas observadas nas outras doenças priônicas.

As formas adquiridas de CJD são as mais comuns e se caracterizam pelo aparecimento da doença por contaminação iatrogênica. Já foi verificada a transmissão através do tratamento de crianças com hormônio de crescimento, retirado da glândula pituitária de cadáveres de indivíduos portadores desta doença. Vários casos foram relatados no mundo todo (Collinge et al., 1991) e inclusive no Brasil (Caboclo et al., 2002).

A transmissão de CJD por transplante de dura-máter e córnea de indivíduos com doenças priônicas (Lang et al., 1998; Croes et al., 2001), além daquela causada por material cirúrgico contaminado, já foram demonstradas (Flechsig et al., 2001). Mais recentemente, foi sugerida a possibilidade da transmissão de CJD por transfusão de sangue ou hemoderivados (Llewelyn et al., 2004; Peden et al., 2004).

Já a via oral de transmissão também foi documentada através do contágio experimental para animais (Prusiner et al., 1985; Bons et al., 1999; Herzog et al., 2004). Esta via seria a responsável pela transmissão de BSE para humanos,

criando a mais nova forma de doença priônica humana, denominada nova variante de CJD ou vCJD. As características moleculares de vCJD (padrão de migração eletroforética) são muito diferentes daqueles apresentados nos casos de CJD esporádicas ou hereditárias, no entanto são muito parecidas com a BSE transmitida experimentalmente para camundongos, felinos e macacos (Collinge *et al.*, 1996). Além disso, tanto a transmissão de BSE quanto de vCJD para camundongos (Scott *et al.*, 1999) já foi documentada, sendo a sintomatologia e o fenótipo molecular de BSE transmitida para camundongos idênticos ao de vCJD (Asante *et al.*, 2002b).

A forma esporádica ou espontânea de CJD é assim chamada por acreditar-se em conversões espontâneas da proteína celular para a forma infecciosa, pois nestes casos não foi possível associá-la a mutação genética, exposição ao agente infeccioso ou a qualquer outro fator que indique sua causa (Will, 2003).

As formas hereditárias das doenças priônicas podem ser causadas por uma das cerca de 20 mutações já descritas no gene que codifica a molécula de PrP<sup>c</sup>, como pode ser observado na tabela 2. Elas causam as doenças CJD, Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) ou Insônia Familiar Fatal (FFI) em caráter mendeliano autossômico dominante com penetrância completa.

GSS, assim como as outras doenças priônicas hereditárias, é autossômica dominante e se caracteriza por anormalidades que incluem ataxia, tremores, dificuldades de locomoção, distúrbios da fala, irritabilidade, comportamento descontrolado e redução da capacidade intelectual. Os achados histopatológicos mostram deposição de placas amilóides e degeneração espongiiforme (McKintosh *et al.*, 2003).

A FFI manifesta-se em média aos 48 anos de idade e causa distúrbios do sono, do sistema endócrino e motor. As mutações que levam a esta doença ocorrem nos resíduos 178 Asp → Asn ou 200 Glu → Lys, interessante estas duas mutações também podem levar ao aparecimento de CJD. O fator



determinante, de uma doença e não da outra é um polimorfismo na molécula de PrPc situado no aminoácido 129, que pode ser valina ou metionina. A mutação no códon 178 acompanhada do genótipo V129V ou M129V predispõe para o desenvolvimento de CJD, enquanto que acompanhada de M129M predispõe à FFI (Medori et al., 1992).

Tabela 2: Principais mutações descritas no gene de PrPc associadas a doenças. As referências são as dos autores que citaram as mutações em associação com as doenças pela primeira vez.

Códon	Mutação	Doença Associada	Referência
51-90	Inserção de 48 a 216 pb	CJD/GSS	(Goldfarb et al., 1993)
102	Pro/Leu	GSS	(Doh-ura et al., 1989)
105	Pro/Leu	GSS	(Yamada et al., 1993)
117	Ala/Val	GSS	(Doh-ura et al., 1989)
131	Gly/Val	GSS	(Panegyres et al., 2001)
145	Tyr/STOP	GSS	(Ghetti et al., 1996)
171	Asn/Ser	Esquizofrenia	(Samaia et al., 1997)
178	Asp/Asn	FFI/CJD	(Medori et al., 1992)
180	Val/Ile	CJD	(Kitamoto et al., 1993)
183	Thr/Ala	CJD	(Nitrini et al., 1997)
187	His/Arg	GSS	(Cervenakova et al., 1999)
188	Thr/Lys	Demência	(Finckh et al., 2000)
196	Glu/Lys	CJD	(Peoc'h et al., 2000)
198	Phe/Ser	GSS	(Hsiao et al., 1992)
200	Glu/Lys	CJD/FFI	(Inoue et al., 1994)
202	Asp/Asn	GSS	(Piccardo et al., 1998)
208	Arg/His	CJD	(Mastrianni et al., 1996)
210	Val/Ile	CJD	(Pocchiari et al., 1993)
211	Glu/Gln	CJD	(Peoc'h et al., 2000)
212	Gln/Pro	GSS	(Piccardo et al., 1998)
217	Gln/Arg	GSS	(Hsiao et al., 1992)
232	Met/Arg	CJD	(Kitamoto et al., 1993)

Fonte: (Castro, 2004)

Os relatos acima então nos levam à conclusão de que as doenças priônicas possuem o caráter singular de se apresentarem de forma infecciosa e hereditária ao mesmo tempo. Além disso, é praticamente estabelecida a importância da proteína PrP<sup>sc</sup> no mecanismo de formação e transmissão das doenças priônicas. Já o papel de sua isoforma celular, PrP<sup>c</sup>, é ainda bastante controverso.

Na hipótese de ganho de função, imagina-se que PrP<sup>c</sup> seria um mero receptor para PrP<sup>sc</sup>, cuja única função seria converter-se em isoforma patogênica. Neste caso, o aparecimento de uma doença seria devido ao acúmulo de isoformas tóxicas. Na hipótese de perda de função, PrP<sup>c</sup> estaria exercendo alguma função essencial na célula. Neste caso, sua conversão na isoforma patogênica estaria prejudicando as funções normais e desencadeando a doença. Foi acreditando nesta hipótese que muitos grupos passaram a estudar a proteína prion celular, que hoje se revela envolvida em diversos fenômenos biológicos.

### I.3- PrP<sup>c</sup> – Estrutura e Padrão de Expressão

PrP<sup>c</sup> é uma sialo-glicoproteína altamente conservada codificada por um gene (*Prnp*) presente no cromossomo 20 em humanos e 2 em camundongos (Oesch et al., 1985; Chesebro et al., 1985). Sua conservação evolutiva pode ser demonstrada após sua clonagem em vários mamíferos, inclusive marsupiais, além de aves (Gabriel et al., 1992), répteis (Simonic et al., 2000), anfíbios (Strumbo et al., 2001) e peixes (Oidtmann et al., 2003). O gene de PrP<sup>c</sup> em camundongo, ovelha, rato, e gado contém 3 exons, e a fase aberta de leitura inicia-se no exon 3, de modo que não podem haver variantes provenientes de “splicing” alternativo (Basler et al., 1986).

A proteína PrP<sup>c</sup> de várias espécies possui aproximadamente 250 aminoácidos, dos quais os primeiros 22 na extremidade amino-terminal

constituem em sinal de localização para membrana que é removido da proteína madura. Os últimos 23 aminoácidos, na extremidade carboxi-terminal também são clivados, durante a adição de uma âncora de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) na molécula. Como a maioria das proteínas de superfície celular, PrPc é sintetizado pelos ribossomos concomitantemente com seu transporte para o retículo endoplasmático (Kim and Hegde, 2002). Lá ele sofre modificações pós-traducionais, como adição da âncora de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), N-glicosilação nos resíduos 181 e 197 (em hamster) (Prusiner, 1998) e é transportado até a membrana extracelular por meio de vesículas. Na membrana celular PrPc está localizado em domínios de membrana ricos em colesterol denominados "rafts" (Madore et al., 1999) e passa por um ciclo que inclui sua internalização e reciclagem para a membrana (Harris, 1999; Lee et al., 2001). Este mecanismo de internalização está sujeito a muita controvérsia, sendo alguns autores favoráveis a um mecanismo promovido por clatrina (Shyng et al., 1993; Shyng et al., 1994; Sunyach et al., 2003) ou e outros por cavéola (Kaneko et al., 1997; Marella et al., 2002; Peters et al., 2003). A internalização de PrPc também pode ser estimulada pela adição de íons cobre ao meio de cultura celular (Shyng et al., 1994), fazendo com que as moléculas sejam internalizadas para endossomos iniciais que contêm transferrina e para compartimentos do complexo de Golgi (Magalhaes et al., 2002; Brown and Harris, 2003).

A seqüência de aminoácidos de PrPc demonstra a existência de uma região repetitiva entre os resíduos 51 a 91, com 5 octapeptídeos PHGGGWGQ adjacentes (denominada região de "octarepeats"), além de uma região central altamente hidrofóbica entre os resíduos 106 a 126 (Harris, 1999). Através de estudos de modelagem molecular também foi possível prever a presença de quatro alfa-hélices (Gasset et al., 1992; Huang et al., 1994). Entretanto, estudos de NMR (ressonância nuclear magnética), comprovaram a existência de 3  $\alpha$ -hélices e duas folhas beta antiparalelas (Riek et al., 1996). Na membrana celular, PrPc sofre

clivagem proteolítica fisiológica mediada por duas desintegrinas nos aminoácidos 110/111->112 (Vincent et al., 2001).

A expressão de PrPc começou a ser estudada por Basler e colaboradores (Basler et al., 1986), que verificaram a expressão constitutiva de seu RNA mensageiro no cérebro de animais adultos. Também foi vista a expressão na medula espinhal, em gânglios periféricos e nervos (McKinley et al., 1987). No entanto, desde então há muitos outros trabalhos relatando a expressão de PrPc nas mais diferentes condições; seja durante o desenvolvimento, na localização mais precisa dentro de um tecido ou mesmo na distribuição sub-celular.

Durante o desenvolvimento, o RNA mensageiro de PrPc pode ser encontrado a partir do sexto dia de vida embrionária em galinhas, em neurônios de várias regiões do sistema nervoso central, retina e gânglios da raiz dorsal (Harris et al., 1993). Já em camundongos, foi detectado no tubo neural a partir do décimo terceiro dia de vida uterina (E13,5) (McKinley et al., 1987). Publicações recentes, no entanto, apontam uma atividade do promotor de PrPc à partir de E12,5 no cérebro e medula (Asante et al., 2002a), além disso encontrou-se expressão do mRNA de PrPc a partir de E9,5 em cérebro e medula espinhal (Miele et al., 2003). Em linhagens celulares a regulação do promotor de PrPc depende do grau de condensação da cromatina, de modo que este fator torna-se o mais importante regulador da expressão celular deste gene (Cabral et al., 2002).

Após o nascimento a expressão da proteína aumenta até atingir um pico no dia 14 pós-natal. Dependendo da região do cérebro, estes níveis se mantêm ou diminuem no animal adulto. No bulbo olfatório e no hipocampo a expressão de PrPc mantêm-se alta, enquanto diminui em outras áreas, como o córtex (Sales et al., 2002). A expressão também é diferencial de acordo com o tipo neuronal, enquanto neurônios gabaérgicos expressam grandes quantidades de PrPc, neurônios dopaminérgicos apresentam baixas concentrações da proteína. Esta regulação parece ocorrer no nível pós-transcricional, já que o RNA mensageiro é bastante abundante na maioria dos neurônios (Ford et al., 2002a). No animal

adulto, além do cérebro, PrPc foi visto em nervos periféricos, gânglios simpáticos e células componentes do sistema imune, como células dendríticas (Ford et al., 2002b).

Em relação à distribuição sub-celular, a proteína foi vista em membranas celulares pré-sinápticas (Herms et al., 1999), em axônios em crescimento (Sales et al., 2002) e no citoplasma de alguns tipos neuronais (Mironov, Jr. et al., 2003). Sua reciclagem entre a membrana plasmática e o complexo de Golgi ocorre através endossomos clássicos que apresentam a proteína Rab5, de maneira dependente de dinamina (Magalhaes et al., 2002).

#### 1.4- PrPc- Funções

Nos últimos anos a proteína PrPc, cuja função era desconhecida, foi sendo revelada como mais complexa do que se esperava, com múltiplas funções e parceiros envolvidos nos mais diferentes processos fisiológicos. Há desde associação com estresse oxidativo até ativação de linfócitos, passando por funções em células neuronais (Martins and Brentani, 2002).

Muitas proteínas estão associadas diretamente com PrPc como a proteína distroglicana, ou indiretamente, como a enzima nNOS (óxido nítrico sintase) (Keshet et al., 2000) e a molécula de adesão n-CAM (“neural cell adhesion molecule”) (Schmitt-Ulms et al., 2001). Através de ensaios de duplo-híbrido em leveduras, também foi verificada a interação de PrPc com sinapsina Ib, a proteína sinalizadora Grb2 e a então desconhecida Pint1 (Prion interactor 1) (Spielhaupter and Schatzl, 2001). Também foi descrita a associação de PrPc com heparina e heparan-sulfato (Warner et al., 2002).

Além disso, é sabido que PrPc associa-se ao íon cobre na região dos “octarepeats”, sendo esta ligação importante na estabilização estrutural da molécula (Miura et al., 1996; Brown et al., 1997a). O domínio de “octarepeats” também é importante no fenômeno de internalização da molécula em resposta a

adição de íons cobre (Perera and Hooper, 2001). Em recente trabalho do nosso grupo (Lee et al., 2001), foi empregada a construção GFP-PrPc, onde a proteína fluorescente verde, GFP, foi fusionada à molécula de PrPc, com a intenção de se obter dados quanto ao tráfego e localização celular de PrPc. Esta quimera possui localização idêntica ao PrPc endógeno e também é internalizada em resposta a adição de íons cobre. Além disso, dois mutantes com ausência dos aminoácidos 32 ao 121 e 32 ao 134 não são internalizados. Animais transgênicos expressando os mesmos mutantes apresentam disfunções neurológicas graves quando adultos (Shmerling et al., 1998).

O cobre é um elemento importante para várias enzimas envolvidas com a proteção contra estresse oxidativo e, de fato, foi observado que PrPc possui uma atividade semelhante a da enzima superóxido dismutase (Brown and Besinger, 1998). Além disso, foi visto que células de animais deficientes para PrPc são mais sensíveis a radicais livres que células normais (Brown et al., 1997a; Brown et al., 1997b; Brown et al., 2002). O que, associado ao fato da reintrodução do gene de PrPc reverter o fenótipo de sensibilidade (revisado por (Vassallo and Herms, 2003), levou a proposta que PrPc faça parte de um sistema de proteção contra o estresse oxidativo. Este, no entanto, é um ponto controverso e recentemente foi visto que animais deficientes para PrPc ou que super-expressam PrPc não possuem nenhuma alteração na atividade de superóxido dismutase, SOD (Hutter et al., 2003).

PrPc foi recentemente descrito por seu envolvimento no estímulo das vias de sinalização de Fyn quinase, fosfatidil-inositol-3 quinase (PI3K), proteína quinase dependente de cAMP (PKA) e proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), em cultura de células granulares do cerebelo, o que resultou em crescimento neurítico (Chen et al., 2003a).

A relação de PrPc com apoptose celular também foi estudada, mostrou-se que células deficientes de PrPc possuem níveis diminuídos de p53 e, deste modo, são menos susceptíveis a este tipo de morte celular programada (Paitel et al.,

2002;Paitel et al., 2003a;Paitel et al., 2003b). Contraditoriamente, relatou-se uma expressão aumentada de PrPc em linhagens de tumor de mama resistentes à apoptose induzida por TNF (fator de necrose tumoral) (Diarra-Mehrpour et al., 2004). Essa contradição reflete o panorama atual de conhecimento e sugere que ainda são necessários mais estudos para que se possa compreender os mecanismos pelos quais PrPc participa do processo de morte celular programada.

De maneira surpreendente, também foi observada a importância de PrPc no mecanismo de infecção de mamíferos por patógenos, quando mostrou-se que PrPc é necessário para a internalização de *Brucella abortus* (Watarai et al., 2003).

Trabalhos com animais deficientes para determinada proteína podem gerar muitas informações sobre sua função fisiológica. Algumas linhagens de animais deficientes para o gene PrPc foram geradas, no entanto, estas não apresentaram nenhum fenótipo grosseiramente modificado (Bueler et al., 1992;Manson et al., 1994). Por outro lado, Sakaguchi e colaboradores desenvolveram uma linhagem de camundongos deficientes para PrPc que apresentavam ataxia em consequência de degeneração progressiva de células de Purkinje (Sakaguchi et al., 1996). Mais tarde, o conflito entre fenótipos de diferentes cepas foi resolvido quando se encontrou a superexpressão de uma proteína denominada Doppel nos animais de Sakagushi. A superexpressão ocorreu devido à remoção de grandes extensões de DNA durante a construção do animal deficiente de PrPc e que acabou por gerar uma quimera onde a proteína Doppel encontrava-se sob controle do promotor de PrPc (Moore et al., 1999).

Pesquisas mais minuciosas mostraram que animais deficientes de PrPc apresentaram alguns problemas como alterações eletrofisiológicas (Collinge et al., 1994), elevada atividade motora (Roesler et al., 1999), maior sensibilidade a

agentes convulsivantes (Walz et al., 1999) e deficiência de memória de longa e curta duração em idades avançadas (Coitinho et al., 2003).

## 1.5 – PrPc e Laminina

Os primeiros trabalhos relacionando PrPc à matriz extracelular foram realizados pelo nosso grupo e descrevem a ligação de PrPc a laminina com alta afinidade e especificidade, sendo esta interação verificada tanto *in vitro* quanto *ex vivo*. Além disso, foi observado que esta interação é importante no processo de neuritogênese em linhagens celulares e culturas primárias de neurônios (Graner et al., 2000a; Graner et al., 2000b) e no mecanismo de consolidação da memória em ratos (Coitinho et al., manuscrito em anexo). Outro trabalho descreve a interação direta e via glicosamiglicanos entre PrPc e o receptor de laminina de 37kDa/67kDa, que seria indispensável no processo de internalização da proteína PrPc (Gauczynski et al., 2001; Hundt et al., 2001). Este fato reforça ainda mais a hipótese da existência de grandes complexos macromoleculares envolvendo PrPc.

Laminina é a principal proteína não colagênica da matriz extracelular e é importante para uma grande quantidade de processos biológicos, como por exemplo, embriogênese, formação de tecidos, fenômenos imunológicos entre outros. Esta é constituída de três cadeias,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , que se arranjam em forma de cruz, com os braços mais longos de cada cadeia formando uma hélice (Beck et al., 1990). Até o presente momento foram descritos cinco tipos diferentes de cadeias  $\alpha$ , três de cadeia  $\beta$  e três de cadeia  $\gamma$  o que possibilita a formação de 45 tipos diferentes em potencial desta molécula, sendo que até hoje 15 tipos já foram descritos (Colognato and Yurchenco, 2000). No hipocampo, a forma predominante é a laminina 10, composta por  $\alpha 5\beta 1\gamma 1$  (Indyk et al., 2003). Em



gânglios da raiz dorsal de animais adultos há uma alta expressão da subunidade  $\gamma 1$  (LeBeau et al., 1994), que aumenta após lesões (Le Beau et al., 1995).

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso periférico, há expressão proeminente de várias de cadeias de Ln no trajeto a ser seguido pelos axônios em crescimento, sendo a cadeia  $\gamma 1$  presente em todos os momentos (Lentz et al., 1997).

O papel da laminina no sistema nervoso é extremamente vasto e muito bem documentado (Luckenbill-Edds, 1997). Sabe-se por exemplo que a sobrevivência neuronal (Chen and Strickland, 1997; Chen and Strickland, 2003; Chen et al., 2003b) e o crescimento neurítico são dependentes da expressão de laminina e podem ser vistos tanto em neurônios do sistema nervoso central quanto periférico (Manthorpe et al., 1983; Liesi et al., 2001).

No braço longo da cadeia  $\gamma 1$  também há um domínio ativo que participa na indução de crescimento de neuritos, na migração neuronal e na regeneração do sistema nervoso (Liesi et al., 2001; Liebkind et al., 2003; Wiksten et al., 2003). Este é o domínio de laminina responsável pela ligação a PrPc, como demonstrado nos trabalhos do grupo (Graner et al., 2000a; Graner et al., 2000b).

Um dos principais receptores celulares para laminina e outras proteínas da matriz extracelular são as integrinas. Estas moléculas são compostas pela interação heterofílica e não covalente de duas subunidades denominadas  $\alpha$  e  $\beta$ . Estão envolvidas em uma variedade de fenômenos biológicos de integração da célula com a matriz extracelular que a rodeia. Entre estes estão os processos de adesão e migração celulares, formação de contatos focais e sinalização (Hynes, 1992; Hynes, 2002). No sistema nervoso também são conhecidas por sua participação nos mecanismos de plasticidade neurítica (Letourneau et al., 1988; Tomaselli et al., 1988; Condic and Letourneau, 1997; Yip and Siu, 2001).

Várias combinações de subunidades são capazes de interagir com laminina como por exemplos,  $\alpha 1\beta 1$  (Tomaselli et al., 1990),  $\alpha 3\beta 1$  (Gehlsen et al., 1992; Tashiro et al., 1999; Shang et al., 2001),  $\alpha 6\beta 1$  (Sonnenberg et al., 1991),  $\alpha v\beta 3$

(Sasaki and Timpl, 2001). Além disso, a maioria dos trabalhos mapeia o domínio de ligação a integrinas na subunidade  $\alpha$  de laminina, porém, o domínio de ligação não é o conhecido peptídeo RGD, tripeptídeo arginina-glicina-ácido aspártico responsável pela ligação de fibronectina ou vitronectina às integrinas. Por outro lado, também foi descrita a ligação de  $\alpha v\beta 3$  ou  $\alpha 5\beta 1$  na cadeia  $\gamma 1$  da laminina (Ponce et al., 2001).

## I.6 - Vitronectina

Levando-se em consideração que a interação de PrPc com Ln, observada previamente em trabalhos de nosso grupo, possuía um papel importante na extensão e manutenção de neuritos em células hipocâmpais (Graner et al., 2000a; Graner et al., 2000b); decidimos investigar se a interação PrPc-Vn também poderia exercer algum papel biológico no sistema nervoso.

Vitronectina (Vn) é uma glicoproteína abundante em diversos tecidos que está envolvida em vários processos metabólicos como adesão celular, mecanismo de defesa humoral e invasão celular.

Foi purificada a partir de soro em 1967, por Holmes, e denominada "serum-spreading factor" por ser capaz de provocar adesão celular, de modo semelhante à fibronectina (Preissner, 1991). Com o desenvolvimento de anticorpos específicos tornou-se possível verificar a presença de Vn em músculo esquelético, rins, tecido conjuntivo e membranas fetais (Hayman et al., 1983). A maior parte da Vn encontrada no plasma é proveniente do fígado, mas células do músculo liso arterial e glioblastomas também são capazes de produzi-la e secretá-la. Foi detectada sua presença também em plaquetas, macrófagos (Preissner, 1991) e células do sistema nervoso, como astrócitos e neurônios, principalmente células de Purkinje (Martinez-Morales et al., 1995; Martinez-Morales et al., 1997; Seiffert, 1997; Walker and McGeer, 1998). Também foi descrita em áreas de

fibrose e necrose em vários tecidos, incluindo doenças do sistema nervoso (Seiffert, 1997).

A fase aberta de leitura do gene de Vn codifica para uma proteína de 459 aminoácidos e peso molecular aparente de 75 kDa. Um peptídeo sinal de 19 aminoácidos sinaliza a secreção de Vn para o meio extracelular e três sítios consenso são sinais de glicosilação, sendo que os açúcares podem contribuir com cerca de 30% da massa da proteína. A vitronectina humana possui cerca de 80% de homologia com coelho e camundongo (Schvartz et al., 1999).

A molécula inteira de Vn nunca foi cristalizada e sua estrutura secundária foi proposta recentemente por Xu e colaboradores (Xu et al., 2001). Com base em modelos computacionais, foi proposta uma estrutura com três regiões principais: um domínio com homologia a somatomedina B (resíduos 1 a 53), um domínio central rico em folhas  $\beta$  (resíduos 131 a 342) e um domínio carboxi-terminal responsável pela ligação à heparina e colágeno (resíduos 347 a 359); além de um domínio com estrutura de "loop" que serve de ligação entre o domínio somatomedina B e o central. Recentemente, porém, foi cristalizado o domínio de somatomedina B, que corresponde a uma pequena porção amino-terminal da molécula (Zhou et al., 2003).

Há duas formas de Vn presentes no sangue: uma única cadeia polipeptídica de 75 kDa, e outra de duas cadeias de 65 e 10kDa interligadas por uma ponte dissulfeto (Cys<sup>274</sup>-Cys<sup>453</sup>). As duas parecem ser produtos de dois genes distintos e diferem somente no aminoácido 381. Uma metionina nesta posição dá origem à forma de 75 kDa, enquanto uma treonina cria no local um sítio de clivagem que gera a forma de 65+10 kDa. Recentemente foi descrito que este sítio seria clivado por uma serina endoprotease denominada furina, ainda durante a via secretória do fígado para o plasma (Seiger and Shaltiel, 2000).

A forma predominante de Vn na circulação é a forma monomérica. No entanto, quando submetida à desnaturação, há modificação de suas propriedades, o que induz à formação de multímeros. A proteína em sua forma

nativa praticamente não apresenta sulfidrilas livres, enquanto a forma desnaturada apresenta duas, de modo que a desnaturação aumenta a tendência de formação de pontes dissulfeto entre moléculas e, conseqüente oligomerização. Acredita-se que esta seja a forma da proteína preferencialmente encontrada na matriz extracelular. (Preissner, 1991;Zhuang et al., 1996a;Zhuang et al., 1996b).

Assim como a fibronectina, Vn possui múltiplos sítios ativos: um sítio de ligação a integrinas, um sítio de ligação a glicosaminoglicanos e um sítio de ligação ao complexo trombina-antitrombina. Além disso, aparenta ser o precursor de um peptídeo do soro, somatomedina B (Suzuki et al., 1985;Ruoslahti and Pierschbacher, 1987).

A primeira função biológica atribuída à Vn foi sua capacidade de provocar adesão celular, configurando-se na principal proteína de adesão presente no soro, sendo capaz de substituí-lo no papel de indutor da adesão (Hayman et al., 1983). Esta propriedade advém tanto da ligação com heparina quanto da interação do domínio RGD com integrinas. As integrinas ligam-se às proteínas de matriz e formam "clusters" na membrana celular, o que leva à interação com proteínas de citoesqueleto e ao mesmo tempo dispara cascatas de sinalização intracelulares. A ligação de uma proteína de matriz a diferentes integrinas depende do tipo e do ambiente celular e faz com que diferentes cascatas de sinalização possam emergir a partir da ligação de uma molécula, levando a célula a processos metabólicos distintos. Por outro lado, uma mesma integrina pode ligar-se a mais de uma proteína de matriz, resultando em perda de especificidade e redundância (Hynes, 1992;Giancotti and Ruoslahti, 1999;Hynes, 2002).

A seqüência RGD de Vn, está localizada na posição 45 a 47 (Preissner, 1991) e está encerrada no interior da Vn em sua forma monomérica de modo que a ligação à integrinas só ocorre na presença da proteína em sua forma multimérica (Seiffert and Smith, 1997). Foi observado que peptídeos do domínio RGD são capazes de inibir adesão celular a Vn (Germer et al., 1998) e diminuir a

resposta de células endoteliais a FGF (fator de crescimento de fibroblastos), inibindo a redistribuição de c-Src e a ativação de MAPK nos complexos de adesão focal (Shono et al., 2001). As principais integrinas associadas à Vn são  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  e  $\alpha_{\text{IIIb}}\beta_3$ . A integrina  $\alpha_v\beta_3$  é capaz de ligar-se tanto à Vn quanto à fibronectina, sendo a ligação à fibronectina independente de sinalização celular e a ligação a Vn dependente da fosforilação da cadeia  $\beta$  da integrina (Boettiger et al., 2001).

No que diz respeito à sua ligação com integrinas, Vn é capaz de promover o espraiamento celular de maneira dependente de  $\alpha_v\beta_3$  e mediada pela via de MAPK (Roberts et al., 2003). Já a migração estimulada por PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) depende da ligação de Vn com  $\alpha_v\beta_3$  através do aumento da atividade de Lyn quinase (Ding et al., 2003). Também foi visto que a proliferação celular e a motilidade de células de câncer de ovário são muito aumentadas pela interação Vn-  $\alpha_v\beta_3$ , em um processo que envolve a translocação de FAK ("focal adhesion kinase") e a ativação de MAPK (Hapke et al., 2003). Foi demonstrado recentemente também a translocação de paxilina para o núcleo em resposta a Vn, mas não a fibronectina ou a Ln. Esta translocação é dependente da fosforilação de paxilina por MAPK (Ogawa et al., 2003).

A região carboxi-terminal da proteína apresenta cerca de 40 resíduos catiônicos e possui incluída a seqüência consenso de ligação a heparina (aa 347-361), X-B-B-X-B-X (B: aminoácido básico). Interessantemente, a proteína purificada do soro em sua forma nativa apresenta baixa ligação a heparina. A forma multimérica, porém, possui afinidade de ligação a heparina muito maior. Isto indica que este sítio deve encontrar-se encerrado no interior da proteína em sua forma monomérica. A ligação a heparina é fundamental no mecanismo de adesão, pois o complexo liga-se a superfície celular com razoável afinidade por um mecanismo dependente de glicosaminoglicanos. A Vn multimérica ligada à superfície celular via glicosaminoglicanos pode seguir dois caminhos: ser

endocitada e degradada ou ser aproveitada na matriz extracelular; a decisão entre estes dois caminhos pode ser dependente da associação a diferentes integrinas (Francois et al., 1999). De fato, foi visto que Vn adicionada a cultura de fibroblastos interagia com  $\alpha_v\beta_5$  sendo a seguir endocitada em vesículas de clatrina e degradada (Memmo and McKeown-Longo, 1998).

Vn possui também dois sítios de ligação a colágeno, um adjacente ao sítio RGD, outro adjacente ao sítio de ligação a heparina. Há também um sítio sujeito a “crosslinking” por transglutaminase (Gln<sup>93</sup>), o que sugere a presença de matriz extracelular rica em colágeno em tecidos que contém Vn (Gebb et al., 1986;Preissner, 1991;Schvartz *et al.*, 1999).

Vn apresenta também vários possíveis sítios de fosforilação. Ela é um importante alvo de PKA extracelular, secretada por plaquetas após estímulo com trombina. É fosforilada no resíduo Ser<sup>378</sup> e em conseqüência, diminui sua afinidade pela proteína inibidora do ativador de plasminogênio (PAI-1). A fosforilação de Vn por PKC reduz sua clivagem por plasmina. Além destas duas quinases, foi demonstrado que os resíduos Thr<sup>57</sup> e Thr<sup>50</sup> podem ser fosforilados por caseína quinase II (também presente no plasma), o que modifica a atividade da proteína, aumentando sua capacidade de promover adesão celular. Também foi visto que a proteína Vn fosforilada dispara cascatas de fosforilação intracelular diferentes da Vn não fosforilada (Seger et al., 1998;Seger et al., 2001).

Apesar de suas importantes funções no organismo, camundongos deficientes do gene da Vn possuem fenótipo normal, não apresentando nenhum distúrbio de crescimento ou fertilidade. A teoria mais aceita é de que este fato seria devido à redundância na ligação com integrinas, que na ausência de Vn poderiam estar sendo ativadas por outras proteínas de matriz (Zheng et al., 1995).

Além de mediar a adesão celular, a Vn participa da regulação dos mecanismos de migração e invasão celulares. Foi verificado recentemente, que

vitronectina é capaz de estimular a protrusão celular através da ligação à proteína uPAR, que foi identificada inicialmente como receptor do ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA). Quando uPAR interage com Vn, há aumento da motilidade celular, com considerável número de protrusões, sendo demonstrado também que este mecanismo ocorre através de sinalização pela proteína Rac (Kjoller and Hall, 2001). Em células de músculo liso tanto Vn quanto uPA promovem migração e reorganização ativa do citoesqueleto, efeito mediado tanto por uPAR quanto pela integrina  $\alpha_v\beta_3$ . Além disso, o efeito provocado por Vn utiliza a via de sinalização de cAMP (Degryse et al., 2001). uPAR é ancorada na membrana celular por uma molécula de GPI (da mesma maneira que PrPc) e é capaz de elicitar respostas intracelulares por associação com outras proteínas transmembrana, como por exemplo, as integrinas.

Vn também interage, através de seus resíduos 24 a 37, diretamente com PAI-1 (inibidor do ativador de plasminogênio), uma proteína inibitória do sistema plasminogênio, que provoca proteólise para a remodelagem dos tecidos (Royle et al., 2001). A ligação é de alta afinidade sendo Vn o principal ligante deste inibidor. Como consequência, a matriz extracelular que contém Vn retém grandes quantidades de PAI-1 e está mais protegida contra proteólise mediada por plasminogênio. A laminina, por outro lado, foi vista como um dos substratos na degradação da matriz extracelular de neurônios pelo sistema plasminogênio, o que culminava com a morte celular (Chen et al., 1997). Nesse aspecto, regiões do cérebro que apresentam predominantemente Vn à laminina na matriz extracelular deveriam possuir maior resistência contra degradação da matriz e perda neuronal.

São de particular interesse as propriedades neurotróficas da Vn. A aderência celular e a expansão de neuritos foi observada tanto em linhagem celular (Grabham et al., 1992) quanto em culturas primárias de células nervosas de retina (Martinez-Morales et al., 1995), tubo neural (Martinez-Morales et al., 1997) e células de Purkinje do cerebelo (Walker et al., 1998).

## I.7 – PrPc e STI1

Com o intuito de caracterizar ligantes para PrPc , nosso grupo baseou-se em alguns dados da literatura (Forloni et al., 1993);(Gabriel et al., 1992;Shyng et al., 1993) e na teoria da hidropaticidade complementar (Brentani, 1988);(Blalock, 1990); (Baranyi et al., 1995) para desenhar um peptídeo que teoricamente deveria apresentar a mesma hidropaticidade que o domínio de ligação de uma proteína receptora/ligante de PrPc ou PrPsc (Martins et al., 1997). O peptídeo foi sintetizado e geraram-se também anticorpos contra o mesmo.

Na tentativa de identificar a proteína a qual pertencia este peptídeo, proteínas provenientes de extratos de cérebro de camundongo foram separadas em gel bi-dimensional. O anticorpo gerado contra o peptídeo foi utilizado para identificar a banda de interesse através de ensaios de “imunoblotting”. A proteína reconhecida pelo anticorpo foi então seqüenciada e revelou 100% de identidade com a proteína STI-1 ou "stress inducible protein 1".

STI1 é uma fosfoproteína induzida por estresse primeiramente descrita em *Saccharomyces cerevisiae* (Nicolet and Craig, 1989). A STI1 murina é uma co-chaperonina que possui homologia com a proteína humana Hop (“human heat shock cognate protein 70 /heat shock protein 90 -organizing protein”). Como a proteína foi inicialmente identificada em células transformadas pelo vírus de SV-40, sugeriu-se que Hop pudesse ter um papel importante na proliferação e regulação gênica, (Honore et al., 1992;Blatch et al., 1997). Tanto STI1 quanto Hop foram identificadas como componentes de complexos multiprotéicos de chaperoninas envolvendo as proteínas Hsp70 e Hsp90 (Smith et al., 1993;Schumacher et al., 1994;Chang et al., 1997). O transcrito de STI1 murino contém 2.079 pares de bases que codifica para uma seqüência de 543 aminoácidos resultando em peso molecular de aproximadamente 66 kDa.

Ensaio de ligação e de competição *in vitro* permitiram ainda identificar os sítios de ligação tanto em PrPc quanto em STI1 (Zanata et al., 2002). Nossos



dados demonstraram ainda que STI1 é capaz de induzir um efeito protetor contra morte celular programada em um modelo já estabelecido de neurônios pos-mitóticos da camada neuroblástica da retina. STI estimula tanto a via de MAPK quanto a PKA, no entanto somente esta última é relevante para o fenômeno de neuroproteção (Chiarini et al., 2002).

Além disso, modelos de estudo apontam para a participação de chaperoninas, como STI1, na cura de prion de levedura. Os prions de leveduras são várias proteínas, que de modo similar a prions de mamíferos, podem sofrer rearranjo conformacional catalítico. A mais estudada das proteínas prion de levedura é o fator de terminação de tradução Sup35, cujo estado “prion-like” é caracterizado por sua agregação, formação de fibras amilóides e inativação parcial (Patino et al., 1996). Um estudo que pretendia encontrar novos fatores capazes de promover a cura de prions de leveduras, mostrou que a superexpressão de STI1 pode interferir com a propagação e manifestação do fenótipo “prion-like” de Sup35 (Kryndushkin et al., 2002).

## I.8 - O sistema nervoso

Como já descrito anteriormente, alterações na proteína PrPc levam ao surgimento de muitas doenças neurodegenerativas. Além disso, seus ligantes de matriz extracelular, Ln e Vn, também exercem grande impacto sobre o tecido nervoso. Desta forma, os neurônios constituem um modelo de estudo muito interessante e apropriado para observar o papel biológico da interação entre PrPc e seus ligantes. Entretanto, como há vários tipos neuronais distintos, a relação entre estas moléculas e os eventos desencadeados por elas podem variar com o tipo neuronal estudado.

Os neurônios são a unidade básica do sistema nervoso e podem ser classificados de diversas maneiras diferentes, mas todas seguem a mesma arquitetura básica, com quatro regiões morfológicamente definidas: o corpo celular, os dendritos, o axônio e os terminais pré-sinápticos. O corpo celular é o

centro metabólico da célula, onde se localiza o núcleo e o retículo endoplasmático. Este pode emitir dois tipos de prolongamentos: os dendritos e um axônio. Os dendritos, processos mais curtos que os axônios ramificam-se muito e são a principal via para o neurônio receber os estímulos enviados por outras células. Já o axônio apresenta-se como uma protrusão longa e delgada do corpo celular com pouca ou nenhuma arborização e é responsável por conduzir os sinais elétricos para outras células. Próximo à sua extremidade, o axônio divide-se em ramificações menores que fazem o contato com outro neurônio, esta região é denominada de sinapse. Os sinais são transmitidos à outra célula pelos terminais das ramificações do axônio, que são denominados terminais pré-sinápticos (Kandel et al., 2000).

O principal método de classificação dos neurônios leva em conta o número e forma dos processos que a célula emite. De acordo com este critério os neurônios podem se classificados em unipolar, bipolar e multipolar. Os neurônios unipolares são os mais simples e possuem somente um processo principal que se divide, sendo uma ramificação responsável por emitir e a outra por receber os impulsos elétricos. Este tipo de neurônio está presente em invertebrados e em vertebrados encontra-se no sistema nervoso autônomo.

Os neurônios bipolares possuem dois processos, um dendrito e um axônio, e representam a maioria das células sensoriais. Os neurônios mecanorreceptores transmitem sensações como toque, pressão e dor para a medula espinhal, são de um tipo denominado pseudo-unipolar. O corpo celular fica localizado nos gânglios dorsais e se desenvolve inicialmente como um neurônio bi-polar, mas durante o desenvolvimento os dois processos fundem-se para formar um só axônio saindo do corpo celular. Este axônio depois se ramifica em duas partes, a primeira vai para a periferia (pele e juntas) e recebe informações desses locais, a segunda segue para a medula espinhal transmitindo os impulsos recebidos.

Os neurônios multipolares são a maioria no sistema nervoso de vertebrados, possuem um axônio e muitos dendritos que surgem do corpo celular. Eles variam muito na forma, comprimento do axônio e número de dendritos, que normalmente varia com o número de conexões sinápticas do neurônio. As células piramidais do hipocampo e as células de Purkinje no cerebelo são bons exemplos de células multipolares (Kandel et al., 2000).

Não é surpresa perceber que, durante o desenvolvimento, os muitos efeitos do ambiente embrionário no crescimento dos prolongamentos neuronais são mediados por centenas de moléculas diferentes. O direcionamento dos prolongamentos é feito por promoção ou inibição do crescimento, e as moléculas que o fazem podem ser encontradas na própria célula, na superfície de outras células, na matriz extracelular ou ainda na forma solúvel. Por outro lado, nem sempre é possível categorizar os efeitos desse modo, pois em alguns casos, uma molécula pode ser promotora de neuritos para um tipo neuronal e inibitória para outro tipo. Caso clássico é o das semaforinas, uma família de moléculas com representantes solúveis e ligados à membrana, que agem de maneira específica com o tipo neuronal promovendo ou inibindo o crescimento axonal. Assim, foi extremamente importante utilizar em nosso estudo mais de um tipo neuronal, pois a resposta celular frente a proteínas e peptídeos testados pode variar entre eles (Kandel et al., 2000).

A idéia de que a matriz extracelular também pode influenciar o crescimento de neuritos surgiu da observação de que muitos axônios periféricos crescem no tecido conectivo acompanhando a lâmina basal. A partir daí foram feitos estudos recobrando superfícies com diferentes moléculas de matriz e verificando a influência destas sobre a direção e a taxa de crescimento dos neuritos. Muitas destas substâncias já foram identificadas, incluindo fibronectina, colágeno e alguns proteoglicanos, mas a família de proteínas com a maior importância é a de lamininas (Kandel et al., 2000). Vn também é capaz de estimular a extensão de neuritos (Grabham *et al.*, 1992; Martinez-Morales *et al.*,

1995;Martinez-Morales *et al.*, 1997;Walker *et al.*, 1998), e de promover a diferenciação de células granulares do cerebelo através da ativação de CREB (“cAMP responsive element binding protein”) (Pons and Marti, 2000;Pons *et al.*, 2001).

As células expressam receptores que reconhecem moléculas promotoras de crescimento na matriz. Muitos deles, em destaque as integrinas, já foram identificados na superfície celular estão envolvidos no crescimento e manutenção de neuritos (Giancotti & Ruoslahti, 1999). Nosso grupo demonstrou que PrPc é mais um destes receptores de proteínas de matriz extracelular que tem papel fundamental na neuritogênese mediada por laminina. Dessa forma nosso objetivo foi verificar se PrPc é capaz de interagir com Vn e mediar neuritogênese em tipos neuronais distintos.

*In vivo*, a neuritogênese está relacionada com a correta formação das conexões nervosas durante a embriogênese. No animal adulto, no entanto, a maioria das conexões nervosas já está estabelecida e a plasticidade neuronal será resultante de processos de remodelagem dos axônios e dendritos em resposta a estímulos externos como aprendizagem e memória.

A formação da memória é dependente de transformações fisiológicas na transmissão sináptica, que podem ser transitórios ou permanentes. Mudanças reversíveis são comumente referidas como memória de curta duração (STM ou “short term memory”) e se referem às formas de memória que o indivíduo retém por um curto período de tempo. As formas de memória em que o indivíduo retém uma lembrança por longos períodos de tempo é chamada memória de longa duração (LTM ou “long term memory”) e acredita-se que seja gerada pela estabilização das transformações sinápticas da STM (Lamprecht and LeDoux, 2004). Deste modo, se PrPc está intimamente ligado aos processos de plasticidade neuronal, é interessante investigar se um processo *in vivo* que depende deste fenômeno, como a consolidação da memória, teria a participação desta proteína.

Assim, PrPc se constituiria em um ligante de superfície celular para várias proteínas, envolvido em mecanismos de plasticidade neuronal *in vitro* e *in vivo*.

## II. Objetivos

### II.1 Os objetivos principais deste projeto são:

II.1.1- a caracterização da interação PrPc/Vn, o que inclui determinar a constante de afinidade *in vitro* entre estas duas moléculas.

II.1.2- mapear os domínios de interação entre as duas moléculas, com o auxílio de peptídeos sintéticos, visando conhecer se o domínio de ligação a PrPc coincide com domínios de ligação a outras proteínas conhecidas. Do mesmo modo deseja-se saber qual o domínio na molécula de Vn responsável pela ligação a PrPc, o que poderia informar sobre a possibilidade da ligação do complexo a integrinas ou outras proteínas da matriz extracelular.

II.1.3- estabelecer se outros ligantes de PrPc são capazes de competir pela interação PrPc-Vn e vice-versa.

II.1.4- caracterizar o papel de PrPc na neuritogênese mediada por Vn, em culturas primárias de células de neurônios de gânglios da raiz dorsal provenientes de animais normais ou deficientes para PrPc. Pretende-se também comparar estes resultados com aqueles obtidos em ensaios semelhantes realizados com culturas de hipocampo.

II.1.5- verificar a influência de outros ligantes de PrPc na neuritogênese mediada por Vn.

### II.2 – Os objetivos dos projetos em colaboração são:

II.2.1 - caracterizar *in vitro* a proteína STI1 (“Stress Inducible Protein 1”) como um novo ligante de PrPc bem como os sítios de ligação em ambas as proteínas.

II.2.2 - estudar a implicação da interação PrPc/STI1 em mecanismos de neuritogênese e proteção contra morte celular programada.

II.2.3 - caracterizar o envolvimento da ligação PrPc-Ln no mecanismo de consolidação da memória de curta e longa duração.

### III. Resultados e Discussão

Este capítulo será dividido em cinco partes, estando quatro representadas por manuscritos já publicados e manuscritos recém submetidos para publicação e uma parte apresentando resultados que ainda não são suficientes para gerar uma publicação, mas são de grande contribuição para o fenômeno biológico que queremos demonstrar nesta tese.

A parte 1 deste capítulo dedica-se a descrever o que foi principal alvo de estudo deste trabalho, a interação entre PrPc e a proteína de matriz extracelular Vn.

Na parte 2 serão apresentados dados referentes à conservação evolutiva da ligação PrPc-Vn, além de alguns dados sobre os efeitos de Vn em neurônios do sistema nervoso central. Também serão vistos os efeitos da combinação dois a dois, dos ligantes de PrPc (Vn e Ln, Vn e STI1, Ln e STI1) sobre culturas de neurônios da raiz dorsal.

A descrição da proteína STI1 como um ligante de PrPc, observado em ensaios bioquímicos e seus efeitos biológicos de neuritogênese e neuroproteção serão apresentados nos itens 3 e 4 deste capítulo. Por fim, na parte 5 descrevemos a interação PrPc-Ln como importante evento na consolidação da memória de curta e longa duração em ratos.

A ordem de apresentação dos itens pretende ressaltar os dois primeiros trabalhos, que são o principal assunto desta tese; no entanto, esta não é a ordem cronológica de realização dos experimentos. Este fato talvez gere alguma dificuldade na compreensão do item 2.3, que descreve as interações entre os vários ligantes de PrPc. Isto porque a descrição do ligante STI1 só é apresentada no item que vem a seguir, 3. Contando com a compreensão e atenção dos leitores a respeito deste fato, seguem-se os trabalhos.



## **Trabalhos Principais desta Tese**

### **III.1**

#### **Caracterização Bioquímica e Funcional da Interação PrPc-Vn**

Este trabalho constitui o principal projeto de estudo desta tese e iniciou-se em uma linha de pesquisa do grupo que já havia identificado a interação entre PrPc e outra proteína de matriz extracelular, a laminina. Ensaios preliminares de “overlay” mostraram que além de laminina, PrPc ligava-se também a Vn.

Após observar que havia uma interação forte e específica entre as proteínas PrPc e Vn, o primeiro passo deste trabalho foi determinar a constante de afinidade entre estas duas proteínas e para isso foram realizados ensaios de ligação *in vitro*. Através de gráfico de Scatchard (Scatchard, 1949) obtido com os dados da curva de ligação, o  $K_d$  determinado foi da ordem de  $10^{-8}$  M. Também foram realizados experimentos de competição *in vitro* com outros ligantes de PrPc e os peptídeos específicos de seus sítios de ligação.

Confirmada a interação de PrPc e vitronectina e estabelecido o  $K_d$  desta ligação, o próximo objetivo deste trabalho foi o de mapear os sítios de interação tanto na molécula de PrPc quanto na molécula de vitronectina.

Na tentativa de mapear a região específica do PrPc que se liga a Vn, foi examinado, através de ensaios de competição, o efeito inibitório de vinte peptídeos correspondentes à seqüência completa de aminoácidos de PrPc. Dois peptídeos foram capazes de competir pela interação PrPc-Vn mostrando que o sítio de ligação a Vn na molécula de PrPc localiza-se na região dos aminoácidos 105-125 (Figura 1). Para tentar confirmar então, se o sítio de ligação à Vn na molécula de PrPc, é aquele determinado pelos ensaios de competição com os peptídeos e ainda restringir o sítio de ligação a menos aminoácidos, foram construídas moléculas de PrPc recombinante com pequenas deleções (PrPc  $\Delta$ 105-112, PrPc  $\Delta$ 113-119, PrPc  $\Delta$ 120-125, PrPc  $\Delta$ 105-128) que foram utilizadas em ensaios de ligação a Vn. Os mutantes PrPc  $\Delta$ 105-112, PrPc  $\Delta$ 113-119 e PrPc  $\Delta$ 105-128 não apresentaram ligação a Vn, enquanto o mutante PrPc  $\Delta$ 120-125 comportou-se como a molécula selvagem. Estes resultados, portanto, delimitaram o sítio de ligação de Vn entre os aminoácidos 105 a 119 de PrPc.

Para mapear na Vn o domínio de ligação a PrPc foi utilizado um programa de computador Hidrolog que calculou se havia, na vitronectina, regiões com perfil de hidropaticidade complementar a seqüência de PrPc 105-125. Foram encontrados dois domínios cujo perfil hidropático era complementar à seqüência mencionada. Os peptídeos correspondentes a estas regiões foram sintetizados e utilizados em ensaios de competição. Somente um deles competiu pela interação demonstrando que o sítio de ligação de PrPc deve localizar-se entre os resíduos 309 a 322 de Vn (Figura 1). Para confirmar que este é mesmo o sítio de ligação a PrPc, o peptídeo Vn 309-322 foi utilizado em ensaios de ligação, onde demonstrou-se que este era capaz de ligar-se a PrPc selvagem, mas não aos mutantes de PrPc contendo deleções mapeadas no domínio que interage com Vn.

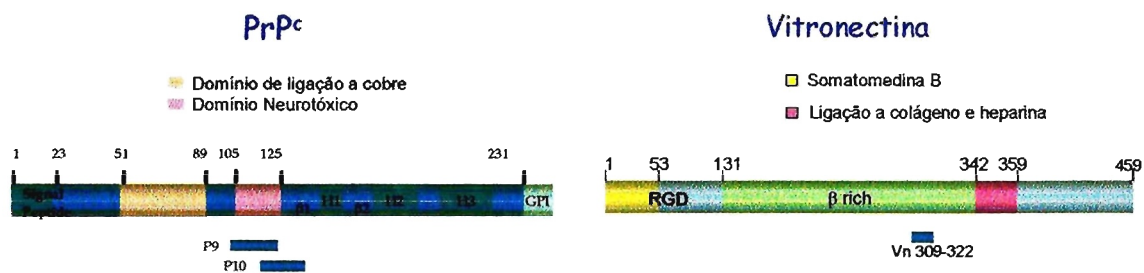


Figura 1: Desenho esquemático das proteínas PrPc e Vn, mostrando a localização dos principais domínios destas moléculas e dos peptídeos específicos da interação PrPc-Vn (P9, P10, e Vn309-322). H- estrutura em  $\alpha$ -hélice,  $\beta$  - estrutura em folha  $\beta$ , GPI- âncora de glicosil-fosfatidil-inositol,  $\beta$  rich – domínio rico em folhas  $\beta$ , RGD – domínio de ligação a integrinas.

A seguir, mostramos que as duas proteínas apresentam o mesmo padrão de expressão durante o desenvolvimento embrionário, em particular em uma área do sistema nervoso periférico, nos chamados gânglios da raiz dorsal. Através de microscopia confocal observou-se grande padrão de co-localização de ambas as proteínas.

Em ensaios *ex vivo*, Vn foi capaz de promover o crescimento de axônios de gânglios da raiz dorsal (DRG), evento que pode ser inibido por anticorpos anti-PrPc ou mimetizado pelo peptídeo Vn 309-322.

Vn, no entanto, é capaz de promover crescimento de axônios de DRG provenientes de animais deficientes para o gene de PrPc de uma maneira similar àquela vista em animais selvagens. Entretanto, observamos que nos animais deficientes para PrPc, há uma ativação maior de integrinas, que compensariam a ausência de PrPc, fazendo com que o fenótipo do animal mantenha-se inalterado. Assim, foi possível determinar nesta etapa do trabalho, que PrPc é um ligante específico para Vn, importante nos mecanismos de plasticidade neuronal, cuja ausência gera mecanismos compensatórios mediados por integrinas.

## **CELLULAR PRION IS A VITRONECTIN RECEPTOR SUPPORTING AXONAL GROWTH: REDUNDANCY MEDIATED BY INTEGRINS**

Glaucia N. M. Hajj<sup>1,2</sup>, Marilene H. Lopes<sup>1,3</sup>, Adriana F. Mercadante<sup>2</sup>, Rosa M. R. P. S. Castro<sup>3</sup>, Silvio S. Veiga<sup>4</sup>, Rafael B. Silveira<sup>4</sup>, Marco F. A. Randi<sup>4</sup>, Maria A. Juliano<sup>5</sup>, Saul G. Jacchieri<sup>3</sup>, Silvio M. Zanata<sup>6</sup> and Vilma R. Martins<sup>1</sup>.

1- Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo, 01509-010, Brazil..

2- Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 05508-010, Brazil.

3- Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer, São Paulo, 01509-010, Brazil.

4- Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 81530-900, Brazil.

5- INFAR, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 04023-060, Brazil

6- Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 81530-900, Brazil

Running Title: PrPc binds vitronectin supporting axonal growth

To whom correspondence should be addressed:

Dr. Vilma Regina Martins

Ludwig Institute for Cancer Research

Rua Prof. Antonio Prudente 109 4A 01509-010

Fone (55-11) 3388-3239 Fax: (55-11) 3207-7001

e-mail: vmartins@ludwig.org.br

## ABSTRACT

The cellular prion (PrPc) physiological functions as a cell surface pleiotrophic receptor are under debate. Here, we report that PrPc interacts with vitronectin (Vn) albeit no association with fibronectin or collagen was observed. Binding sites were mapped at amino acids 105 to 119 of PrPc and residues 307-320 in Vn from mouse molecules. In wild-type mice embryonic dorsal root ganglia (DRG), both proteins co-localize and Vn induces axonal growth which was abrogated by anti-PrPc antibodies or mimicked by the Vn peptide 307-320. PrPc null mice (*Prnp*<sup>0/0</sup>) DRG neurons axonal growth is also stimulated by Vn while no effect was accounted for Vn peptide 307-320. Conversely, functional assays demonstrated that *Prnp*<sup>0/0</sup> DRG neurons were more responsive to Vn RGD peptide, the binding site for integrins, than wild-type cells and exhibit a higher  $\alpha_v\beta_3$  activity. Thus, PrPc plays an important role in axonal growth which is compensated by integrins in *Prnp*<sup>0/0</sup> neurons.

Keywords: prion protein/ Vitronectin / Extracellular matrix / Dorsal Root Ganglia

## INTRODUCTION

Prions have been implicated in the pathology of several transmissible spongiform encephalopathies. The infectious protein converts its cellular normal isoform, PrP<sup>c</sup>, into a misfolded, protease-resistant and disease associated protein (Prusiner, 1998). Nowadays, the characterization of the biological functions of PrP<sup>c</sup> is of particular importance to understand the possible loss-of-function associated to prion diseases (Hetz and Soto, 2003).

PrP<sup>c</sup>, whose physiological function started to be deciphered, is very conserved among species and is expressed in the majority of tissues but mostly in the central nervous system and lymphoid tissues (Oesch et al., 1985). During development, gene promoter activity was detected in mice as early as embryonic day 12.5 (E12.5) in brain and medulla (Asante et al., 2002) and mRNA was seen in E9.5 in brain and spinal cord (Miele et al., 2003).

PrP<sup>c</sup> is located on the outer cell membrane and has been related to copper binding (Brown et al., 1997a), protection against oxidative stress (Brown et al., 1997b; Brown and Besinger, 1998) and signaling against neuronal apoptosis by its interaction with the Stress Inducible Protein 1 (STI1) (Chiarini et al., 2002; Zanata et al., 2002b). Moreover, the extracellular matrix (ECM) protein laminin (Ln) binds PrP<sup>c</sup>, promoting neurite outgrowth and maintenance (Graner et al., 2000b; Graner et al., 2000a). Thus, PrP<sup>c</sup> resembles a cell surface receptor connecting the extra and intra cellular milieus.

The classical ECM receptors, integrins, can bind several molecules and have been associated to neurite outgrowth (Hynes, 2002; Liddington and Ginsberg, 2002). The core recognition sequence for several integrins is the tri-peptide arginine-glycine-aspartic acid (RGD), present in numerous ECM proteins such as collagen, vitronectin (Vn) and fibronectin (Fn). RGD has been shown to be active and replace ECM proteins in a variety of phenomena (Hynes, 1992; Pierschbacher and Ruoslahti, 1984; Ruoslahti and Pierschbacher, 1987).

Therefore, since PrP<sup>c</sup> binds Ln we decided to evaluate if PrP<sup>c</sup> could act as a broad ECM receptor and our data showed that PrP<sup>c</sup> binds Vn but not Fn or type IV collagen. Vn is expressed during development since E10 in mice, mainly in the central nervous

system (Seiffert et al., 1995) and supports proliferation and differentiation of cultured retinal neurons (Martinez-Morales et al., 1995). In dorsal root ganglia (DRG) neurons, this molecule mediates neurite extension, which can be inhibited by anti-Vn antibody or RGD peptide (Isahara and Yamamoto, 1995). Vn is also capable of inducing motor neuron differentiation and antibodies against Vn, when injected into chicken embryos, reduce the number of motor neurons generated in vivo (Martinez-Morales et al., 1997; Pons and Marti, 2000). Furthermore, the  $\alpha_v\beta_1$  integrin was described as a receptor involved in the Vn mediated neurite extension (Neugebauer et al., 1991).

This work reports that PrPc interacts with Vn inducing axon outgrowth, which can be inhibited by anti-PrPc antibodies. In the presence of Vn, neurons from wild-type and *Prnp*<sup>0/0</sup> mice presented the same axon growth pattern. Vn peptide mimicking PrPc binding site promotes neurite extension similarly to the whole molecule in neurons from wild-type but not in those from *Prnp*<sup>0/0</sup> mice. Conversely, *Prnp*<sup>0/0</sup> DRG cells are more responsible than wild-type ones to the axonal outgrowth induced by Vn RGD peptide and presented higher  $\alpha_v\beta_3$  activity. Thus, data presented here show that PrPc is an important player in DRG axonal growth and compensatory mechanisms due to a functional redundancy mediated by integrins, present in PrPc null mice.

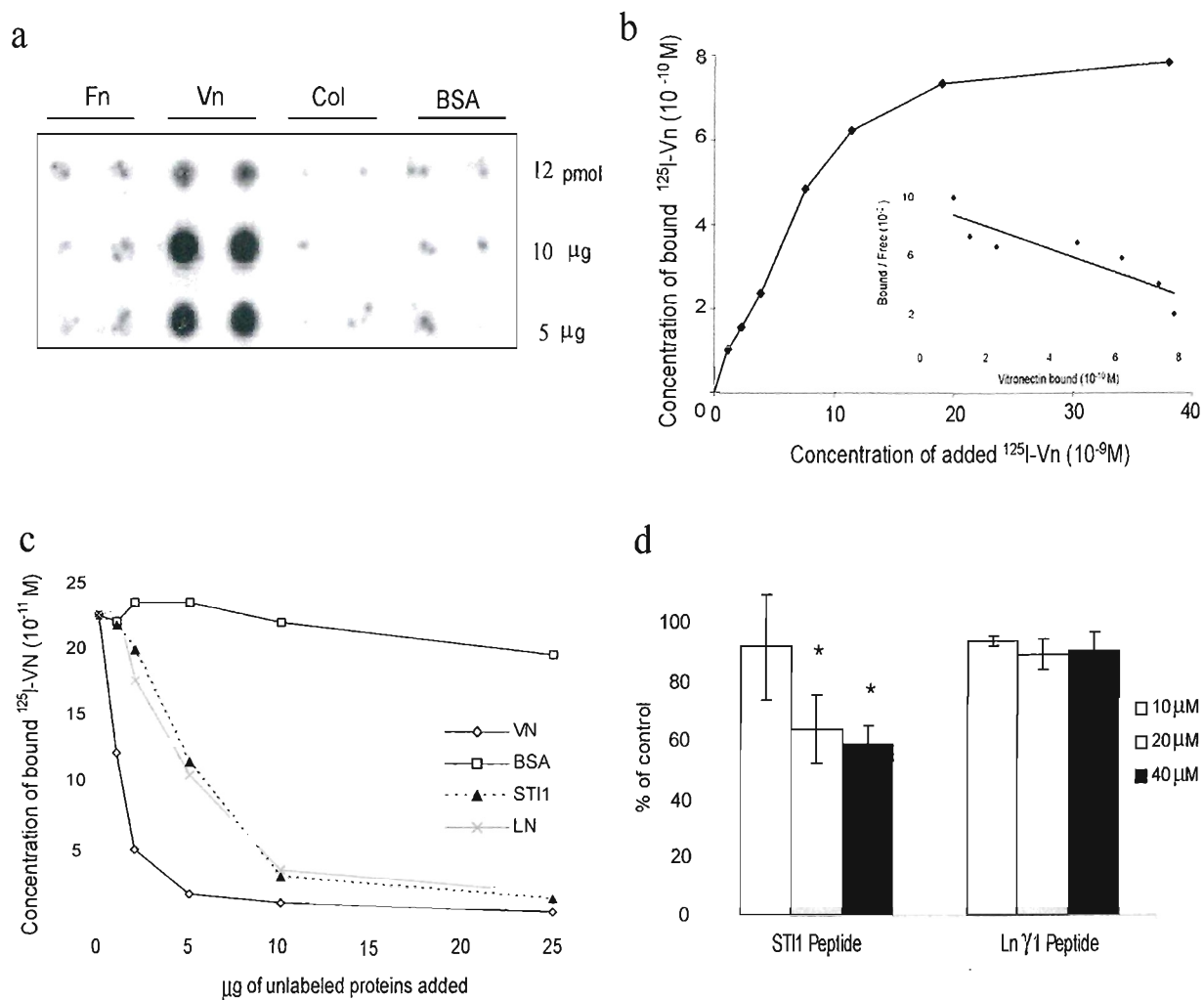


## RESULTS

### *PrPc-vitronectin interaction*

The first evidence of the PrPc-Vn interaction was obtained with an overlay experiment (Figure 1a) which showed that PrPc binds Vn although it does not associate to Fn or type IV collagen. Binding assays demonstrated that His<sub>6</sub>-PrPc binding to Vn is dose dependent and saturable (Figure 1b) with a K<sub>d</sub> of  $1.2 \times 10^{-8}$ M (Figure 1b, insert). Furthermore, His<sub>6</sub>-PrPc refolded in the presence of copper, (Zanata et al., 2002b) presented a similar binding to Vn (data not shown).

PrPc interaction with <sup>125</sup>I-Vn can be competed by increasing concentrations of unlabeled Vn as well as by other PrPc ligands, such as STI1 (Zanata et al., 2002b) and Ln (Graner et al., 2000b; Graner et al., 2000a) but not by BSA (Figure 1c). This shows that specific PrPc ligands can disrupt the interaction whereas a random protein (BSA) is innocuous. The peptide representing the specific PrPc binding site at the STI1 molecule (STI1 peptide), (Zanata et al., 2002b; Chiarini et al., 2002) but not the one from Ln (Ln  $\gamma$ -1 peptide) (Graner et al., 2000a), was able to compete for the PrPc-Vn interaction (Figure 1d). These data suggest that STI1 and Vn share the same binding site at PrPc, while Ln must interact with another PrPc domain.



**Figure 1. Vn binds PrP<sup>c</sup> *in vitro* and this interaction is competed by other PrP<sup>c</sup> ligands.**

(A) Overlay assay. The indicated amounts of fibronectin (Fn), vitronectin (Vn), collagen (Col) and bovine serum albumin (BSA) were adsorbed onto a membrane, which was then allowed to bind with  $^{125}\text{I-His}_6\text{-PrP}^c$ . The figure shows the autoradiogram obtained.

(B) Binding of Vn to immobilized PrP<sup>c</sup>. PrP<sup>c</sup> coated wells were incubated with  $^{125}\text{I-Vn}$  at the indicated concentrations. Wells were washed and radioactivity was measured. The Scatchard plot derived from the data is represented in the insert. The  $K_d$  obtained was  $1.2 \times 10^{-8}$  M.

(C) Competition assay where  $^{125}\text{I-Vn}$  was incubated in PrP<sup>c</sup> coated wells in the presence of increasing concentrations of unlabeled Vn, STI-1, Ln or bovine serum albumine (BSA). After washing, the amount of radioactivity bound to the wells was determined. (D) Competition assay where  $^{125}\text{I-Vn}$  was incubated in PrP<sup>c</sup> coated wells in the presence of increasing concentrations of unlabeled STI-1 peptide or Ln peptide. After washing, the amount of radioactivity bound to the wells was determined.  $p < 0.02$  Student's T test.

### *Vn binding site within PrPc molecule*

To search for the Vn binding site at the PrPc molecule we used a peptide competition-based approach (Zanata et al., 2002b). Twenty peptides from PrPc covering the whole protein sequence were used to compete the PrPc interaction to Vn. Two of them, corresponding to PrPc amino acids 103 to 122 and 113 to 132, were able to block the proteins interaction by 80% (Figure 2a). This implies that the amino acid sequence shared by both peptides might be the putative binding site for Vn in the PrPc molecule. The peptide concentration used in this competition was about 104 higher than that for Vn, similarly to what had been previously observed using Ln peptides (Graner et al., 2000a) or RGD peptides (Pierschbacher and Ruoslahti, 1984). This condition seems to be dependent on the low proportion of peptide assuming the conformation presented at the intact protein (Pierschbacher and Ruoslahti, 1984).

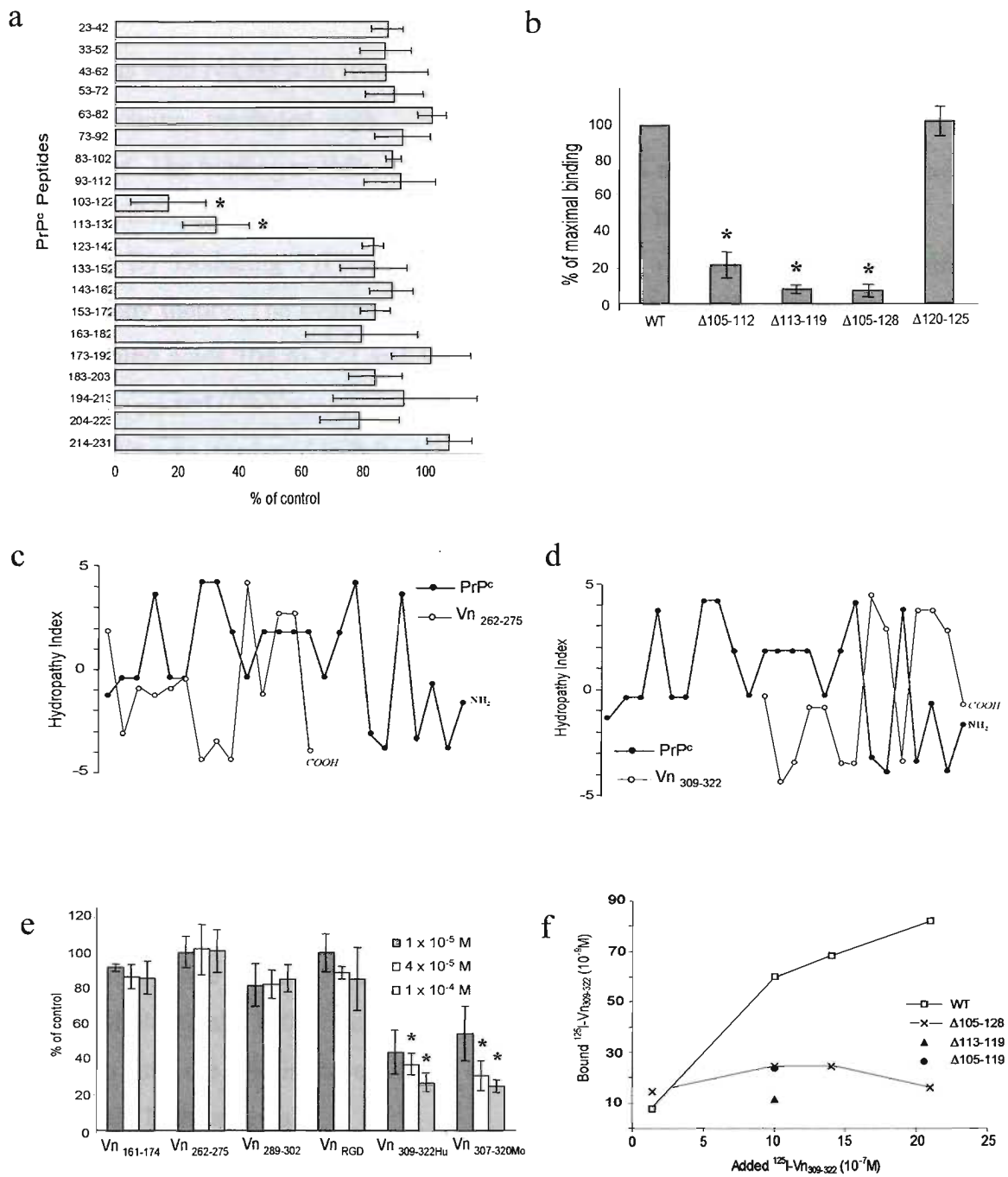
In order to confirm the binding site for Vn at PrPc, four PrPc deletion mutants were used to perform binding assays with <sup>125</sup>I-Vn (Figure 2b). PrPc mutants  $\Delta$ 105-128,  $\Delta$ 113-119 or  $\Delta$ 105-112 do not bind to Vn, while the mutant  $\Delta$ 120-125, has a binding capacity similar to the wild-type molecule, corroborating the region comprising the PrPc residues 105-119 as the binding site for Vn. As this domain is inserted into the amino-terminal random coil of the PrPc molecule (Riek et al., 1996) these deletions are not expected to disturb PrPc secondary or tertiary structure.

### *PrPc binding site within Vn molecule*

In order to determine the binding site for PrPc in the Vn molecule, we used the complementary hydrophathy theory (Baranyi et al., 1995; Brentani, 1988; Blalock, 1990; Heal et al., 2002), which states that peptides presenting opposite hydrophathy profiles can bind one another. The computer program HYDROLOG (data not shown) searched for Vn sequences whose hydrophathy profile presented more than 70% complementary to PrPc 105-119 peptide. Two Vn domains presented this profile, one from residues 262-275 (Figure 2c) and another from residues 309-322 (Figure 2d). We performed competition assays using both peptides and, as controls, two peptides randomly chosen in the Vn

sequence (Vn<sub>161-174</sub> and Vn<sub>289-302</sub>) along with a peptide containing the RGD sequence (Vn<sub>RGD</sub>) (Ruoslahti and Pierschbacher, 1987). The peptides Vn<sub>309-322Hu</sub> (from the human molecule) or Vn<sub>307-320Mo</sub> (from the mouse Vn) are able to compete for the PrPc-Vn interaction thus mapping this domain as the putative binding site for PrPc.

We also performed binding assays using <sup>125</sup>I-Vn<sub>307-320Mo</sub> peptide and wild-type His<sub>6</sub>-PrPc or PrPc deletion mutants Δ105-128, Δ113-119 and Δ105-119. Vn<sub>307-320Mo</sub> peptide binds to wild-type PrPc while very low binding is observed in all of the deletion mutants. These data point for a specific interaction between PrPc domain 105 to 119 and Vn 307 to 320 (mouse molecule).



**Figure 2. Mapping the binding sites in Vn and PrP<sup>c</sup>.**

(A) Inhibition of PrP<sup>c</sup>-Vn binding by PrP<sup>c</sup> peptides. <sup>125</sup>I-VN was incubated in PrP<sup>c</sup> coated wells in the presence of an excess of PrP<sup>c</sup> peptides. After washing, the amount of radioactivity bound to wells was determined. Binding to PrP<sup>c</sup> alone was set 100% and binding in the presence of peptides was expressed as percentage thereof. \*- Statistically different from control, Student's t-test, p<0.01.

(B) Wells were coated with wild-type,  $\Delta 105-112$ ,  $\Delta 113-119$ ,  $\Delta 120-125$  or  $\Delta 105-128$  His<sub>6</sub>-PrPc proteins, incubated with <sup>125</sup>I-Vn and the radioactivity bound to the wells was measured. The binding to PrPc wild-type was set 100% and binding to mutant molecules was expressed as percentage thereof. \*- Student's t-test, p<0.01.

(C and D) Deducing PrPc binding regions in Vn molecule using complementary hydrophathy theory. The hydrophathy plots represent the mouse PrPc amino acid sequence from amino acids 104 to 127 and Vn peptides with complementary hydrophathy pattern: (C) Vn<sub>262-275</sub> and (D) Vn<sub>309-322</sub>.

(E) <sup>125</sup>I-Vn was incubated in PrPc coated wells in the presence or absence of the indicated concentrations of Vn peptides and radioactivity bound to the wells was determined. Binding to PrPc alone was set as 100% and binding in the presence of peptides was expressed as percentage thereof. \*- Student's t-test, p<0.01.

(F) Binding of peptide Vn<sub>307-320M<sub>0</sub></sub> to immobilized PrPc. Wells were coated with wild-type,  $\Delta 105-119$ ,  $\Delta 113-119$  or  $\Delta 105-128$  His<sub>6</sub>-PrPc proteins and incubated with <sup>125</sup>I-Vn<sub>307-320M<sub>0</sub></sub> at the indicated concentrations. Wells were washed and radioactivity was measured.

#### *PrPc and Vn expression in dorsal root ganglia from embryonic mice*

The next approach was to validate the biological relevance of the PrPc-Vn interaction. Since Vn and PrPc have been detected early in development (Seiffert et al., 1995; Miele et al., 2003) we performed immunohistochemistry assays in E12.5 mice embryos and the DRGs have caught our attention because of the similar expression pattern for both proteins.

Figure 3 presents the immunohistochemistry assay performed in *Prnp*<sup>+/+</sup> (Figures 3a to l) and *Prnp*<sup>0/0</sup> (Figures 3m and n) E12.5 mice embryos using anti-PrPc (Figures 3a, b, c, g, h, i, m and n) and anti-Vn antibodies (Figures 3d, e, f, j, k and l) in two different types of sections: sagittal (Figures 3a to f) and coronal (Figures 3 g to l). The antibodies used have been extensively tested in Western Blotting assays, and show specificity for PrPc (Zanata et al., 2002b) or Vn (data not show). Controls with irrelevant mouse or rabbit serum, were also performed and show no staining (Figure 3 inserts in a and j respectively).

In accordance to previous data (Asante et al., 2002), we noticed a good level of PrPc expression in the developing brain, medulla (Figure 3g) and DRG (Figures 3a and g). It was also possible to observe the absence of stained nuclei and poor labeling of neuronal bodies in DRG (Figures 3b, c, h, i), while axons and forming axonal fibers were heavily labeled. *Prnp*<sup>0/0</sup> mice embryos were not stained, proving the specificity of the immunohistochemistry reaction (Figures 3m and n).

Vn exhibits a stronger expression when compared to PrPc, but with a similar pattern, in the brain, medulla (Figure 3j) and DRG (Figures 3d and j). Even in higher magnifications of the DRG, we can also visualize the same pattern of PrPc and Vn expression, markedly in the growing axons and nerves (Figures 3e, f, k, l). Immunofluorescence confocal images confirmed that PrPc and Vn presented a great level of co-localization in DRG cells (figures 4a and 4b) and in the growing nerve (Figure 4c).

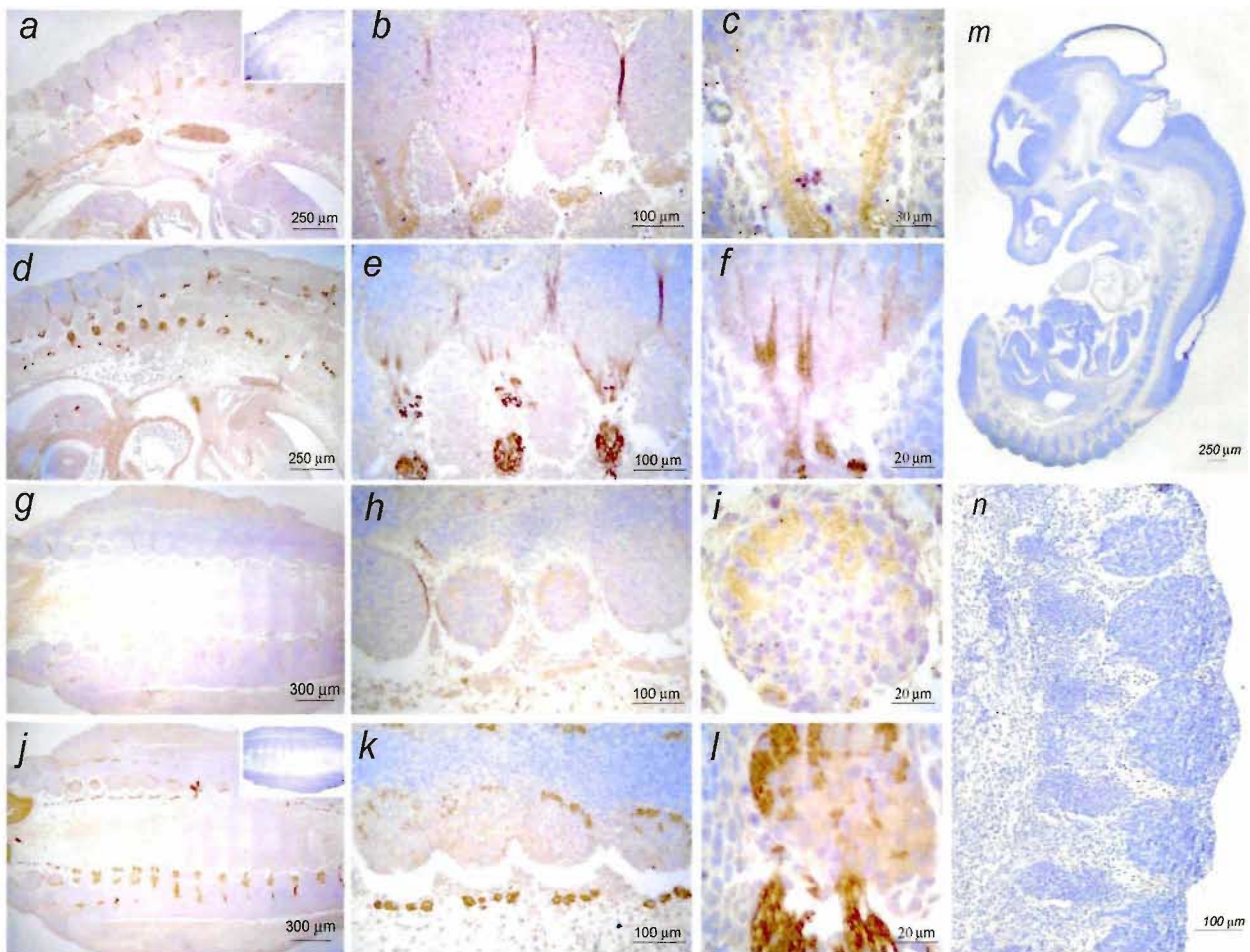
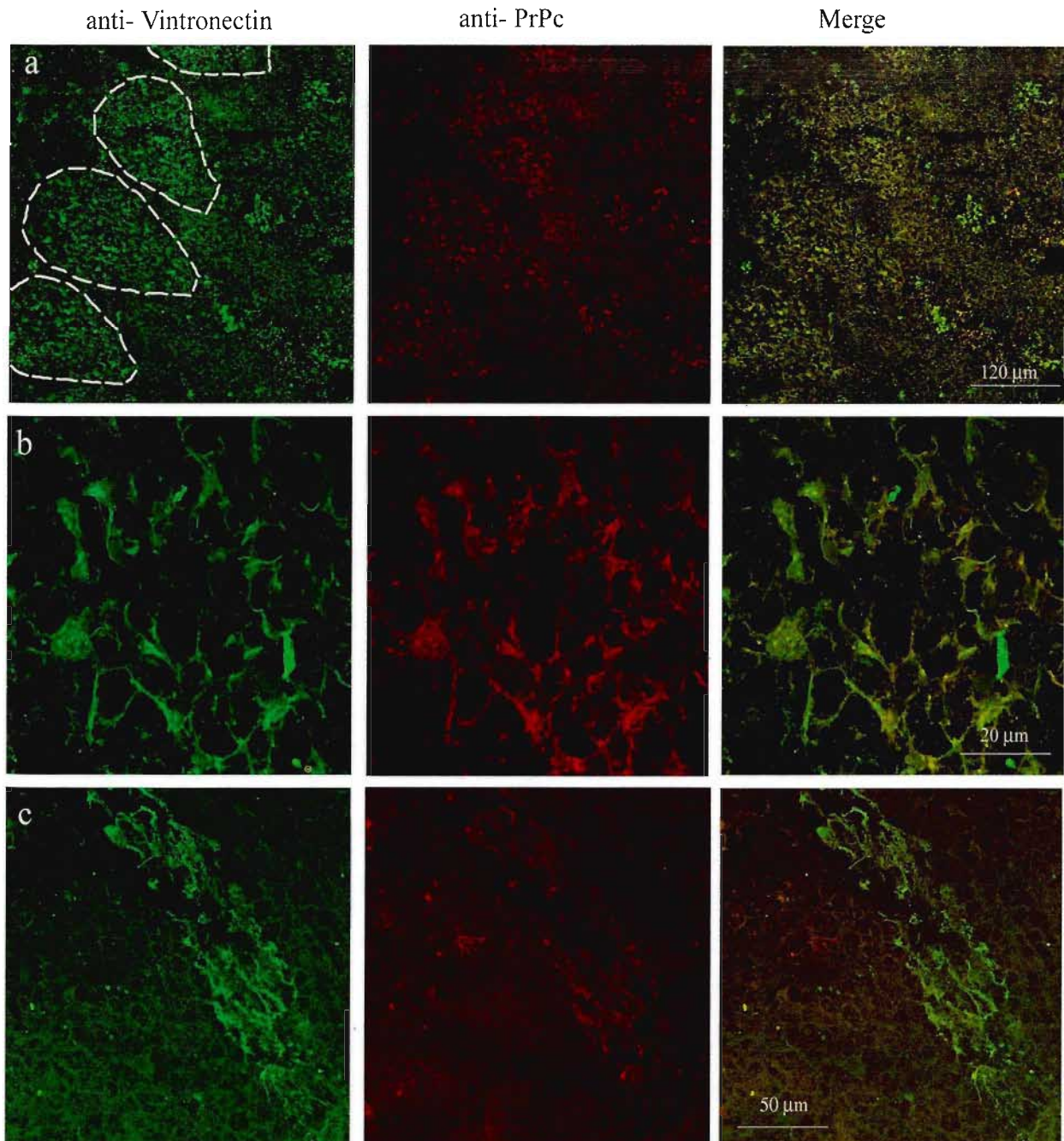


Figure 3. PrPc and Vn expression in mice embryos.

E12.5 mice sagittal (panels a to f) or coronal (panels g to l) sections reacted with anti-PrPc mouse serum (panels a, b, c, g, h, i), rabbit serum anti-Vn (panels d, e, f, j, k, l) or non-immune mouse or rabbit serum (inserts panels a and j respectively). E12.5 *Prnp*<sup>0/0</sup> mice sagittal sections reacted with anti-PrPc mouse serum (panels m and n).



**Figure 4. PrP<sup>c</sup> and Vn co-localize in embryonic DRG.**

E12.5 mice embryos were sliced into sagittal sections and reacted with anti-PrP<sup>c</sup> mouse serum (anti-PrP<sup>c</sup>, red) and anti-Vn rabbit serum (anti-vitronectin, green). Images were acquired in a confocal microscope and superimpose of the images is indicated in (merge). Panel (a) shows three ganglia in a low magnification (as indicated by the dotted lines), panel (b) indicates a ganglion in a higher magnification and in panel (c) is presented a region of growing nerve.



### *PrPc-Vn interaction mediates DRG axonal growth*

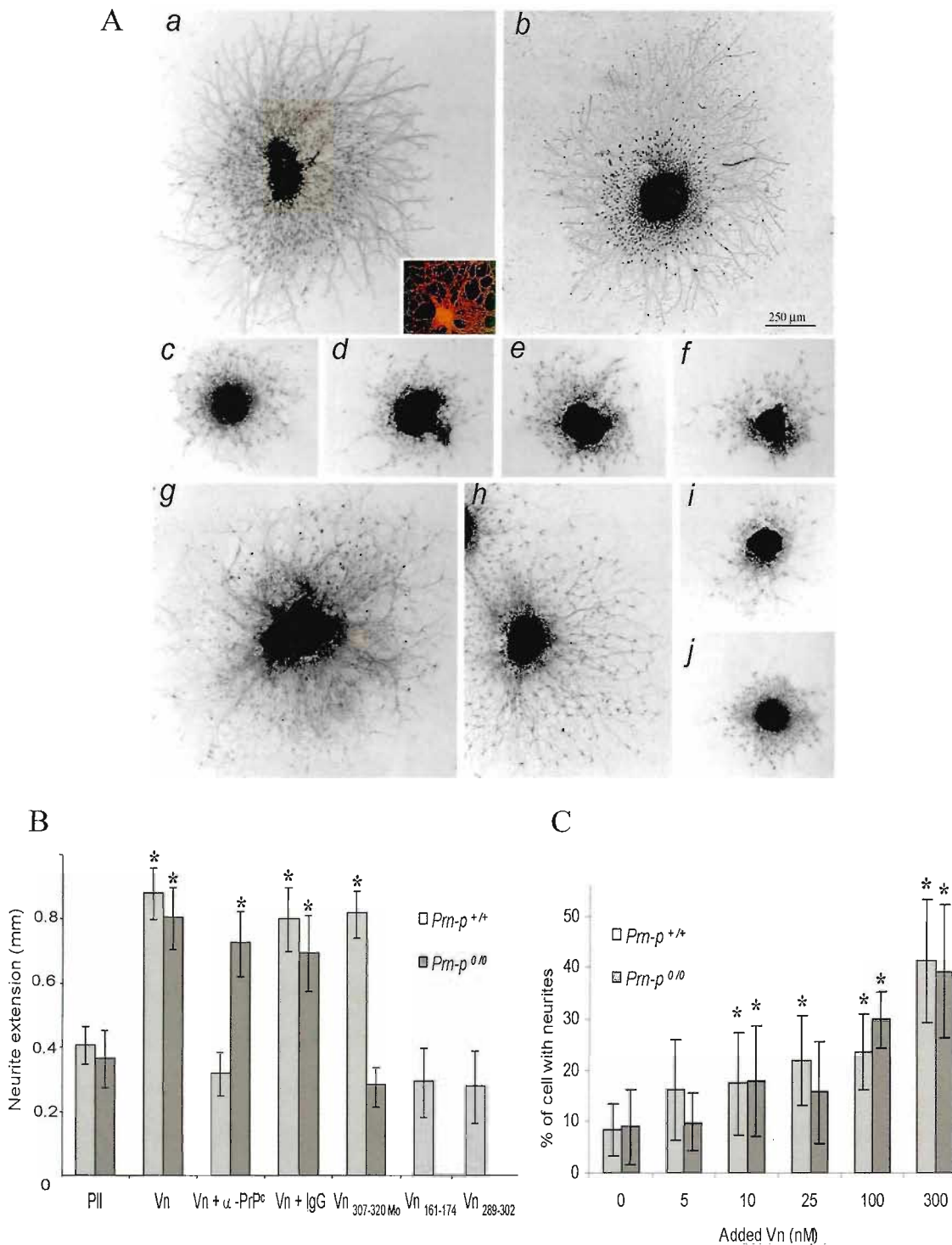
PrPc and Vn are expressed in elongating axons from DRG and medulla, and both are related to neuronal differentiation (Sales et al., 2002; Graner et al., 2000b; Graner et al., 2000a; Martinez-Morales et al., 1997; Martinez-Morales et al., 1995; Pons et al., 2001; Grabham et al., 1992), thus we investigated the possible role of this interaction in sensory neurons axonal growth. DRG explants from E12.5 mice expressing PrPc (*Prnp*<sup>+/+</sup>) (Figure 5a insert) cultured in the presence of Vn for 36 hours produce neurites of  $0.9 \pm 0.1$ mm long (Figure 5a). This growth rate ranges are near of that obtained by a previous report (Isahara and Yamamoto, 1995).

An antagonist anti-PrPc antibody previously described (Chiarini et al., 2002), was able to completely abrogate neurite growth in cultures from wild-type animals (Figures 5c and 5k) while a non-immune purified IgG had no effect (Figure 5k). Vn peptide, Vn<sub>307-320M<sub>0</sub></sub>, corresponding to the PrPc binding site at mouse Vn molecule elicits the same effect as the one triggered by the whole molecule (Figure 5b) while Vn peptides Vn<sub>161-174</sub> (Figure 5d) and Vn<sub>289-302</sub> (Figure 5e) have no activity even in concentrations 20 times higher than peptide Vn<sub>307-320M<sub>0</sub></sub> (data not shown).

*Prnp*<sup>0/0</sup> mice (Bueler et al., 1993) DRG neurons plated over Vn presented neurite growth rates similar to the wild-type ones (compare Figures 5g and a respectively). Nevertheless, in opposition to what has been demonstrated for wild-type DRG, anti-PrPc antibodies (Figure 5h) had no effect on Vn stimulated *Prnp*<sup>0/0</sup> ganglia neurite growth. Furthermore, Vn peptide Vn<sub>307-320M<sub>0</sub></sub> (Figure 5i), which mimics the PrPc binding site, is unable to induce neuritogenesis in *Prnp*<sup>0/0</sup> DRG neurons. Data representing the average neurite length from each treatment is showed in Figure 5k.

We also carried out dissociated DRG cell cultures in the presence of Vn in order to measure the percentage of cells with neurites and observed that responsiveness to Vn is the same in *Prnp*<sup>+/+</sup> and *Prnp*<sup>0/0</sup> neurons (Figure 5l).

Although experiments using anti-PrPc antibodies or Vn<sub>307-320</sub> peptide demonstrate a specific axonal growth supported by PrPc-Vn interaction, the whole Vn molecule induces the same axonal outgrowth pattern in wild-type and *Prnp*<sup>0/0</sup> neurons. Therefore, it is possible that another Vn receptor is compensating the PrPc deficiency.



**Figure 5. PrP<sup>c</sup>-Vn interaction mediates axonal growth in DRG from E12.5 mice embryos.** (A) DRG explants from *Prn-p*<sup>+/+</sup> (panels *a* to *f*) and *Prn-p*<sup>0/0</sup> (panels *g* to *j*) E12.5 mice embryos were cultured in coverslips containing poly-L-lysine (panels *f* and *j*), Vn (panels *a* and *g*), Vn plus anti-PrP<sup>c</sup> (panels *c* and *h*), peptide Vn<sub>307-320M0</sub> (panels *b* and *i*), peptide Vn<sub>161-174</sub> (panel *d*) or peptide Vn<sub>289-302</sub> (panel *e*). Ganglia were fixed and stained and photographs were taken. Insert in panel *a* shows an immunohistochemistry performed with anti-PrP<sup>c</sup> in DRG cultured in the presence of Vn. (B) The axonal growth was measured in 3 different points of the ganglia and the mean value was used as the neurite length of each DRG. Values indicate the average of at least 12 ganglia per condition from three independent experiments. \*- Statistically different from poly-L-lysine, Mann-Whitney test  $p < 0.001$ . (C) The percentage of cells with neurites was measured. Values indicate the average of at least 12 ganglia per condition from three independent experiments. \*- Statistically different from poly-L-lysine, Mann-Whitney test  $p < 0.001$ .

(B) Axonal growth was measured and used as the neurite length of each DRG. Values indicate the average of at least 12 ganglia per condition from three independent experiments. \*- Statistically different from poly-L-lysine, Mann-Whitney test  $p < 0.001$

(C) Dissociated DRG cells were stimulated with increasing concentrations of Vn. Cells were fixed, stained and the percentage of cell with neurites was counted. \*- Statistically different from poly-L-lysine, Mann-Whitney test  $p < 0.05$ .

### *Integrin participation in Vn induced axonal growth is enhanced in PrPc absence*

As the results so far point out, there must be a compensatory mechanism by which Vn is able to promote neurite extension in the absence of PrPc. The obvious targets for this compensatory mechanism are the integrins, the classical Vn receptors that interact with this molecule through the RGD peptide.

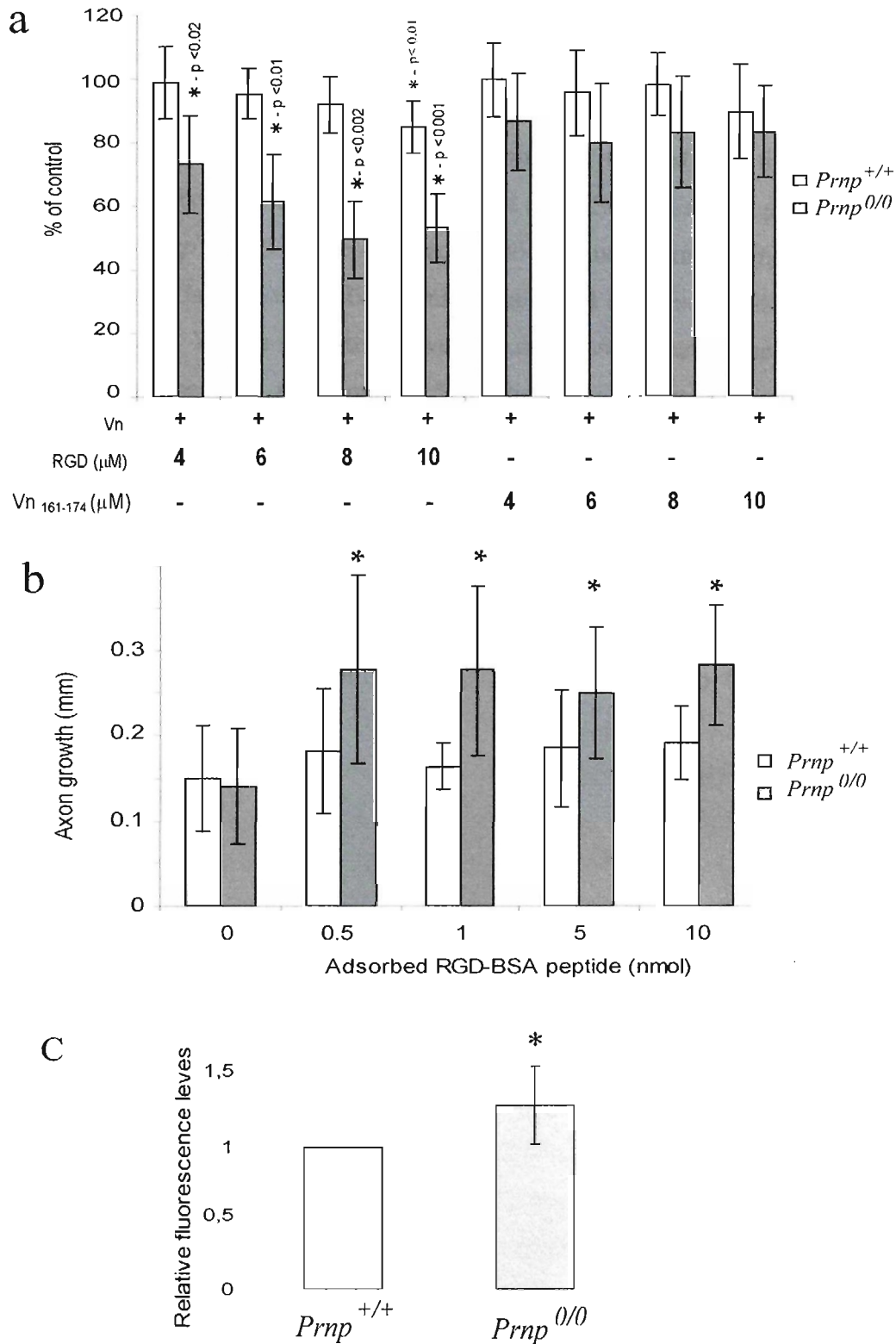
We performed functional assays using RGD peptide which has an advantage over antibodies, since it can trigger or halt several integrin dimers at once (Monier-Gavelle and Duband, 1997; Isahara and Yamamoto, 1995). RGD peptide can be used for inhibition or stimulation of the neuritogenesis depending on its presentation form. When used in solution, the peptide is not able to bind the coverslip and it can be used to perform competition assays since it binds integrin but does not support cell adhesion to the substrate (Pierschbacher and Ruoslahti, 1987). Conversely, when coupled to BSA the peptide can adhere to the coverslip and becomes supportive for cell adhesion (Danilov and Juliano, 1989; Brandley and Schnaar, 1988).

This peptide was firstly used to inhibit axonal growth promoted by Vn in *Prnp*<sup>+/+</sup> or *Prnp*<sup>0/0</sup> DRG. Figure 6a shows that peptide VnRGD is able to inhibit Vn stimulated axonal growth in a dose dependent manner reaching poly-L-lysine levels (50% of growth obtained with Vn) *Prnp*<sup>0/0</sup> DRG, while in *Prnp*<sup>+/+</sup> neurons a significant effect of about 15% can only be observed at the highest peptide concentration. The peptide Vn<sub>161-174</sub> had no effect on both cultures.

Additionally, we measured the axonal growth induced by Vn<sub>RGD</sub>-BSA and observed that *Prnp*<sup>0/0</sup> DRG are more responsive than *Prnp*<sup>+/+</sup> ones (Figure 6b), the first extended axons in 0.5 nmol of adsorbed peptide, while the last did not present any growth

even with 20 times higher peptide amount. Thus, *Prnp*<sup>0/0</sup> DRG cells are more responsible than *Prnp*<sup>+/+</sup> to the RGD peptide, demonstrating a greater integrin dependence for axonal outgrowth in the PrPc ablated cells.

We next verified if there were any alterations in the activation state of the Vn binding integrins.  $\alpha_v\beta_3$  is one of the most well known Vn receptors and the only one to which an antibody against the activated heterodimer is available. Therefore, we measured the level of active  $\alpha_v\beta_3$  integrin in adhering cells through an immunofluorescence assay with WOW antibody (Pampori et al., 1999). *Prnp*<sup>0/0</sup> DRG neurons showed a 30% higher level of  $\alpha_v\beta_3$  activation when compared to *Prnp*<sup>+/+</sup> ones (Figure 6c), indicating that this integrin is more active after PrPc ablation.



**Figure 6. *Prnp*<sup>0/0</sup> mice compensate PrP<sup>c</sup> absence with more activated integrins.**

(A) DRG explants from *Prnp*<sup>+/+</sup> and *Prnp*<sup>0/0</sup> E12.5 mice embryos were cultured in Vn and increasing concentrations of peptides Vn<sub>161-174</sub> or Vn<sub>RGD</sub>. Ganglia were fixed and photographs were taken. The axonal growth was measured in 3 different points of the ganglia and the mean value was used as the neurite length of each DRG. The length obtained in Vn alone was set 100% and length in the presence of peptides was expressed as percentage thereof. Values indicate the average of at least 12 ganglia per condition from at least three independent experiments. \*- Statistically different from control, Students T test.

as 100% and that in the presence of peptides was expressed as percentage thereof. Values indicate the average of at least 12 ganglia per condition from at least three independent experiments. \*- Statistically different from control (Vn). Student's t test  $p < 0.02$ .

(B) *Prnp*<sup>+/+</sup> and *Prnp*<sup>0/0</sup> DRG were cultured in the presence of increasing concentrations of Vn<sub>RGD</sub> peptide. Ganglia were fixed, images obtained and the neurite length of each DRG was measured. Values indicate the average of at least 12 ganglia per condition from at least three independent experiments. \*- Statistically different from poly-L-lysine, Mann-Whitney test,  $p < 0.001$ .

(C) *Prnp*<sup>+/+</sup> or *Prnp*<sup>0/0</sup> dissociated DRG cells were plated in coverslips for 2 hours, fixed and stained with an anti-activated  $\alpha\beta 3$  integrin (WOW antibody). Fluorescent images were acquired and fluorescence of each cell within these images was measured. The average fluorescence of *Prnp*<sup>+/+</sup> cells was set as 1 and *Prnp*<sup>0/0</sup> average fluorescence is relative to it. \*-Statistically different from *Prnp*<sup>+/+</sup>, Student's t test,  $p < 0.05$ .

## DISCUSSION

In the last few years, many PrPc binding proteins have been identified and it is of particular interest its association to the ECM protein Ln, laminin receptor and glycosaminoglycans (reviewed by Lee et al., 2003). These data led us to wonder if PrPc acts as a wide-range receptor at the cell surface and may bind other ECM proteins. Data presented here shows that PrPc binds Vn with high affinity, nevertheless, PrPc interaction with ECM proteins is not a broad-spectrum phenomenon since no binding to fibronectin and type IV collagen was observed.

We had proposed some years ago that PrPc may participate in a multi-protein complex whose biological responses would be dependent both on the affinity and accessibility of each member of the complex (reviewed Martins and Brentani, 2002). The competition experiments conducted here demonstrated that PrPc-Vn interaction in vitro has a higher affinity,  $Kd 10^{-8}$  M, than that between PrPc and STI1,  $Kd 10^{-7}$  M (Zanata et al., 2002b). Furthermore, Vn binding domain at PrPc (mapped between residues 105 to 119, Figures 1c and d) overlaps with the STI1 one (Zanata et al., 2002b), indicating that PrPc interactions to Vn or STI1 are mutually exclusive, with the first being more favorable and conditioning the latter to local protein availability and levels. PrPc interaction with STI1 mediates neuroprotection against programmed cell death (Chiarini et al., 2002) and with Vn promotes axonal growth, this provides another example of cell environment being implicated in the cell fate control.

PrPc domain 105-128, which contains the Vn and also STI1 binding site, is highly conserved among species (Gabriel et al., 1992) and presents no differences between mice and humans. It also encloses proteolytic sites (Jimenez-Huete et al., 1998; Chen et al., 1995) and mutations associated to hereditary prion diseases (Mastrianni and Roos, 2000), which indicates that this domain, and probably its interaction with Vn and STI1 must have a role in the protein biology in vivo.

Although PrPc-Ln and PrPc-Vn present a similar  $Kd$  (Graner et al., 2000a) lower concentrations of Ln than Vn are needed to disrupt PrPc-Vn interaction. Nevertheless, Ln  $\gamma 1$  peptide (PrPc binding site at Ln) is ineffective in disrupting PrPc-Vn complex, since Ln binding site is mapped in PrPc amino acids 173-183 (Coitinho et al., in preparation).

Thus, it is plausible to believe that in vitro Ln molecule interacts with PrPc disturbing PrPc-Vn binding by sterical hindrance. On the other hand, sterical hindrance may not occur in vivo due to the matrix organization or to the presence of biologically active proteolytic fragments from Ln molecule (Chen et al., 2003b). Indeed, the signals triggered by each of these PrPc ligands may have cooperative roles in some biological events. In fact, in developing cerebellar granule cells, the presence of Ln induces proliferation, while during the migration process these cells find Vn and differentiate (Pons et al., 2001). Therefore, we believe that PrPc has pleiotrophic functions that will be dependent on its cellular expression and on the neighboring cellular context.

We made use of the complementary hydrophathy theory and mapped amino acids 309 to 322 as the binding site for PrPc at the Vn molecule. Today, there are more than forty examples of protein-protein interactions that comply with this theory (Baranyi et al., 1995), including Vn and fibrinogen interaction with the integrin  $\alpha$ II $\beta$ 3 (Gartner et al., 1991) and the PrPc-STI1 interaction (Martins et al., 1997; Zanata et al., 2002b). This Vn region is located in an area known to have six hemopexin domains (Schvartz et al., 1999) however, no other ligand was described to bind this site. According to the three-dimensional theoretical model of Vn (Xu et al., 2001) this mainly hydrophobic peptide is partially buried. On the other hand, it should be considered that the threading algorithm (Xu and Xu, 2000), used to create this model, makes use of an energy function that penalizes the exposure of hydrophobic side chains, whereas it is known that protein binding sites are generally hydrophobic (Gallet et al., 2000; Tsai et al., 1997). Protein interactions were not taken into account in these calculations (Xu et al., 2001) since it was not considered that this particular region could be a binding site.

As we know, there are many Vn receptors in the cell surface, such as integrins  $\alpha$ <sub>IIb</sub> $\beta$ <sub>3</sub>,  $\alpha$ <sub>v</sub> $\beta$ <sub>1</sub>,  $\alpha$ <sub>v</sub> $\beta$ <sub>3</sub> and  $\alpha$ <sub>v</sub> $\beta$ <sub>5</sub>, all found in various cell types (Hynes, 1992; Felding-Habermann and Cheresh, 1993). Each one of these heterodimers bind to the Vn RGD domain with different affinity and induce specific signals within cells (Wayner et al., 1991; Takagi et al., 2002). We demonstrated here that PrPc binds to Vn in a different domain than that used for integrins since RGD peptide is not able to compete for the PrPc-Vn interaction.



Vn is able to stimulate axonal growth and as described here, this effect is at least partially, mediated by PrPc. It is important to note that anti-PrPc antibodies completely block Vn induced axonal growth in wild-type but not in *Prnp*<sup>0/0</sup> DRG. Thus, we may speculate that docking of PrPc to Vn is the nucleating event which must be followed by integrin binding to Vn RGD domain. Also, high concentrations of Vn peptide containing the PrPc binding site are able to reproduce the biological effects elicited by the whole Vn molecule in the wild-type but not in the *Prnp*<sup>0/0</sup> DRG, suggesting that PrPc is the unique ligand for the Vn 307-320 domain. The fact that Vn<sub>307-320Mo</sub> (Fig. 6) and Vn<sub>RGD</sub> (Danilov and Juliano, 1989; Letourneau et al., 1988) are both able to substitute the whole Vn molecule in the axonal growth phenomena strengthens the idea that PrPc and integrins may act by the same signal transduction pathway.

In spite of the important functions for PrPc described over the past few years (reviewed by Martins et al., 2002), *Prnp*<sup>0/0</sup> mice have only minor defects (Bueler et al., 1992) despite of a very high sensitivity to convulsant agents (Walz et al., 1999). One explanation is that PrPc ablation may be compensated by proteins with redundant functions (Bueler et al., 1992). This seems to be the case here, since the whole Vn molecule induced DRG axonal growth either in wild-type and *Prnp*<sup>0/0</sup> neurons.

On the other hand, *Prnp*<sup>0/0</sup> mice DRG axonal growth is more sensitive to RGD than wild-type neurons, indicating that the cellular signaling involved in this phenomenon is highly dependent on integrins in the first animals. Additionally, there is 30% more activated  $\alpha_v\beta_3$  in DRG from PrPc ablated mice than in wild-type counterparts. This may represent a compensatory mechanism developed by the *Prnp*<sup>0/0</sup> animals, where the use of proteins already involved in this specific phenotype will prevent the malformation of nerves.

Numerous examples of compensatory mechanisms can be seen in the literature (Lei et al., 2004; Schwarz et al., 2002; Kitami and Nadeau, 2002) and cell signaling transduction pathways are potential targets for this molecular redundancy, since there are several proteins which can substitute for a missing pathway (Xian et al., 2001; Morikawa et al., 2003). Following that observation, it has been reported that PrPc null mice present over activation of MAPK in retinae (Chiarini et al., 2002), embryonic hippocampus (unpublished data) and adult brain and cerebellum (Brown et al., 2002). PrPc (Chen et al.,

2003a; Zanata et al., 2002b) and integrins (Roberts et al., 2003) are upstream MAPK effectors, which means that at least in this matter, an integrin could replace PrPc signaling.

An interesting point, however, is how a GPI anchored protein can perform signaling roles, integrating the ECM with the cellular cytoskeleton. One example of a GPI anchored raft associated protein capable of such phenomena is the urokinase type plasminogen activator receptor (uPAR), which performs complex signaling involving cell adhesion, proliferation and migration in response to several ligands including Vn. This protein is also implicated in events as wide as host response to infection, inflammatory disorders, tissue regeneration and cancer (Blasi and Carmeliet, 2002). The signals have to be passed through the membrane via several transmembrane adaptors, such as integrins, G-protein-coupled receptors or caveolin (Aguirre Ghiso et al., 1999). Yet, uPAR null mice have a normal phenotype (Bugge et al., 1995), therefore, although PrPc is a GPI anchored protein it should be skilled to perform regulatory tasks.

In summary, the characterization of PrPc as a receptor for Vn and their involvement in axonal growth allowed us to demonstrate the biological relevance of PrPc in the development of peripheral nerves. Additionally, as expected for an important cellular player, compensatory mechanisms occurring during embryogenesis are turned on when PrPc is ablated. Thus, at least for this event, redundancy resides within the integrin pathway.

Finally, peripheral nervous system is target for PrPc conversion to the infectious isoform, PrPsc, and is also involved with the prion neuroinvasion mechanism (Glatzel et al., 2004). Furthermore, PrPc importance in the peripheral nervous system has been increasing for quite some time, with the observation that amyotrophic lateral sclerosis, a disease which also contains protein amyloids, presents a reduction in PrPc especially in the areas affected by the disease. In this way more attention should be drawn to PrPc physiological functions in peripheral nerves (Ross and Poirier, 2004).

## MATERIALS AND METHODS

### *Proteins*

Vn and Fn were purified as described (Yatohgo et al., 1988; Engvall and Ruoslahti, 1977) and His<sub>6</sub>-PrPc was cloned (Zanata et al., 2002b) and expressed (Zahn et al., 1997) as described. Type IV collagen and albumin were purchased from Sigma Co.

Four PrPc mutant molecules were constructed using the wild-type cDNA by sequential PCR amplification (Ausubel et al., 1993), cloned in pRSET A plasmid (Invitrogen). The internal primers used for sequential PCR amplification were:

Δ105-112R-CCAGCTGCCGCAGCCCCTGGTTGGCTGG;

Δ105-112F-CCCAGCAAACCAGGGGCTGCGGCAGCTGG;

Δ113-119R-CCCCATTACTGCCACATGCTTGAGGTTG;

Δ113-119F-AAGCATGTGGCAGTAGTGGGGGGCCTT,

Δ120-125R-CAGCATGTAGCCTGCCCCAGCTGCCGC;

Δ120-125F-GCAGCTGGGGCAGGCTACATGCGGGAGC;

Δ105-128F-GGAACAAGCCCAGCAAACCACTGGGGAGCGCCATGACGG;

Δ105-128R-GTCCATGGCGCTCCCCAGTGGTTTGCTGGGCTTTGTTCC.

The external primers used were the same for all mutants: forward AGAGAATTCTCAGCTGGATCTTCTCCCGTC and reverse GAGGGATCCAAAAA GCGGCCAAAG.

### *Peptides*

The 20 peptides covering the whole mouse PrPc (23-231) (Zanata et al., 2002b) were used in competition assays.

STI1 peptide (Zanata et al., 2002b), laminin  $\gamma$ -1 peptide (Graner et al., 2000a) and six Vn peptides were synthesized by Neosystem Inc (Strasbourg, France). The subscript numbers indicate amino acid position in the molecule, first five follow the human Vn sequence and the last one follows Mo sequence:

Vn<sub>RGD</sub> (KPQVTRGDVFTMPE);

Vn<sub>161-174</sub> (AEEELCSGKPFDAF);  
Vn<sub>262-275</sub> (AHSYSGRERVYFFK);  
Vn<sub>289-302</sub> (SQEECEGSSLSAVF);  
Vn<sub>309-322<sup>Hu</sup></sub> (QRDSWEDIFELLFW);  
Vn<sub>307-320<sup>Mo</sup></sub> (QRDSWENIFELLFW).

#### *Overlay assay*

The indicated amounts of Fn, Vn, collagen and BSA were adsorbed onto nitrocellulose membrane. Blocking was performed in 5% nonfat milk in TBST (TBS 0.05% pH 7.4 Tween-20) for 2 hours at room temperature and washed. His<sub>6</sub>-PrPc (7 µg) was labeled with 0.5 mCi of Na<sup>125</sup>I (Amersham) using 1 iodobead (Pierce). The labeled protein was incubated with the membrane for 16 hours at 4°C. After washing with TBST, an X-ray film was exposed to the membrane.

#### *Binding assays*

Binding experiments were conducted as previously described (Graner et al., 2000a; Martins et al., 1997). Briefly, His<sub>6</sub>-PrPc or His<sub>6</sub>-PrPc deletion mutants (2µg) were adsorbed in polystyrene wells overnight at 4°C and blocked with 2% BSA. Vn or Vn<sub>307-320<sup>Mo</sup></sub> coupled to BSA, were labeled with 0.5 mCi Na<sup>125</sup>I (Amersham) using 1 iodobead (Pierce) and incubated for 3 hours at 37°C. The wells were washed and bound protein was determined by measuring the radioactivity in a gamma counter (Mini gamma counter LKB-Wallac). Data were analyzed by the Scatchard Method (Scatchard, 1949).

#### *Competition assays*

Unlabeled PrPc peptides (3.2 x 10<sup>-5</sup> M) were pre-incubated with 3.8 x 10<sup>-9</sup> M of <sup>125</sup>I-Vn for 2 hours at room temperature. After that, the peptides and <sup>125</sup>I-Vn were added into the His<sub>6</sub>-PrPc coated wells and incubated for 3 hours at 37°C. The wells were then washed and radioactivity was measured.

Vn, STII, Ln whole proteins or STII and Ln peptides were pre-incubated with coated His<sub>6</sub>-PrPc for 2 hours at room temperature followed by 3 hours at 37°C with 3.8 x 10<sup>-9</sup> M of <sup>125</sup>I- Vn. After washing the radioactivity was measured.

### *Dorsal Root Ganglia Explants*

Ganglia from E12.5 mice (Bueler et al., 1992) were dissected in HBSS (Gibco) and transferred to a poly-L-lysine coated glass coverslip and cultured in Neurobasal Media (Gibco) supplemented with 2mM glutamine, 100IU penicilyn, 100µg/ml streptomycin, B-27 (Gibco) and 50ng/ml NGF (Sigma). Treatments were performed with 200nM of Vn in the presence or absence of 13µg/ml of an antagonist rabbit polyclonal IgG raised against His<sub>6</sub>-PrPc (Chiarini et al., 2002) or an equal concentration of irrelevant rabbit IgG (Sigma). Cells were also treated with 0.4µM Vn peptides or with Vn<sub>RGD</sub> coupled to BSA peptide adsorbed into poly-L-lysine coated glass coverslips which was washed off before the addition of the ganglia. Ganglia were cultured for 24 or 36 hours, then fixed in 4% paraformaldehyde/ 0.12M sucrose and stained with haematoxylin. The neurite length was measured as the distance from the edge of the DRG to the tip of neurites in three different points and the mean value was used as the neurite length for each DRG (Zanata et al., 2002a). At least 12 ganglia from three independent experiments were considered for each individual data point.

Dissociated cultures were made by enzymatic digestion of the dissected ganglia for 30 minutes with 1% trypsin in Neurobasal Medium. After mechanical dissociation 5x10<sup>4</sup> cells per 13mm<sup>2</sup> well were plated in the presence of Vn for 6 hours. Cells were fixed and stained as described above and the percentage of cells presenting a neurite longer than one cell body was calculated.

### *Immunohistochemistry*

DRG explants grown in the presence of Vn were fixed and incubated for 4 hours at 4°C with 1:250 anti-PrPc (Chiarini et al., 2002) followed by Alexa 568 anti mouse IgG

(Molecular Probes), for 40 minutes at room temperature. Ganglia were viewed in an Olympus IX70 microscope equipped with epifluorescence.

E12.5 mice embryos were formalin fixed and paraffin embedded and sections (3-5  $\mu\text{m}$ ) were deparaffinized, re-hydrated and submitted to epitope retrieval (Martins et al., 1999). The endogenous peroxidase was blocked with 0.3g/l hydrogen peroxide. Sections were then incubated overnight at 4°C with 1:1,000 anti-PrPc (Chiarini et al., 2002) or 1:250 anti-Vn (polyclonal serum raised in rabbit) antibodies followed by incubation for 60 minutes at room temperature with Dako EnVision Labeled Polymer peroxidase. Color was developed using DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride - Sigma, USA) and counterstained with haematoxylin. Sections were visualized in an Olympus IMT2-NIC microscope.

### *Confocal Immunofluorescence*

E12.5 mice embryos were immediately frozen and 3 $\mu\text{m}$  cryostat sections fixed in ice cold acetone for 30 minutes, re-hydrated and blocked with TBS 0.1% Triton-X100, 10% non-immune goat serum. Sections were incubated with anti-PrPc mouse serum (1:250) and anti-Vn rabbit serum (1:100) at room temperature for 16 hours followed by anti-mouse Alexa-568 (Molecular Probes) 1:3,000 or anti-rabbit FITC (Pharmingen) 1:1,000 for 1 hour at room temperature. Sections were mounted with Fluoromount G (Southern Biothech) and images acquired in a Nikon microscope with a Bio-Rad confocal system.

### *$\alpha_v\beta_3$ activity assays*

Dissociated DRG cells ( $5 \times 10^4$ ) were plated in poly-l-lysine coated coverslips and incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 2 hours, fixed and blocking as described above. Immunofluorescence reaction with 1:4 WOW antibody (Felding-Habermann et al., 2001; Pampori et al., 1999) was procedure for 16 hours at room temperature followed by 1:3,000 Alexa 568 anti-mouse IgG (Molecular Probes). Coverslips were mounted in Fluoromout G (Southern Biotechnologies) and images were acquired in an Olympus

IX70 microscope equipped with epifluorescence. To acquire the images an Olympus DP70 digital camera exposure was set in a way that no fluorescence could be observed in cells incubated with secondary antibody only. At least five fields of each coverslip were imaged and fluorescence of each cell was measured through the Image-Pro Plus 4.1 (Media Cybernetics) computer program. At least one hundred cells per coverslip were considered. The average fluorescence of *Prnp*<sup>+/+</sup> cells was set as 1 and the *Prnp*<sup>0/0</sup> average fluorescence is relative to it.

#### *Statistical analysis*

Figures show mean values of at least three independent data sets and error bars represent standard deviation. The statistical significance of peptide inhibition assays and mutant PrPc proteins was tested by single mean Student's t-test. Quantification of DRG axonal growth was statistically evaluated by non- parametric Mann-Whitney test or Student's t test.

#### *Acknowledgments*

We are grateful to Profs. Ricardo R. Brentani, Radovan Borojevic, Fernando A. Soares and Drs Gilles Landman and Antônio Hugo J.F.M.Campos for helpful discussions. We are also thankful to Carlos F. Nascimento and Miyuki Fukuda for technical assistance. We also acknowledge Prof. Sanford Shattil for gently offering WOW antibody. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP # 99/07124-8, 03-13189-2). Fellowships from FAPESP to G.N.M.H., M.H.L., A.F.M. and S.M.Z. and from Coordenadoria de Apoio à Pesquisa (CAPES) to R.M.R.P.S.C. are gratefully acknowledged.

## Reference List

Aguirre Ghiso, J.A., Kovalski, K., and Ossowski, L. (1999). Tumor dormancy induced by downregulation of urokinase receptor in human carcinoma involves integrin and MAPK signaling. *J. Cell Biol.* 147, 89-104.

Asante, E.A., Gowland, I., Linehan, J.M., Mahal, S.P., and Collinge, J. (2002). Expression pattern of a mini human PrP gene promoter in transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* 10, 1-7.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.D., Smith, J.A., and Struhl, K. (1993). In *Current Protocols in Molecular Biology*, (New York: Wiley Interscience), p. 3.17.1.

Baranyi, L., Campbell, W., Ohshima, K., Fujimoto, S., Boros, M., and Okada, H. (1995). The antisense homology box: a new motif within proteins that encodes biologically active peptides. *Nat. Med.* 1, 894-901.

Blalock, J.E. (1990). Complementarity of peptides specified by 'sense' and 'antisense' strands of DNA. *Trends Biotechnol.* 8, 140-144.

Blasi, F. and Carmeliet, P. (2002). uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 932-943.

Brandley, B.K. and Schnaar, R.L. (1988). Covalent attachment of an Arg-Gly-Asp sequence peptide to derivatizable polyacrylamide surfaces: support of fibroblast adhesion and long-term growth. *Anal. Biochem.* 172, 270-278.

Brentani, R.R. (1988). Biological implications of complementary hydropathy of amino acids. *J. Theor. Biol.* 135, 495-499.



Brown,D.R. and Besinger,A. (1998). Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem. J.* 334 ( Pt 2), 423-429.

Brown,D.R., Nicholas,R.S., and Canevari,L. (2002). Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. *J. Neurosci. Res.* 67, 211-224.

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., and Kretzschmar,H. (1997a). The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 390, 684-687.

Brown,D.R., Schulz-Schaeffer,W.J., Schmidt,B., and Kretzschmar,H.A. (1997b). Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurology* 146, 104-112.

Bueler,H., Aguzzi,A., Sailer,A., Greiner,R.A., Autenried,P., Aguet,M., and Weissmann,C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73, 1339-1347.

Bueler,H., Fischer,M., Lang,Y., Bluethmann,H., Lipp,H.P., DeArmond,S.J., Prusiner,S.B., Aguet,M., and Weissmann,C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell- surface PrP protein. *Nature* 356, 577-582.

Bugge,T.H., Suh,T.T., Flick,M.J., Daugherty,C.C., Romer,J., Solberg,H., Ellis,V., Dano,K., and Degen,J.L. (1995). The receptor for urokinase-type plasminogen activator is not essential for mouse development or fertility. *J. Biol. Chem.* 270, 16886-16894.

Chen,S., Mange,A., Dong,L., Lehmann,S., and Schachner,M. (2003a). Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. *Mol. Cell Neurosci.* 22, 227-233.

Chen,S.G., Teplow,D.B., Parchi,P., Teller,J.K., Gambetti,P., and Autilio-Gambetti,L. (1995). Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. *J. Biol. Chem.* 270, 19173-19180.

Chen,Z.L., Indyk,J.A., and Strickland,S. (2003b). The hippocampal laminin matrix is dynamic and critical for neuronal survival. *Mol. Biol. Cell* 14, 2665-2676.

Chiarini,L.B., Freitas,A.R., Zanata,S.M., Brentani,R.R., Martins,V.R., and Linden,R. (2002). Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J.* 21, 3317-3326.

Danilov,Y.N. and Juliano,R.L. (1989). (Arg-Gly-Asp)<sub>n</sub>-albumin conjugates as a model substratum for integrin-mediated cell adhesion. *Exp. Cell Res.* 182, 186-196.

Engvall,E. and Ruoslahti,E. (1977). Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. *Int. J. Cancer* 20, 1-5.

Felding-Habermann,B. and Cheresch,D.A. (1993). Vitronectin and its receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 864-868.

Felding-Habermann,B., O'Toole,T.E., Smith,J.W., Fransvea,E., Ruggeri,Z.M., Ginsberg,M.H., Hughes,P.E., Pampori,N., Shattil,S.J., Saven,A., and Mueller,B.M. (2001). Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 1853-1858.

Gabriel,J.M., Oesch,B., Kretzschmar,H., Scott,M., and Prusiner,S.B. (1992). Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 9097-9101.

Gallet,X., Charlotiaux,B., Thomas,A., and Brasseur,R. (2000). A fast method to predict protein interaction sites from sequences. *J. Mol. Biol.* 302, 917-926.

Gartner,T.K., Loudon,R., and Taylor,D.B. (1991). The peptides APLHK, EHIPA and GAPL are hydrophatically equivalent peptide mimics of a fibrinogen binding domain of glycoprotein IIb/IIIa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180, 1446-1452.

Glatzel,M., Giger,O., Braun,N., and Aguzzi,A. (2004). The peripheral nervous system and the pathogenesis of prion diseases. *Curr. Mol. Med.* 4, 355-359.

Grabham,P.W., Gallimore,P.H., and Grand,R.J. (1992). Vitronectin is the major serum protein essential for NGF-mediated neurite outgrowth from PC12 cells. *Exp. Cell Res.* 202, 337-344.

Graner,E., Mercadante,A.F., Zanata,S.M., Forlenza,O.V., Cabral,A.L., Veiga,S.S., Juliano,M.A., Roesler,R., Walz,R., Minetti,A., Izquierdo,I., Martins,V.R., and Brentani,R.R. (2000a). Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 76, 85-92.

Graner,E., Mercadante,A.F., Zanata,S.M., Martins,V.R., Jay,D.G., and Brentani,R.R. (2000b). Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. *FEBS Lett.* 482, 257-260.

Heal,J.R., Roberts,G.W., Raynes,J.G., Bhakoo,A., and Miller,A.D. (2002). Specific interactions between sense and complementary peptides: the basis for the proteomic code. *Chembiochem.* 3, 136-151.

Hetz,C. and Soto,C. (2003). Protein misfolding and disease: the case of prion disorders. *Cell Mol. Life Sci.* 60, 133-143.

Hynes,R.O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25.

Hynes,R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687.

Isahara,K. and Yamamoto,M. (1995). The interaction of vascular endothelial cells and dorsal root ganglion neurites is mediated by vitronectin and heparan sulfate proteoglycans. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 84, 164-178.

Jimenez-Huete,A., Lievens,P.M., Vidal,R., Piccardo,P., Ghetti,B., Tagliavini,F., Frangione,B., and Prelli,F. (1998). Endogenous proteolytic cleavage of normal and disease-associated isoforms of the human prion protein in neural and non-neural tissues. *Am. J. Pathol.* 153, 1561-1572.

Kitami,T. and Nadeau,J.H. (2002). Biochemical networking contributes more to genetic buffering in human and mouse metabolic pathways than does gene duplication. *Nat. Genet.* 32, 191-194.

Lee,K.S., Linden,R., Prado,M.A., Brentani,R.R., and Martins,V.R. (2003). Towards cellular receptors for prions. *Rev. Med. Virol.* 13, 399-408.

Lei,Q., Zelman,A.K., Kuang,E., Li,S., and Matisse,M.P. (2004). Transduction of graded Hedgehog signaling by a combination of Gli2 and Gli3 activator functions in the developing spinal cord. *Development* 131, 3593-3604.

Letourneau,P.C., Pech,I.V., Rogers,S.L., Palm,S.L., McCarthy,J.B., and Furcht,L.T. (1988). Growth cone migration across extracellular matrix components depends on integrin, but migration across glioma cells does not. *J. Neurosci. Res.* 21, 286-297.

Liddington,R.C. and Ginsberg,M.H. (2002). Integrin activation takes shape. *J. Cell Biol.* 158, 833-839.

Martinez-Morales,J.R., Barbas,J.A., Marti,E., Bovolenta,P., Edgar,D., and Rodriguez-Tebar,A. (1997). Vitronectin is expressed in the ventral region of the neural tube and promotes the differentiation of motor neurons. *Development* 124, 5139-5147.

Martinez-Morales,J.R., Marti,E., Frade,J.M., and Rodriguez-Tebar,A. (1995). Developmentally regulated vitronectin influences cell differentiation, neuron survival and process outgrowth in the developing chicken retina. *Neuroscience* 68, 245-253.

Martins,A.R., Dias,M.M., Vasconcelos,T.M., Caldo,H., Costa,M.C., Chimelli,L., and Larson,R.E. (1999). Microwave-stimulated recovery of myosin-V immunoreactivity from formalin-fixed, paraffin-embedded human CNS. *J. Neurosci. Methods* 92, 25-29.

Martins,V.R. and Brentani,R.R. (2002). The biology of the cellular prion protein. *Neurochem. Int.* 41, 353-355.

Martins,V.R., Graner,E., Garcia-Abreu,J., de Souza,S.J., Mercadante,A.F., Veiga,S.S., Zanata,S.M., Neto,V.M., and Brentani,R.R. (1997). Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. *Nat. Med.* 3, 1376-1382.

Martins,V.R., Linden,R., Prado,M.A., Walz,R., Sakamoto,A.C., Izquierdo,I., and Brentani,R.R. (2002). Cellular prion protein: on the road for functions. *FEBS Lett.* 512, 25-28.

Mastrianni,J.A. and Roos,R.P. (2000). The prion diseases. *Semin. Neurol.* 20, 337-352.

Miele,G., Alejo Blanco,A.R., Baybutt,H., Horvat,S., Manson,J., and Clinton,M. (2003). Embryonic activation and developmental expression of the murine prion protein gene. *Gene Expr.* 11, 1-12.

Monier-Gavelle,F. and Duband,J.L. (1997). Cross talk between adhesion molecules: control of N-cadherin activity by intracellular signals elicited by beta1 and beta3 integrins in migrating neural crest cells. *J. Cell Biol.* 137, 1663-1681.

Morikawa,H., Khodakhah,K., and Williams,J.T. (2003). Two intracellular pathways mediate metabotropic glutamate receptor-induced Ca<sup>2+</sup> mobilization in dopamine neurons. *J. Neurosci.* 23, 149-157.

Neugebauer,K.M., Emmett,C.J., Venstrom,K.A., and Reichardt,L.F. (1991). Vitronectin and thrombospondin promote retinal neurite outgrowth: developmental regulation and role of integrins. *Neuron* 6, 345-358.

Oesch,B., Westaway,D., Walchli,M., McKinley,M.P., Kent,S.B., Aebersold,R., Barry,R.A., Tempst,P., Teplow,D.B., Hood,L.E., and . (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40, 735-746.

Pampori,N., Hato,T., Stupack,D.G., Aidoudi,S., Cheresch,D.A., Nemerow,G.R., and Shattil,S.J. (1999). Mechanisms and consequences of affinity modulation of integrin alpha(V)beta(3) detected with a novel patch-engineered monovalent ligand. *J. Biol. Chem.* 274, 21609-21616.

Pierschbacher,M.D. and Ruoslahti,E. (1984). Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 309, 30-33.

Pierschbacher,M.D. and Ruoslahti,E. (1987). Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on binding specificity in cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 262, 17294-17298.

Pons,S. and Marti,E. (2000). Sonic hedgehog synergizes with the extracellular matrix protein vitronectin to induce spinal motor neuron differentiation. *Development* 127, 333-342.

Pons,S., Trejo,J.L., Martinez-Morales,J.R., and Marti,E. (2001). Vitronectin regulates Sonic hedgehog activity during cerebellum development through CREB phosphorylation. *Development* 128, 1481-1492.

Prusiner,S.B. (1998). Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 13363-13383.

Riek,R., Hornemann,S., Wider,G., Billeter,M., Glockshuber,R., and Wuthrich,K. (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature* 382, 180-182.

Roberts,M.S., Woods,A.J., Shaw,P.E., and Norman,J.C. (2003). ERK1 associates with alpha(v)beta 3 integrin and regulates cell spreading on vitronectin. *J. Biol. Chem.* 278, 1975-1985.

Ross,C.A. and Poirier,M.A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat. Med.* 10 Suppl, S10-S17.

Ruoslahti,E. and Pierschbacher,M.D. (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238, 491-497.

Sales,N., Hassig,R., Rodolfo,K., Di Giamberardino,L., Traiffort,E., Ruat,M., Fretier,P., and Moya,K.L. (2002). Developmental expression of the cellular prion protein in elongating axons. *Eur. J. Neurosci.* 15, 1163-1177.

Scatchard,G. (1949). The attractions of proteins for small molecules and ions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 51, 666-672.

Schwartz,I., Seger,D., and Shaltiel,S. (1999). Vitronectin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 539-544.

Schwarz,D.G., Griffin,C.T., Schneider,E.A., Yee,D., and Magnuson,T. (2002). Genetic analysis of sorting nexins 1 and 2 reveals a redundant and essential function in mice. *Mol. Biol. Cell* 13, 3588-3600.

Seiffert,D., Iruela-Arispe,M.L., Sage,E.H., and Loskutoff,D.J. (1995). Distribution of vitronectin mRNA during murine development. *Dev. Dyn.* 203, 71-79.

Takagi,J., Petre,B.M., Walz,T., and Springer,T.A. (2002). Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* 110, 599-11.

Tsai,C.J., Lin,S.L., Wolfson,H.J., and Nussinov,R. (1997). Studies of protein-protein interfaces: a statistical analysis of the hydrophobic effect. *Protein Sci.* 6, 53-64.

Walz,R., Amaral,O.B., Rockenbach,I.C., Roesler,R., Izquierdo,I., Cavalheiro,E.A., Martins,V.R., and Brentani,R.R. (1999). Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. *Epilepsia* 40, 1679-1682.

Wayner,E.A., Orlando,R.A., and Cheresch,D.A. (1991). Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 contribute to cell attachment to vitronectin but differentially distribute on the cell surface. *J. Cell Biol.* 113, 919-929.

Xian,C.J., Li,L., Deng,Y.S., Zhao,S.P., and Zhou,X.F. (2001). Lack of effects of transforming growth factor-alpha gene knockout on peripheral nerve regeneration may result from compensatory mechanisms. *Exp. Neurol.* 172, 182-188.

Xu,D., Baburaj,K., Peterson,C.B., and Xu,Y. (2001). Model for the three-dimensional structure of vitronectin: predictions for the multi-domain protein from threading and docking. *Proteins* 44, 312-320.

Xu,Y. and Xu,D. (2000). Protein threading using PROSPECT: design and evaluation. *Proteins* 40, 343-354.



Yatohgo,T., Izumi,M., Kashiwagi,H., and Hayashi,M. (1988). Novel purification of vitronectin from human plasma by heparin affinity chromatography. *Cell Struct. Funct.* 13, 281-292.

Zahn,R., von Schroetter,C., and Wuthrich,K. (1997). Human prion proteins expressed in *Escherichia coli* and purified by high- affinity column refolding. *FEBS Lett.* 417, 400-404.

Zanata,S.M., Hovatta,I., Rohm,B., and Puschel,A.W. (2002a). Antagonistic effects of Rnd1 and RhoD GTPases regulate receptor activity in Semaphorin 3A-induced cytoskeletal collapse. *J. Neurosci.* 22, 471-477.

Zanata,S.M., Lopes,M.H., Mercadante,A.F., Hajj,G.N., Chiarini,L.B., Nomizo,R., Freitas,A.R., Cabral,A.L., Lee,K.S., Juliano,M.A., de Oliveira,E., Jachieri,S.G., Burlingame,A., Huang,L., Linden,R., Brentani,R.R., and Martins,V.R. (2002b). Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J.* 21, 3307-3316.

## III.2

### Ensaio Adicionais do estudo da Ligação PrPc-Vn

Nesta parte do trabalho serão apresentados alguns dados que ainda não se encontram em forma de manuscrito mas que são importantes para a construção de um modelo que possa agrupar as interações descritas nesta tese.

De início iremos demonstrar alguns dados referentes à conservação evolutiva da ligação PrPc-Vn, no que diz respeito a alterações de aminoácidos entre as espécies e conservação da ligação.

A seguir, mostraremos também alguns dados obtidos em colaboração com a Dra. Marilene H. Lopes sobre os efeitos de Vn em neurônios do sistema nervoso central. Também serão vistos os efeitos da combinação dois a dois, dos ligantes de PrPc (Vn e Ln, Vn e STI1, Ln e STI1) sobre culturas de neurônios da raiz dorsal. Neste sistema, ligantes de PrPc que interagem com domínios distintos da molécula (Ln e STI1; Ln e Vn), apresentam efeito aditivo. No entanto, ligantes para o mesmo domínio da molécula de PrPc (Vn e STI1) possuem efeito competitivo.

### III.2.1 – Estudos sobre a conservação evolutiva da ligação PrPc-Vn

Durante o andamento dos trabalhos relatados no item III.1, notamos que enquanto a seqüência de ligação de Vn em PrPc é extremamente conservada (resíduos 105-128, ver item III.1 discussão), a seqüência de Vn em que PrPc se liga, o domínio 309-322, varia um pouco entre as várias espécies nas quais a molécula foi sequenciada (Figura 2). Em camundongos e ratos a asparagina<sup>313</sup> (números de acesso “GenBank” BC018521 e NP062029) mostra-se alterada para aspartato<sup>315</sup> em humanos (número de acesso “GenBank” NM000638) sendo que esta substituição não altera substancialmente as características do peptídeo, pois ambos aminoácidos possuem tamanho semelhante e o mesmo índice de hidropaticidade. Há também uma substituição do glutamato<sup>318</sup> na seqüência humana para lisina<sup>318</sup> em coelhos (número de acesso “GenBank” M55442); e arginina<sup>295</sup> em porcos (número de acesso “GenBank” JC5139). Em nenhum dos casos as mudanças foram substanciais do ponto de vista da hidropaticidade. Portanto, para os experimentos abordados no presente estudo, utilizamos principalmente o peptídeo baseado na seqüência de camundongo, o que nos pareceu mais relevante levando em conta que a molécula de PrPc que utilizamos em nossos ensaios é murina.

Há ainda duas substituições, de glutamato<sup>318</sup>-lisina<sup>319</sup> em humanos, para lisina<sup>316</sup>-serina<sup>317</sup> na proteína de galinhas (número de acesso “GenBank” CAA71914). Isto faz com que o perfil de hidropaticidade seja interrompido. Desta forma, o peptídeo com base na seqüência de galinha também foi sintetizado e utilizado em ensaios de competição (estes ensaios foram realizados do mesmo modo que aqueles da figura 2 do item III.1). Na figura 3 percebemos que os três peptídeos de Vn contidos no sítio de interação com PrPc, baseados em seqüências de humanos (Vn<sub>309-322Hu</sub>), camundongos (Vn<sub>307-302Mo</sub>) e galinha (Vn<sub>307-320Ck</sub>), foram capazes de competir pela ligação PrPc-Vn, enquanto um peptídeo

irrelevante pertencente a outra região de Vn (Vn<sub>262-275</sub>) não mostrou nenhum efeito, o que sugere fortemente que a ligação PrPc-Vn é conservada evolutivamente. Além disso, o peptídeo de Vn que contém o sítio de interação desta molécula com integrinas (Vn<sub>RGD</sub>) também não interferiu com a ligação PrPc-Vn, demonstrando que os sítios de interação são distintos.

<b>VN309-322 humana -</b>	<b>QRDSWEDIFELLFW</b>
<b>VN307-320 camundongo -</b>	<b>QRDSWENIFELLFW</b>
<b>VN307-320 rato -</b>	<b>QRDSWENIFELLFW</b>
<b>VN309-322 coelho -</b>	<b>QRDSWEDIFKLLFW</b>
<b>VN286-299 porco -</b>	<b>QRDSWEDIFRLLFW</b>
<b>VN309-322 galinha -</b>	<b>NRDSWEDIFLSLFG</b>

Figura 2: Seqüência do peptídeo da região dos aminoácidos 309 a 322 de vitronectina humana e suas variações na seqüência de outros animais.

Para evidenciar o caráter evolutivo da ligação PrPc-Vn extraiu-se Vn de plasma de galinhas e realizou-se ensaios de ligação com esta proteína marcada radioativamente. Na figura 4 podemos observar que Vn de galinha, assim como Vn humana, ligam-se igualmente a PrPc (o ensaio foi realizado do mesmo modo que o ensaio da figura 1b, item 1). Demonstra-se desta maneira que esta interação mantém-se conservada desde aves até mamíferos.

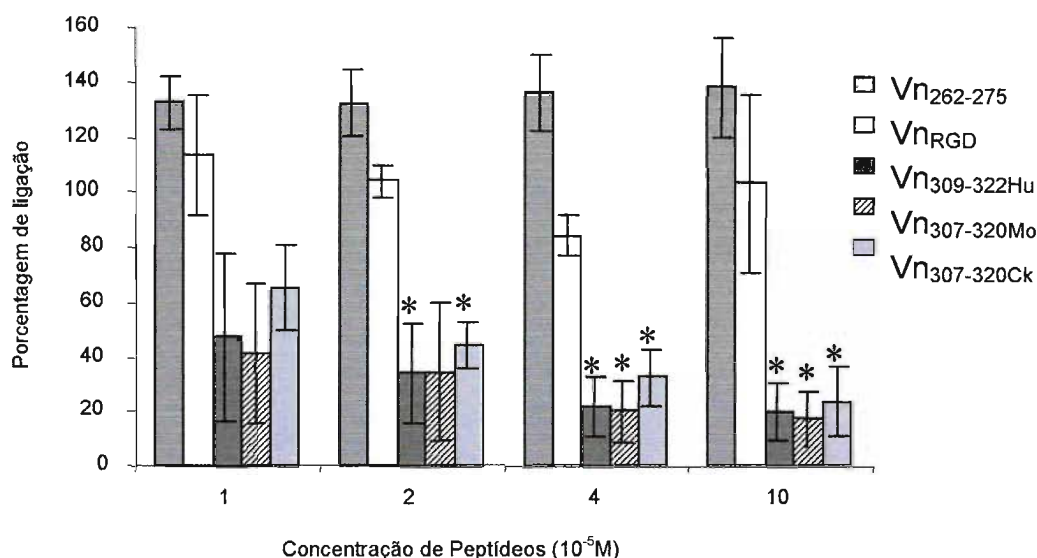


Figura 3: Ensaio de competição com peptídeos da VN. PrPc foi adsorvido a poços de poliestireno e, para bloquear reações inespecíficas, foi adicionada solução de albumina. Para a competição, os poços foram pré-incubados com as concentrações indicadas de peptídeos antes da adição de <sup>125</sup>I-VN. Os poços foram lavados e a radioatividade do material foi medida. A ligação entre PrPc e VN (sem a adição de nenhum peptídeo) foi considerada 100% para cada experimento e os resultados da ligação produzida pela competição com cada peptídeo estão expressos em percentagem relativa. Os valores representam a média de 3 experimentos e as barras verticais representam o desvio padrão. \* - estatisticamente significativo, p<0,01.

O gráfico da curva de ligação da figura 4 mostra valores de ligação a PrPc que chegam ao dobro daqueles apresentados na figura 1b do manuscrito “Cellular prion is a vitronectin receptor supporting axonal growth: redundancy mediated by integrins” (pág. 56) . Este não chega a ser um fator preocupante levando-se em conta que a Vn utilizada é obtida através de várias purificações independentes, partindo de plasma humano. Assim, dependendo da purificação pode-se observar alguma variação na atividade biológica desta proteína. Entretanto, a constante de afinidade obtida a partir da figura 4 permanece com a mesma ordem de grandeza do que a obtida no item III.1. Desta forma, considerando que este método de avaliação da afinidade de duas proteínas não é fisiológico nem leva em conta outras interações das proteínas envolvidas, acreditamos que uma estimativa da afinidade entre PrPc-Vn da ordem de grandeza de nM é suficiente para compreender o fenômeno que queremos demonstrar.

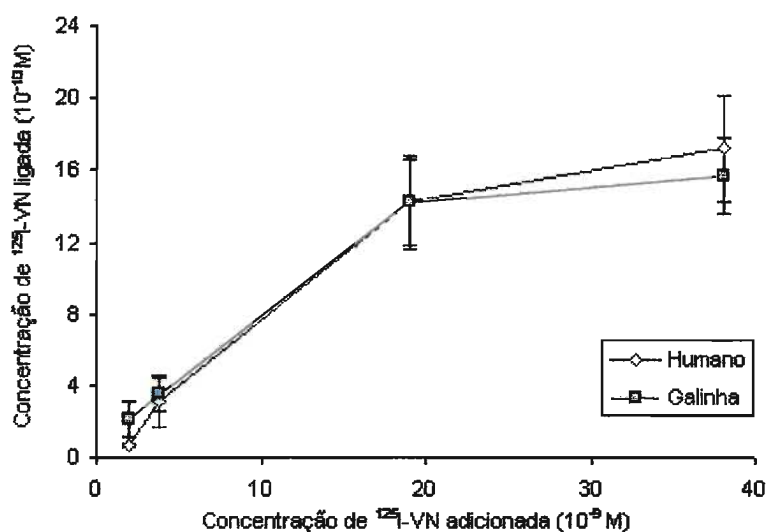


Figura 4: Ensaio de ligação entre PrPc e Vn humana ou de galinhas. PrPc foi adsorvido a poços de polistireno e, para bloquear reações inespecíficas, foi adicionada solução de albumina. Os poços foram incubados com concentrações crescentes  $^{125}\text{I-Vn}$ , lavados e a radioatividade do material foi medida.

### III.2.2 - O efeito de Ln e Vn sobre neurônios do sistema nervoso central ou periférico

Outro ponto importante deste projeto é saber se o papel fisiológico de Vn é igual tanto no sistema nervoso central quanto no periférico.

Como estabelecemos bem o papel de Vn no sistema nervoso periférico (gânglios da raiz dorsal), partimos para o estudo dos efeitos de Vn em células do hipocampo de embriões de camundongo com 17 dias de vida intra-uterina. Estes experimentos foram realizados do mesmo modo que aqueles indicados no ítem 4 deste capítulo. Vn é capaz de promover a neuritogênese tanto em animais normais quando em animais desprovidos do gene de PrPc (figuras 5 e 6).

A figura 5 (inserto) apresenta o controle negativo do experimento, onde as células hipocâmpais foram plaqueadas somente sobre poli-L-lisina, um polímero feito com o aminoácido lisina e que serve somente como substrato de adesão para os neurônios hipocâmpais, já que a adesão destas células sobre plástico é

muito baixa. Como era esperado, não foi possível observar o crescimento de neuritos durante todo o tempo de observação da cultura.

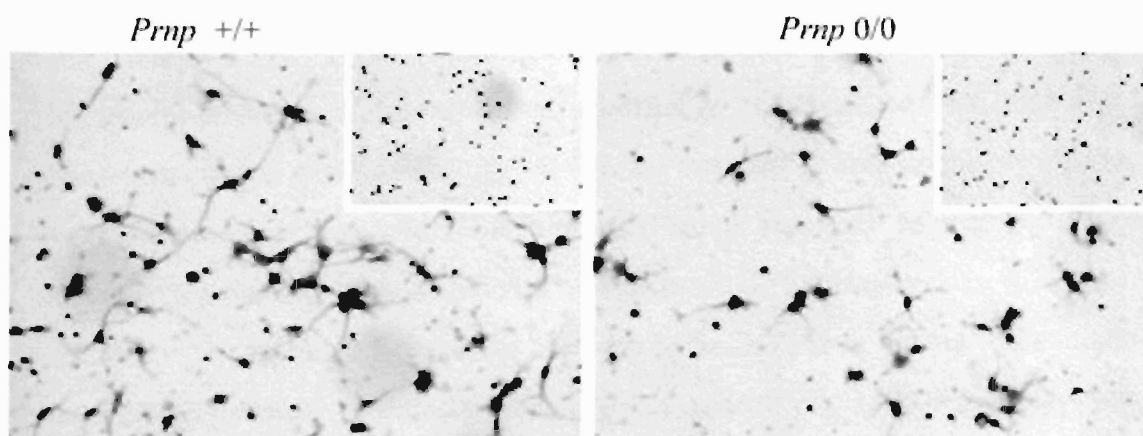


Figura 5: Crescimento neurítico estimulado por Vn. Células dissociadas de hipocampo de embriões de camundongos selvagens ( $Pmp^{+/+}$ ) e deficientes no gene de PrPc ( $Pmp^{0/0}$ ) com 17 dias foram cultivadas em presença Vn (200nM) durante 16 horas. Células sem nenhum estímulo estão representadas nos inserts. As células foram fixadas e coradas com hematoxilina.

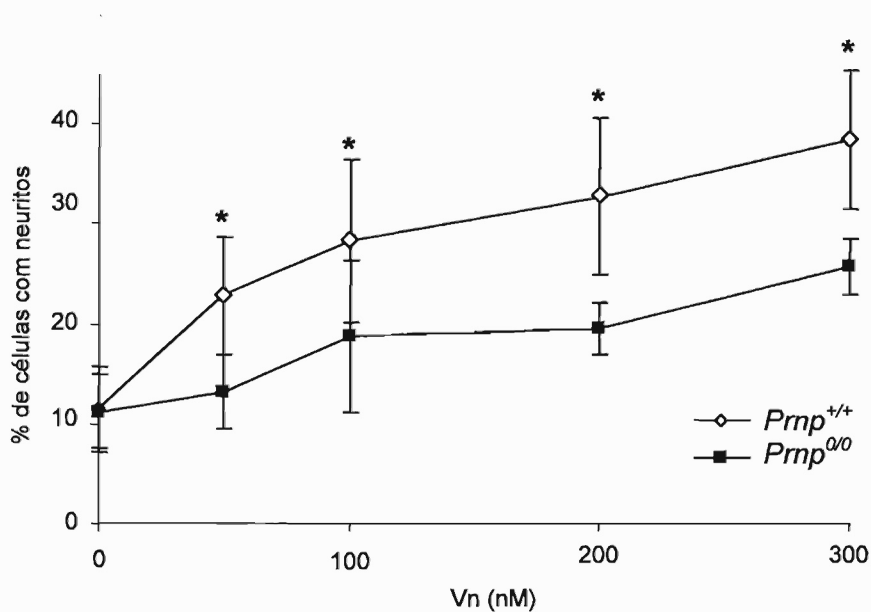


Figura 6: Crescimento neurítico estimulado por Vn. Células dissociadas de hipocampo de embriões de camundongos selvagens ( $Pmp^{+/+}$ ) e deficientes do gene de PrPc ( $Pmp^{0/0}$ ) com 17 dias foram cultivadas em presença Vn durante 16 horas. As células foram fixadas, coradas com hematoxilina e contou-se a percentagem de células que apresentava neuritos de tamanho maior que 3 corpos celulares. \* - Células de animais  $Pmp^{+/+}$  estatisticamente diferentes de  $Pmp^{0/0}$ , Mann-Whitney  $p < 0,02$ .



Nas figuras 5 e 6 podemos visualizar o que ocorre quando as células hipocampais são plaqueadas somente sobre poli-L-lisina e são estimuladas com Vn em solução no meio de cultura. Nas culturas estimuladas com concentrações mais baixas de Vn (50 nM) houve pouco crescimento de neuritos, que aumenta gradativamente com a adição de concentrações crescentes de Vn. Em animais deficientes para o gene de PrPc (*Prnp<sup>0/0</sup>*), no entanto, a neuritogênese é cerca de 30% menor do que nos animais selvagens (*Prnp<sup>+/+</sup>*) quando se adiciona Vn. Este fato reforça a participação de Vn nos mecanismos de formação de neuritos.

No sistema nervoso central a ausência de PrPc leva a uma diminuição no crescimento neurítico mediada tanto por Vn quanto por Ln. Estes dados vão de encontro ao que foi previamente mostrado para Ln pelo nosso grupo (Graner *et al.*, 2000a), onde se observou uma redução da capacidade de Ln promover neuritogênese em neurônios hipocampais provenientes de animais deficientes para PrPc.

Embora muito interessante, não houve tempo hábil para testarmos o comportamento das culturas primárias de células hipocampais frente a anticorpos anti-PrPc e ao peptídeo Vn<sub>307-320Mo</sub>.

Por outro lado, no sistema nervoso periférico, Vn medeia crescimento neurítico equivalente em neurônios provenientes de animais selvagens ou deficientes para PrPc, como visto no item 1 deste capítulo. Assim, é interessante verificar o comportamento das células de DRG provenientes de animais selvagens ou deficientes para o gene de PrPc frente a Ln.

Os experimentos realizados nesta etapa foram feitos com células dissociadas de DRG e seguem o protocolo descrito no item 1 deste capítulo. O primeiro passo foi verificar o comportamento destas células frente a Ln, um conhecido promotor da neuritogênese (Luckenbill-Edds, 1997) e ligante de PrPc. Em uma concentração sub-ótima de laminina, 2 µg/ml, praticamente não há efeito de neuritogênese (Figura 7). No entanto, quando se adsorve ao substrato uma concentração de 5 ou 10 µg/ml, há uma extensa neuritogênese celular, com

cerca de 80% das células apresentando neuritos em 6 horas (figura 7). Os neurônios que expressam ou não PrPc apresentam o mesmo padrão de neuritogênese frente a esta molécula. Em contraste, neurônios hipocampais de animais deficientes para PrPc apresentam neuritogênese menor (Graner *et al.*, 2000a).

Portanto, o comportamento das células do sistema nervoso central e do sistema nervoso periférico é diferente frente a Ln e Vn. No sistema nervoso central, os animais desprovidos do gene de PrPc apresentam deficiências no crescimento neurítico provocado por estas duas moléculas. Já no sistema nervoso periférico, mecanismos compensatórios estão presentes, de modo que o fenótipo final de crescimento neurítico é o mesmo para células provenientes de animais selvagens ou deficientes para PrPc. Estes mecanismos compensatórios são resultantes de uma ativação anormal de integrinas, particularmente da integrina  $\alpha_v\beta_3$ , ligante tanto de Vn (Ruoslahti *et al.*, 1987) quanto de Ln (Ponce *et al.*, 2001).

Por outro lado, as diferenças no comportamento das duas populações neuronais podem ser devido ao estágio da embriogênese em que elas são isoladas. As culturas de DRG são isoladas a partir de embriões de E12,5, enquanto as culturas de células hipocampais são isoladas de embriões de E17,5. De qualquer forma, é estranho imaginar que um evento compensatório para a ausência de PrPc possa estar ocorrendo em um estágio muito precoce da embriogênese e que este evento não seja mantido ao longo do desenvolvimento.

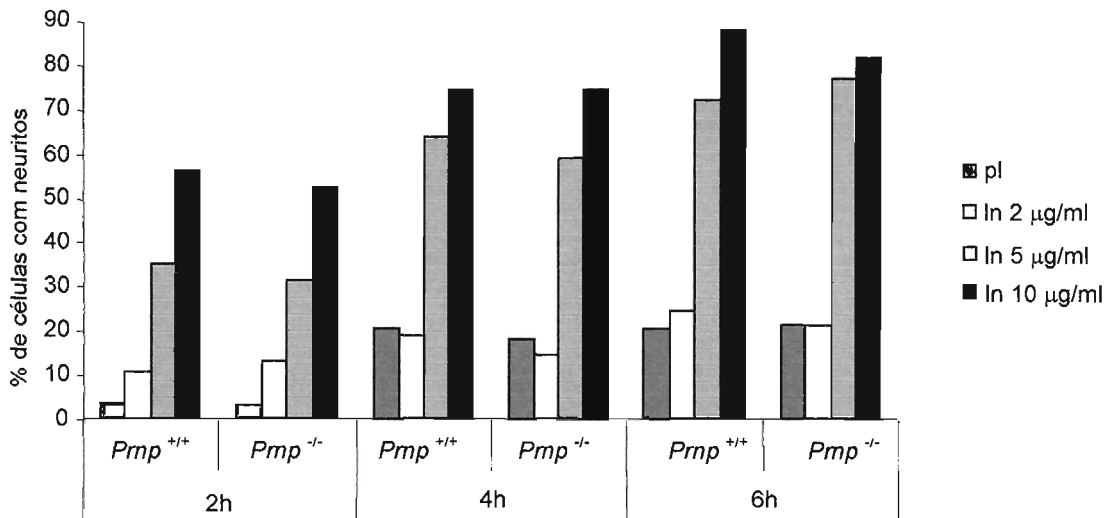


Figura 7: Crescimento neurítico estimulado por laminina. Células dissociadas de explantes de gânglios da raiz dorsal de embriões de camundongos selvagens (*Prnp*<sup>+/+</sup>) e deficiente para PrPc (*Prnp*<sup>0/0</sup>) com 12,5 dias foram cultivados em presença de concentrações crescentes de Ln adsorvida ao substrato durante 2, 4 ou 6 horas (2h, 4h e 6h, respectivamente).

### III.2.3 - Ação de STI1 no sistema nervoso periférico e combinação dos três ligantes neste modelo.

Ainda explorando a relação entre PrPc e seus ligantes, avaliamos o papel da proteína STI1 no crescimento dos neuritos. Esta proteína foi descrita também em nosso laboratório como sendo um ligante para PrPc importante para a sobrevivência de neurônios da retina (Zanata et al., 2002; Chiarini et al., 2002). Em células dissociadas de gânglios da raiz dorsal, STI também é capaz de promover crescimento neurítico, mas somente nos animais que possuem o gene de PrPc (figuras 8 e 9). A figura 9 apresenta uma curva dose-resposta em que uma concentração de 250 nM de STI1 é capaz de estimular a neuritogênese em cerca de 70% das células selvagens.

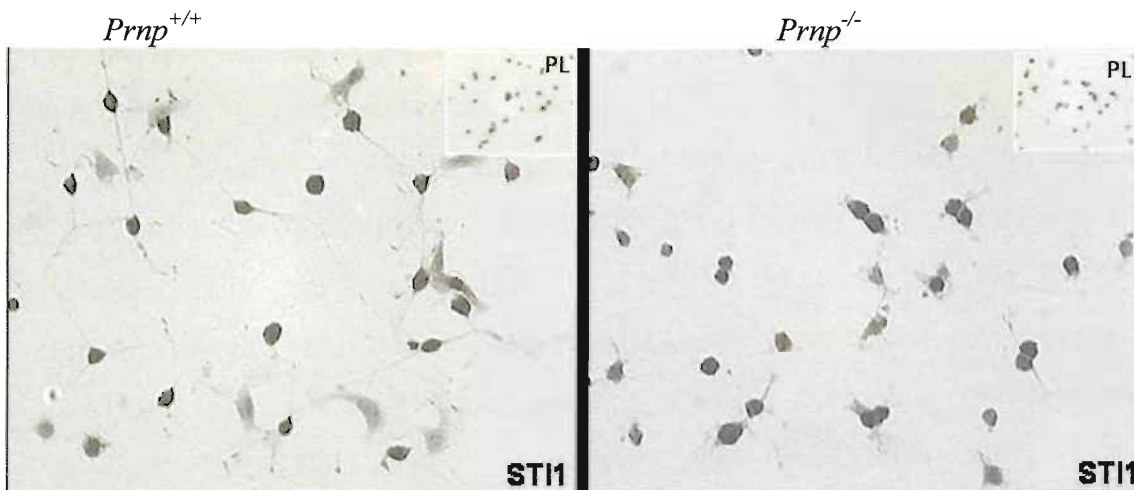


Figura 8: Crescimento neurítico estimulado por STI1. Células dissociadas de explantes de gânglios da raiz dorsal de embriões de camundongos selvagens ( $Prnp^{+/+}$ ) e deficiente para PrPc ( $Prnp^{0/0}$ ) com 12,5 dias foram cultivados em presença 250 nM STI1 durante 6 horas.

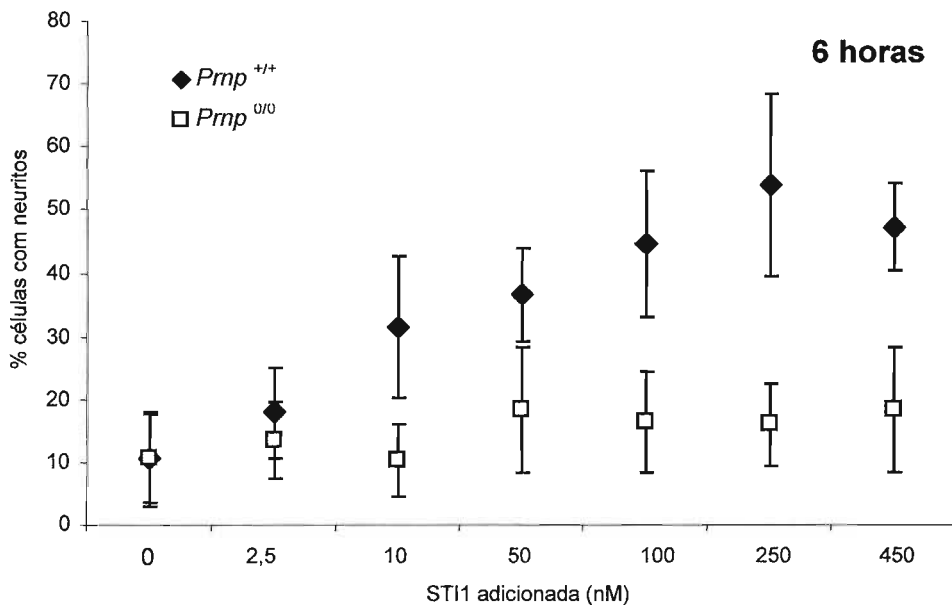


Figura 9: Crescimento neurítico estimulado por STI1. Células dissociadas de explantes de gânglios da raiz dorsal de embriões de camundongos selvagens ( $Prnp^{+/+}$ ) e deficiente para PrPc ( $Prnp^{0/0}$ ) com 12,5 dias foram cultivados em presença de STI1 durante 6 horas.

Células deficientes para PrPc, no entanto, não apresentam crescimento neurítico, demonstrando a dependência de PrPc para este evento. O mesmo

crescimento pode ser observado em células hipocâmpais, como será descrito em profundidade no item 4 deste capítulo.

Em trabalhos anteriores do grupo (Chiarini et al., 2002) foi observado que STI1 ativa as vias de sinalização PKA e MAPK, no entanto, somente a via de PKA está relacionada com a neuroproteção em células de retina. Se a via de MAPK também é ativada ela pode estar relacionada a outro evento biológico promovido por STI1, como por exemplo, a emissão de neuritos. Para verificar este aspecto, fomos observar se STI1 ativa a via de MAPK neste modelo de estudo. Na figura 10, podemos observar um ensaio de atividade de MAPK, realizado em células de gânglios da raiz dorsal tratadas com STI1 em diferentes tempos (este ensaio foi realizado do mesmo modo que aquele descrito no item 4). O primeiro fato que nos chama a atenção é que o nível basal de atividade de MAPK nos animais deficientes para PrPc é maior do que o observado nos animais selvagens. Isto já foi observado no modelo de estudo de neurônios da retina de animais neonatos (Chiarini et al., 2002), no hipocampo embrionário (item 4 deste capítulo) e no cérebro e cerebelo de animais adultos (Brown et al., 2002) confirmando então a presença de um possível evento compensatório em tipos neuronais distintos.

Também podemos ressaltar que a adição de STI leva a um aumento na atividade de MAPK em 30 segundos e que atinge um pico em 1 minuto. Como este experimento requer um número muito grande de células para sua realização, não foi possível ainda avaliar o efeito de STI1 em células de animais deficientes para PrPc.

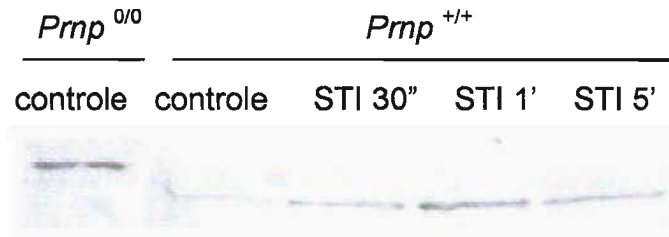


Figura 10: Atividade de MAPK em células de gânglios da raiz dorsal de embriões selvagens (*Prnp*<sup>+/+</sup>) e deficientes para o gene de PrPc (*Prnp*<sup>0/0</sup>). Culturas primárias de neurônios de gânglios da raiz dorsal foram plaqueadas sobre poli-lisina durante 16 horas (controle) e tratadas com STI1 por 30 segundos (STI 30"), 1 minuto (STI 1') ou 5 minutos (STI 5'). As células foram lisadas, MAPK foi imunoprecipitada e utilizada em ensaio de fosforilação de ELK-1 recombinante. O volume de reação foi corrido em SDS-PAGE e realizou-se Western Blot contra ELK-1 fosforilada. A figura apresenta o autoradiograma obtido.

A seguir fomos analisar o efeito combinado das moléculas STI1 e Vn sobre as culturas de neurônios (figura 11). Combinações de concentrações de STI1 e Vn tiveram um efeito muito curioso sobre as culturas. Em primeiro lugar, as duas proteínas não possuem efeito aditivo, mesmo em concentrações sub-ótimas. Além disso, uma concentração sub-ótima de Vn, associada a uma concentração de STI1 capaz de promover crescimento neurítico, é capaz de inibir o efeito da última.

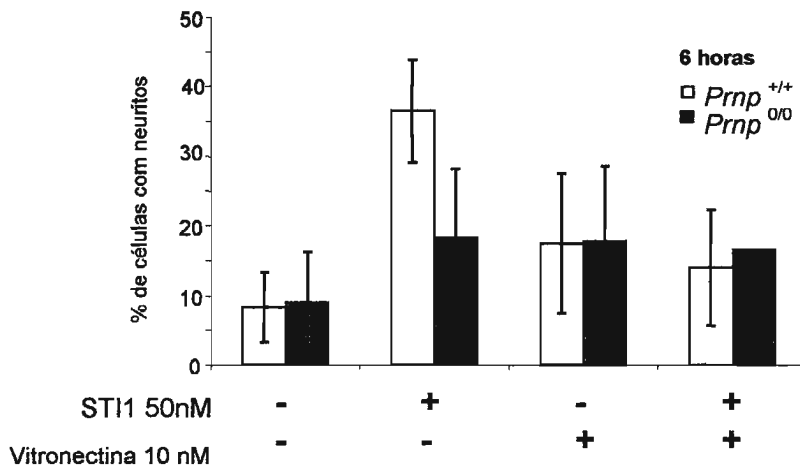


Figura 11: Crescimento neurítico estimulado por Vn e STI1. Células dissociadas de explantes de gânglios da raiz dorsal de embriões de camundongos selvagens (*Prnp*<sup>+/+</sup>) e deficientes para PrPc (*Prnp*<sup>0/0</sup>) com 12,5 dias foram cultivados em presença Vn, STI1 ou combinação das duas proteínas durante 6 horas.

Em seguida, fomos verificar o efeito combinatório de Ln e STI1. Ln foi utilizada em concentrações sub-ótimas associada a concentrações crescentes de STI1. Constatamos um efeito aditivo muito forte entre as duas proteínas, pois em apenas 2 horas houve crescimento de cerca de 60% das células (figuras 12 e 13) enquanto em todas as outras condições de crescimento realizadas, são necessárias 6 horas. Além disso, este efeito é específico para as células que possuem PrPc, já que células provenientes de animais deficientes para PrPc não apresentam crescimento.

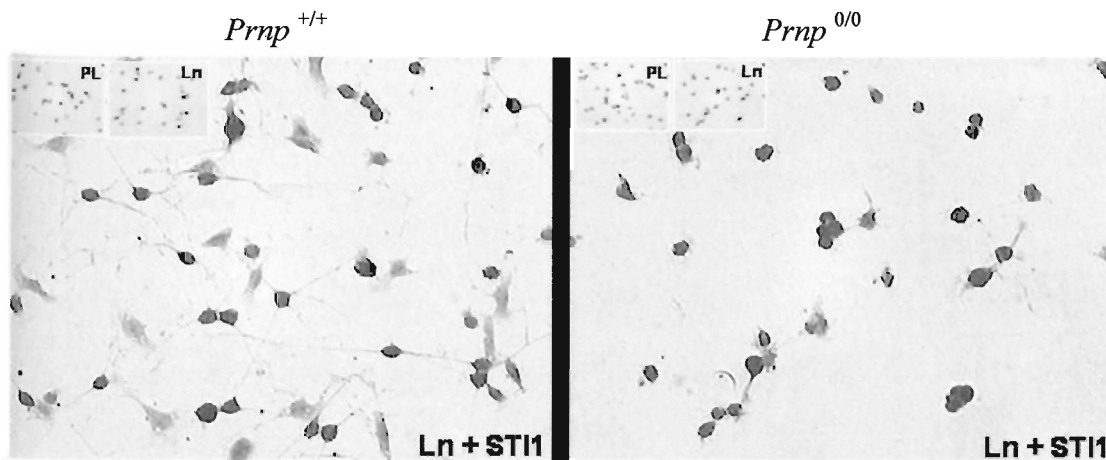


Figura 12: Crescimento neurítico estimulado por Ln e STI1. Células dissociadas de explantes de gânglios da raiz dorsal de embriões de camundongos selvagens ( $Prnp^{+/+}$ ) e deficientes para PrPc ( $Prnp^{0/0}$ ) com 12,5 dias foram cultivados em presença Vn, STI1 ou combinação das duas proteínas durante 2 horas.

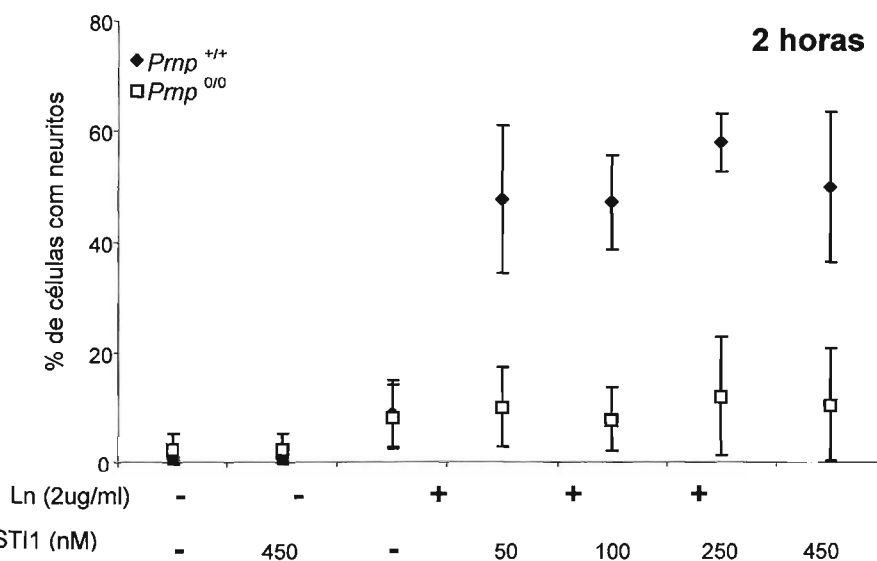


Figura 13: Crescimento neurítico estimulado por Ln e STI1. Células dissociadas de explantes de gânglios da raiz dorsal de embriões de camundongos selvagens ( $Prnp^{+/+}$ ) e deficientes para PrPc ( $Prnp^{0/0}$ ) com 12,5 dias foram cultivados em presença Vn, STI1 ou combinação das duas proteínas durante 2 horas.

Como observamos que tanto Ln quanto Vn possuem efeito neuritogênico sobre células de DRG, fomos, a seguir, observar o seu efeito combinado nestas células. Como visto na figura 5, Ln a uma concentração de 2µg/ml praticamente não produz efeito sobre a neuritogênese. No entanto, quando adicionamos a esta concentração de laminina, uma concentração também sub-ótima de Vn (25 nM) há um crescimento neurítico que se aproxima de 50% nas células de animais selvagens, mas não nas células de animais deficientes para PrPc (Figura 14).

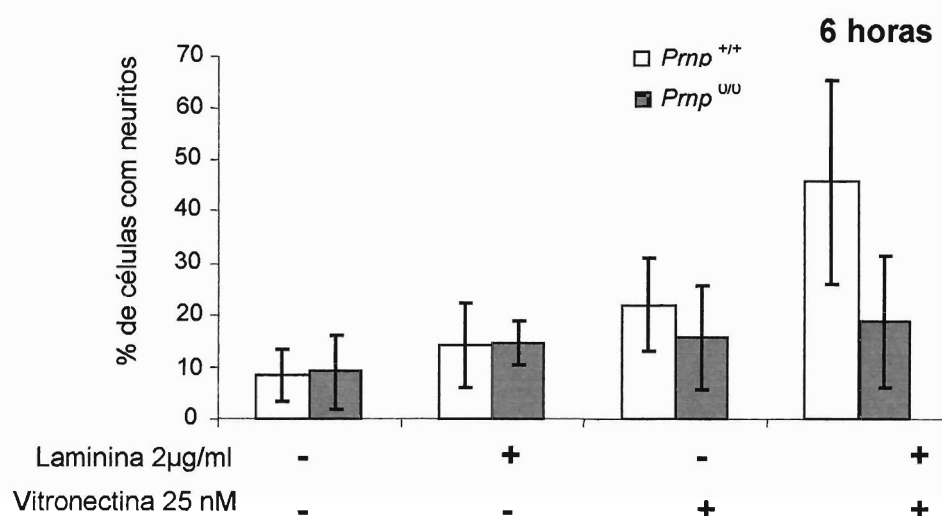


Figura 14: Crescimento neurítico estimulado por Vn e Ln. Células dissociadas de explantes de gânglios da raiz dorsal de embriões de camundongos selvagens (*Prnp*<sup>+/+</sup>) e deficientes para PrPc (*Prnp*<sup>0/0</sup>) com 12,5 dias foram cultivados em presença Vn, Ln ou combinação das duas proteínas durante 6 horas

Com todos estes resultados da ação combinada de vários ligantes de PrPc e seus efeitos observados aparentemente controversos, torna-se necessário propor um modelo no qual todas estas observações se encaixem.

Começaremos discutindo o efeito combinatório de Ln e Vn. Estas duas proteínas não possuem o mesmo sítio de ligação em PrPc, enquanto Vn liga-se aos aminoácidos 105-119, Ln liga-se aos resíduos 173-182 (ver figura 3 do item 5), o que possibilitaria a interação dos dois ligantes ao mesmo tempo em PrPc. Entretanto, em ensaios de ligação, observamos que Ln é capaz de competir pela



interação Vn-PrPc, provavelmente através de impedimento estérico, já que Ln é uma proteína de 900 kDa. Assim, provavelmente a ligação de uma das moléculas é exclusiva e pode impedir a ligação da outra. Contudo, há muitos outros receptores celulares para ambas as proteínas, de modo que mesmo na ausência de PrPc estas duas proteínas podem ligar-se a outros receptores celulares (integrinas por exemplo).

Em concentrações sub-ótimas nenhuma das duas proteínas tem atividade suficiente para ativar completamente a via de sinalização mediada por PrPc que em suma leva à neuritogênese. No entanto, a combinação da ativação parcial de PrPc por cada ligante faz com que o limiar de ativação das vias desencadeadas por esta proteína seja atingido, resultando num maior crescimento neurítico. Na ausência de PrPc (células deficientes para PrPc), Vn e Ln estariam provavelmente ligando-se a seus demais receptores específicos na superfície celular, no entanto as concentrações sub-ótimas não seriam suficientemente altas para desencadear as vias de sinalização elicitadas por cada receptor (Figura 15 A).

O mesmo raciocínio usado na interpretação da combinação de Ln+Vn serve para a combinação Ln+STII1, em que se observa um aumento muito grande da neuritogênese somente em animais selvagens. As duas moléculas em concentrações sub-ótimas não possuem atividade suficiente para desencadear a via de sinalização, mas quando são somadas o limiar de ativação da via é atingido e há neuritogênese. Também neste caso os sítios de ligação das moléculas é diferente (Zanata et al., 2002 e item III.5), o que possibilitaria a ligação das duas proteínas na mesma molécula de PrPc; se não houver impedimento estérico das moléculas envolvidas (Figura 15 B).

Outra possibilidade é a de que a adição de ligantes para PrPc e integrinas possibilite a aproximação entre os complexos e a criação de um "cluster" protéico, num evento similar os complexos de adesão focal.

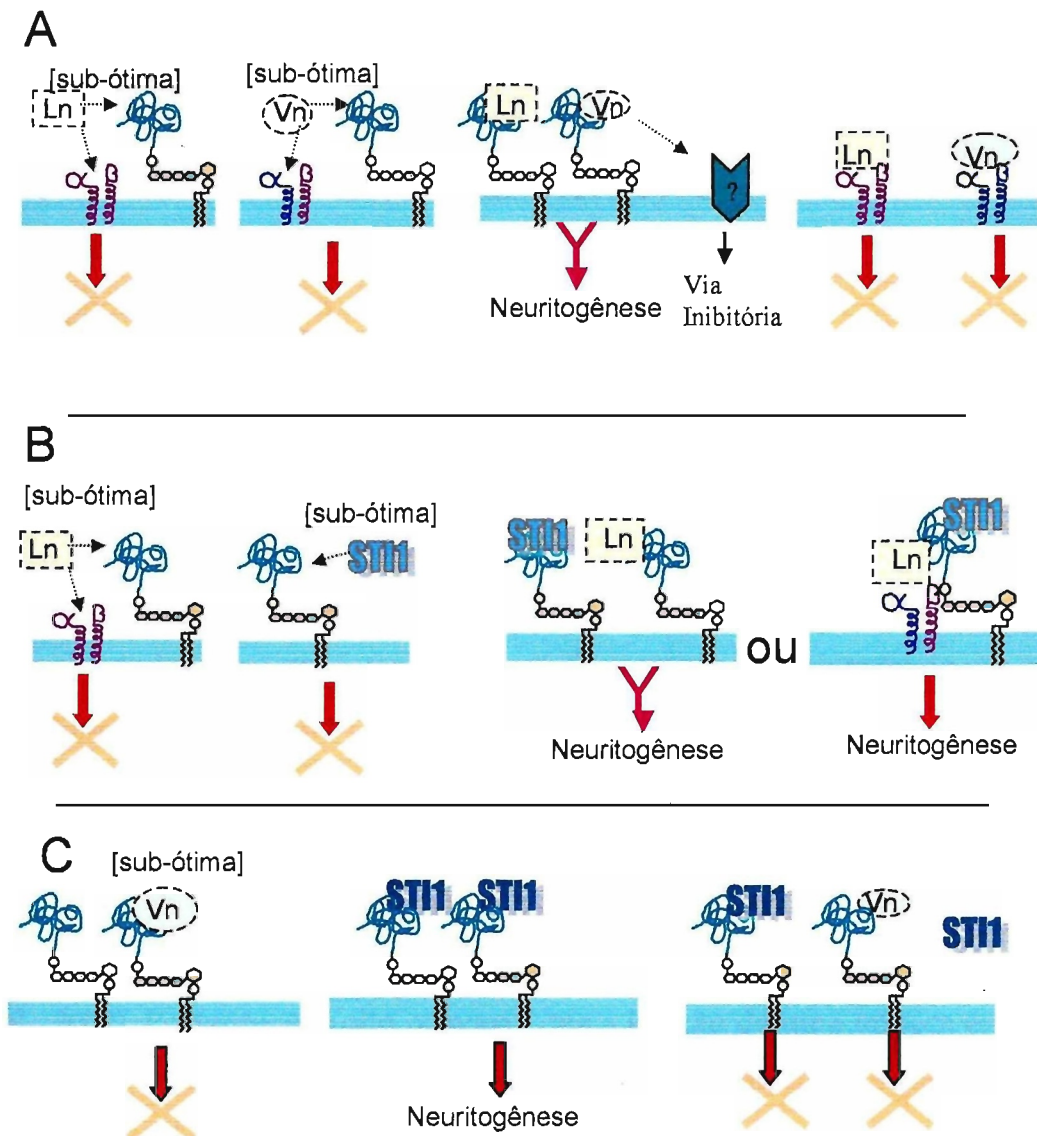


Figura 15: Esquema do modelo proposto para explicar as interações entre as proteínas PrPc, Vn, Ln e STI1. A parte A indica o modelo proposto para a situação em que Ln e Vn, quando adicionadas em concentrações sub-ótimas, apresentam efeito aditivo. A parte B indica modelo proposto para a situação em que Ln e STI1, quando adicionadas em concentrações sub-ótimas, possuem seus efeitos altamente potencializados. A parte C indica o modelo proposto para a situação em que se adiciona Vn e STI1 em concentrações sub-ótimas e a primeira é capaz de inibir o efeito da outra.

Há dois pontos diferentes, no entanto, entre as duas situações. Enquanto Ln e Vn possuem outros receptores na superfície celular capazes de desencadear

as vias de sinalização que levam à neuritogênese, o mesmo não ocorre com STI1, que na ausência de PrPc não é capaz de promover crescimento neurítico. Outro ponto importante é que a potenciação do efeito biológico é menor na combinação Vn+Ln do que na combinação STI1+Ln, cujo crescimento de neuritos corresponde a muito mais do que um efeito somatório de ambas as proteínas. Isto pode ser explicado de duas formas:

- há um receptor celular para Vn, cuja ligação contribui negativamente para a formação de neuritos, o que em última instância resultaria em uma “atividade menor” de Vn em relação a STI1;
- como o sítio de ligação de Ln em PrPc localiza-se na cadeia  $\gamma$  e o sítio de ligação a integrinas localiza-se na cadeia  $\alpha$ , é possível que Ln esteja neste caso funcionando como um fator “nucleante”, promovendo a junção de um complexo multiprotéico contendo PrPc, Ln, STI1 e integrinas.

Já na combinação Vn+STI1, Vn é capaz de bloquear o efeito de STI1, inibindo o crescimento de neuritos. Vn e STI1 ligam-se a sítios muito próximos na molécula de PrPc (o sítio para Vn localiza-se entre os aminoácidos 105-119 – Figura 2 do item III.1 - e o sítio para STI entre os aminoácidos 113-128, (Zanata et al., 2002). Portanto, é muito provável que a ligação de uma peça estericamente a ligação da outra. Este fato foi visto em ensaios de ligação (Figura 1 do item III.1), onde a adição STI1 não marcada impedia a ligação PrPc-Vn. Ainda, o  $K_d$  de ligação de Vn a PrPc é cerca de dez vezes maior que o  $K_d$  da ligação de PrPc a STI1, sendo estes  $10^{-8}$  M e  $10^{-7}$ M, respectivamente (Zanata et al., 2002). Assim, podemos imaginar que quando Vn e STI1 estão disponíveis para célula, haverá a ligação preferencial de Vn em PrPc, o que automaticamente excluirá a ligação de STI1. Como Vn na concentração utilizada ainda não é suficiente para promover o crescimento de neuritos, ela causa uma inibição do crescimento provocado por STI1, por excluí-la de sua associação a PrPc. Ainda, é coerente pensar que, enquanto Vn e Ln atuam por uma via de sinalização convergente, o mesmo não

ocorre com Vn e STI1, pois embora ambas as proteínas estejam ligando em PrPc, esta combinação não possui efeito aditivo (Figura 15 C).

### III.3

## Caracterização da Proteína STI1 como Ligante de PrPc e Evidências de seu Papel na Neuroproteção da Retina

Nesta parte do capítulo, se encontra o artigo “Stress inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection” de Zanata e colaboradores, que descreve a proteína STI1 como um ligante de PrPc através de ensaios bioquímicos, assim como sua localização na superfície celular e seu papel no mecanismo de neuroproteção.

Neste trabalho contribuí com ensaios bioquímicos para a caracterização de STI1 na superfície celular e de sua ligação com PrPc em ensaios *ex vivo*.

## OBSERVAÇÃO

The EMBO Journal vol.21 No. 13 pp.3307-3316, 2002

NÃO FOI AUTORIZADA A INCLUSÃO DESTE  
TRABALHO NESTE ARQUIVO

### III.4

## O Papel da Interação PrPc-STI1 no Mecanismo de Formação de Neuritos e Neuroproteção



Nesta parte do trabalho, está apresentado o manuscrito denominado “Interaction of cellular prion and Stress inducible protein 1 promotes neurite outgrowth and neuroprotection through distinct signaling pathways” e que foi realizado em igual contribuição com a Dra. Marilene H. Lopes.

O manuscrito relata a importância de PrPc e seu ligante STI1 nos processos de neuritogênese e de neuroproteção, além de dissecar as vias de sinalização importantes para cada um dos processos.

**INTERACTION OF CELLULAR PRION AND STRESS INDUCIBLE PROTEIN 1  
PROMOTES NEURITE OUTGROWTH AND NEUROPROTECTION  
THROUGH DISTINCT SIGNALING PATHWAYS**

Marilene H. Lopes<sup>1,2,5</sup>, Glaucia N. M. Hajj<sup>2,3,5</sup>, Angelita G. Muras<sup>1,2</sup>, Castro R. M.<sup>1,2</sup>, Rafael Linden<sup>4</sup>, Ricardo R. Brentani<sup>1,2</sup> and Vilma R. Martins<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Tratamento e Pesquisa – Hospital do Câncer, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo Branch, Rua Prof. Antônio Prudente 109/4A, 01509-010, São Paulo, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Lineu Prestes, 748 –05599-970, São Paulo, Brazil.

<sup>4</sup>Instituto de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, bloco G, Cidade Universitária, 21949-900, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>5</sup>These authors contributed equally to this work.

Running title: PrP<sup>c</sup>-STII interaction elicits neuritogenesis and neuroprotection

**Acknowledgements:**

We are grateful to Prof. Marco Prado for helpful discussions. We are also thankful to Carlos F. Nascimento, Severino da Silva Ferreira and Miyuki Fukuda da Silva for technical assistance. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP # 99/07124-8), CNPq, FAPERJ and PRONEX-MCT. Fellowships from FAPESP to M.H.L., G.N.M.H., and A.G.M. and from Coordenadoria de Apoio à Pesquisa (CAPES) to R.M.R.P.S.C. are gratefully acknowledged.

## ABSTRACT

Understanding of the physiological function of the cellular prion protein (PrP<sup>c</sup>) depends on the investigation of PrP<sup>c</sup> interacting proteins. We have previously identified a co-chaperone protein, STI1, stress inducible protein 1, as a specific PrP<sup>c</sup> ligand. PrP<sup>c</sup>-STI1 interaction promotes neuroprotection of retinal cells through cAMP-dependent protein kinase A (PKA). We studied the signaling pathways and functional consequences of the interaction of PrP<sup>c</sup> with STI1 in hippocampal neurons. Both PrP<sup>c</sup> and STI1 are abundantly expressed and highly co-localized in the hippocampus *in situ*, indicating that they can interact *in vivo*. To test whether STI1 plays a role in neuronal differentiation through its interaction with PrP<sup>c</sup>, we examined primary hippocampal cultures from either wild-type or PrP<sup>c</sup> null mice. STI1 elicited neurite outgrowth only in PrP<sup>c</sup> wild-type neurons, which was prevented by antibodies against PrP<sup>c</sup>, and dependent on the STI1 domain that binds PrP<sup>c</sup>. STI1 induced the phosphorylation/activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase Erk, which was essential for STI1-induced neurite outgrowth. STI1 also prevented cell death of PrP<sup>c</sup> wild-type neurons, dependent on the activity of PKA. The results demonstrate two parallel effects of the interaction of PrP<sup>c</sup> with STI1, neuritogenesis and neuroprotection, which are mediated by distinct signaling pathways.

**Keywords:** cellular prion protein/ MAPK/ neuritogenesis /neuroprotection /PKA /STI1.

## INTRODUCTION

Prions play a central role in the pathogenesis of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs). The main event associated with the development of TSEs is the conversion of the cellular prion protein (PrP<sup>c</sup>), into an insoluble and protease-resistant conformer (PrP<sup>sc</sup>) (Aguzzi and Polimelidou et al., 2004). PrP<sup>c</sup> is a ubiquitous, glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein, the physiological functions of which are still under discussion. Several biological roles for PrP<sup>c</sup> have been proposed, such as protection against oxidative insults, neuronal adhesion, cell differentiation and cell survival, as well as modulation of bacterial infection, phagocytosis and inflammatory responses (Martins et al., 2002; Watarai et al., 2003; de Almeida et al., 2004). Components of various signal transduction pathways, including the Src-related family member p59<sup>Fyn</sup>, PI3 kinase/Akt, PKA and mitogen activated protein kinases (MAPK) have been suggested to mediate presumptive roles of PrP<sup>c</sup> in neuronal survival and neurite outgrowth (Chen et al., 2003).

PrP<sup>c</sup> is constitutively expressed on neurons, and is especially abundant in regions such as the olfactory bulb, hippocampus and synaptic neuropil in close spatio-temporal association with synapse formation. The localization of PrP<sup>c</sup> on elongating axons suggests a role for this protein in axon growth (Sales et al., 1998; Sales et al., 2002). Interestingly, interaction of PrP<sup>c</sup> with the extracellular matrix protein laminin has been shown to promote the outgrowth and maintenance of neurites (Graner et al., 2000a; Graner et al., 2000b).

Investigation of PrP<sup>c</sup>-interacting proteins is an important tool to understand the biological function(s) of PrP<sup>c</sup>. For example, strong evidence for a neuroprotective PrP<sup>c</sup> function derives from our description of a putative PrP<sup>c</sup> p66 ligand (Martins et al., 1997), which was later identified as the Stress Inducible protein 1, STI1 (Zanata et al., 2002).

STI1 was first described in *Saccharomyces cerevisiae*, where it was implicated in mediating the heat shock response of some Hsp70 genes (Nicolet and Craig, 1989). Murine STI1 has 97% amino acid identity with its human homologous designated Hop [heat shock protein 70 (Hsp70)/heat shock protein 90 (Hsp90)-organizing protein]. STI1, like Hop, interacts simultaneously with Hsp70 and Hsp90 at its N- and C-termini (van der

et al., 2000; Carrigan et al., 2004). This tripartite interaction facilitates transfer of substrates from Hsp70 to Hsp90 and is important for proper folding and maturation of Hsp90 substrates, many of which are involved in signaling (Hernandez et al., 2002).

Interaction of PrP<sup>c</sup> with either STI1 or with a peptide mimicking the PrP<sup>c</sup>-binding domain of STI1 prevented programmed cell death of undifferentiated post-mitotic retinal cells (Chiarini et al., 2002). Engagement of PrP<sup>c</sup> increased intracellular cAMP, and activated the Erk pathway in retinal tissue. However, the neuroprotective effect required the activity of cAMP-dependent protein kinase (PKA), rather than MAP kinase (Chiarini et al., 2002).

We have proposed that PrP<sup>c</sup> is part of a multi-protein complex that modulates various cellular functions, depending on both protein combination and cell type (Martins et al., 2002). Therefore, it is important to dissect the cell signaling and biological significance of the association of PrP<sup>c</sup> with each one of its partners.

We have, therefore, examined the functional responses and signaling pathways induced by the interaction of STI1 with PrP<sup>c</sup> in hippocampal neurons, particularly the roles of the cAMP/PKA and Erk pathways.

We found that PrP<sup>c</sup> and STI1 co-localize in the hippocampus, and that the interaction of STI1 with PrP<sup>c</sup> has pronounced effects on both neurite outgrowth and survival in hippocampal neurons. The neuritogenesis was found to be dependent on MAPK activity, while cAMP-dependent PKA mediates neuroprotection.

## MATERIAL AND METHODS

**Proteins, peptides and antibodies:** Mouse recombinant STII was purified as previously described (Zanata et al., 2002). Peptides corresponding to mouse STII amino acid sequences pepSTII<sub>203-245</sub> (aa. 230-ELGNDAYKKKDFDKAL-245) and pepSTII<sub>422-437</sub> (aa. 422-QLEPTFIKGYTRKAAA-437) were chemically synthesized by Neosystem (Strasburg, France). Polyclonal antibody anti-pepSTII<sub>203-245</sub> raised in rabbit and monoclonal antibody 6H4 against amino acids 144-152 of human PrP<sup>c</sup> molecule were obtained from Bethyl (Texas, USA) and Prionics (Zurich, Switzerland) respectively.

**Immunohistochemistry:** Embryonic day (E) 17 mouse embryos were fixed with formalin and embedded in paraffin, and sections (3-5µm) were deparaffinized, rehydrated and subject to epitope retrieval by microwave in 10mM citrate buffer (pH 6.4). Additional treatment was made with 50mM glycine, 0.02g/l Triton X-100, 0.5g/l nonfat dry milk and 1.5g/l non-immune goat serum (Martins et al., 1999). Endogenous peroxidase was blocked with 0.3g/l hydrogen peroxide. Sections were then incubated overnight at 4°C with the primary antibodies, anti-PrP<sup>c</sup> produced in PrP null mice against recombinant PrP<sup>c</sup> (Chiarini et al., 2002), or anti-STII, produced in rabbit against recombinant STII (Zanata et al., 2002), diluted in PBS plus 0.5g/l nonfat dry milk and 1.5g/l normal goat serum, followed by peroxidase-coupled anti-rabbit and anti-mouse IgG incubation for 60 minutes at room temperature. After that, was done incubation for 60 minutes at 37°C with Dako EnVision Labeled Polymer peroxidase. Color was developed using DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride - Sigma, USA) and counterstained with haematoxylin. Sections were visualized in an Olympus IMT2-NIC microscope.

**Immunofluorescence:** *Tissue:* The brains of E17 wild-type and *Prnp* null mice were removed and immediately frozen in liquid nitrogen. Cryostat sections (3µm) were fixed in ice cold acetone for 30 minutes and air dried. Then, they were re-hydrated and blocked with TBS (20mM Tris, 150mM NaCl) containing 0.1% Triton-X100, 10% normal goat serum and 50µg/ml anti-mouse IgG at room temperature for 1 hour. Brain sections were then incubated at room temperature for 16 hours with anti-PrP<sup>c</sup> mouse serum (1:250) and

anti-STII rabbit serum (1:100) (Zanata et al., 2002) in TBS 0.1% Triton-X100 with 1% normal goat serum. After washing, anti-mouse Alexa-568 (Molecular Probes) 1:3000 and anti-rabbit FITC (Pharmingen) 1:1000 were added to the slices and incubated in the same buffer for 1 hour at room temperature.

**Cultured cells:** Hippocampal cells ( $8 \times 10^4$  cells) were grown on glass coverslips coated with poly-L-lysine, washed with PBS and fixed for 20 min. at room temperature with 4% *p*-formaldehyde, 0.12M sucrose in PBS. After rinsing with PBS, cells were blocked for 1 h at room temperature with blocking solution (1% goat serum in PBS-0.1% Triton supplemented with 50 $\mu$ g/ml anti-mouse IgG). For PrP<sup>c</sup> and STII staining, cells were incubated for 16h at 4°C with antibodies anti-PrP<sup>c</sup> raised in *Prnp*<sup>0/0</sup> mouse (1:150) and anti-STII (1:100) (Zanata et al., 2002) diluted in blocking solution, followed by washing with PBST. The secondary antibodies anti-mouse Alexa 586 1:3000 (Molecular Probes) or anti-rabbit FITC 1:1000 (Sigma) diluted in blocking solution were incubated for 1h at room temperature. After additional washes, the slides were coverslipped using Fluoromount (Southern Biotech). Immunolabeled cells were imaged with a Bio-Rad Radiance 2100 laser scanning confocal system running the software Laser Sharp 3.0 coupled to a Nikon microscope (TE2000-U). A Argon (488nm) and a Green HeNe (543nm) lasers were used to excite the fluorophores. Image processing was done with Photoshop (Adobe Systems).

**Immunoblotting analysis:** Protein extracts were prepared from hippocampal cells from *Prnp*<sup>+/+</sup> and *Prnp*<sup>0/0</sup> mice (Bueler et al., 1992) in Laemmli buffer. STII was visualized by 10% SDS-PAGE and immunoblotting with polyclonal antibody anti-STII (1:10,000) (Zanata et al., 2002). Protein loading control was performed with anti-actin polyclonal antibody (1:200, Sigma). Rabbit non-immune purified IgG was used as negative control.

**Construction of STII $\Delta$ 230-245:** Recombinant PCR technique (Ausubel et al., 1993) was used to delete the PrP<sup>c</sup> binding site of STII. We amplified cDNA fragments employing pTRC-His A STII (Zanata et al., 2002) with internal primers 5'AAA GAG AAG AAG CAT TAT GAC 3', 5'GTC ATA ATG CTT CTT CTC TTT 3' and external primers 5'CCG CTC GAG GAG CAG GTG AAT GAG CTA AAG GA 3' and 5'CGG GGT

ACC TCA CCG AAT TGC GAT GAG ACC C 3'. The PCR fragments were cloned between *XhoI* e *KpnI* restriction sites in the same vector. Sequencing analysis was done to check for the deletion. The expression and purification of this protein followed the same protocol as previously described (Zanata et al., 2002).

**Overlay assay:** The indicated amounts of recombinant PrP<sup>c</sup> and BSA (Bovine serum albumin) were adsorbed onto nitrocellulose membrane. In order to block nonspecific binding, the membrane was incubated with 5% nonfat milk in TBST (TBS 0.05% Tween-20) for 1 hour at room temperature and washed. Then, the membrane was incubated with either wild-type STI1 (2µg) or mutant STI1Δ230-245 (2µg) for 16 hours at 4°C. After extensive washing with TBST, membranes were incubated with polyclonal antibody anti-STI1 (1:10,000) (Zanata et al., 2002) for 2 hours at room temperature, followed by a second incubation with peroxidase-coupled anti-rabbit IgG. The reaction was developed using enhanced chemiluminescence (ECL – Amersham Biosciences).

**Neurite outgrowth assays:** Primary hippocampal cultures were obtained from E17 brains of either wild-type (*Prnp*<sup>+/+</sup>, a strain generated by crossing F1 from mating 129/SV and C57BL/6J) or *Prnp*<sup>0/0</sup> mice (Bueler et al., 1992). The hippocampal structure was aseptically dissected in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Invitrogen) and treated with trypsin (0.06%) in HBSS for 20 min at 37°C. The protease was inactivated with 10% FCS (fetal calf serum) in Neurobasal medium (Invitrogen) for 5 min. After three washes with HBSS, cells were mechanically dissociated in Neurobasal medium containing B-27 supplement (Invitrogen), Glutamine (2mM) (Invitrogen), penicillin (100IU) and streptomycin (100µg/ml) (Invitrogen). The cells (4x10<sup>4</sup> cells) were plated onto coverslips (13mm) coated with 5µg/ml of poly-L-lysine (Sigma) and treated with recombinant STI1, STI1Δ230-245, peptides pepSTI1<sub>230-245</sub> and pepSTI1<sub>422-437</sub> for 16 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Antibodies anti-PrP<sup>c</sup> (6µg/ml) and anti-pepSTI1<sub>230-245</sub> (1:200) antibodies were incubated for 24h after treatment with STI1. The cells were fixed with 4% p-formaldehyde in 0.12M sucrose in PBS for 20 min. at room temperature, washed 3 times with PBS and stained with hematoxylin. To score neurite outgrowth, each well was analyzed under 400 x magnification. A neurite was defined as a process with a length 3



or more times greater than the respective cell body. In each experiment, 300 cells in each well were analyzed. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation from at least three independent experiments.

**MAPK phosphorylation and activity assays:** Phosphorylation assays were done using the PhosphoPlus p44-42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) antibody kit (Cell Signaling) according to the manufacturer's instructions. Briefly, primary hippocampal cell cultures ( $10^6$  cells) from either wild-type or *Prnp* null mice were grown on plates pretreated with poly-L-lysine, and stimulated with STI1 ( $4.9 \times 10^{-7}$  M) for different incubation periods, rinsed once with ice-cold PBS and lysed in Laemmli buffer. For assaying Erk phosphorylation, cell extracts were subject to SDS-PAGE, followed by immunoblotting with anti-phospho-Erk and anti-Erk antibodies (Cell Signaling). The bands obtained after X-ray film exposure to the membranes were analyzed by densitometric scanning and quantified using the Scion Image software. The p44/42 MAP Kinase Assay kit (Cell Signaling) was used for estimating the activity of MAPK in primary hippocampal cultures treated with STI1 ( $4.9 \times 10^{-7}$  M). Cells were disrupted in lysis buffer, centrifuged for 10 min at 4°C and the supernatant was transferred to a fresh tube. Active MAPK was immunoprecipitated from approximately 80  $\mu$ g of total protein in each sample using an immobilized phospho-p44/42 MAP kinase monoclonal antibody (Cell Signaling). MAPK activity was evaluated by incubation with Elk-1 substrate, followed by electrophoresis and immunoblotting with anti-phospho Elk-1.

**Assay of cell death:** Primary hippocampal cultures ( $4 \times 10^4$  cells) from wild-type or *Prnp* null mice were grown on coverslips pretreated with poly-L-lysine and pre-incubated with either STI1 (7  $\mu$ M) or control buffer (PBS) for 2 h. Then, the cultures were treated with the apoptosis inducer, staurosporine, for 16h. Cell cultures treated with specific inhibitors (KT5720, U0126, Bim and Chel) received the drug 1h before the incubation with STI1. The cell cultures were fixed with p-formaldehyde and 0.12M sucrose in phosphate buffer pH 7.4 for 20 min and stained with propidium iodide (Sigma) in PBS-0.1% Triton for 20 min. The cell death induced by staurosporine (Favata et al., 1998) was detected as condensed and pyknotic profile. At least three independent experiments were performed and 3 microscopic fields were counted in each group.

**Cellular signaling inhibitors:** The MEK inhibitor 1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis (2-aminophenyltio) butadiene (U0126-Promega) dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) was added to cells for 1h before stimulation of neuritogenesis by STI1 ( $3.5 \times 10^{-7} \text{M}$ ). Control cultures received the same concentration of DMSO (0.005%). Other specific signaling pathways were inhibited with following inhibitors: KT5720-Calbiochem for cAMP/PKA or bisindolylmaleimide (BIM) and Chelerethrin Chloride (Chel)-Calbiochem for PKC.

**Statistical analysis:** The results represent the mean  $\pm$  standard deviation of at least three independent experiments. The statistical significance of experimental data was tested using the non-parametric Mann-Whitney test.

## RESULTS

### Expression and co-localization of STI1 and PrP<sup>c</sup> in hippocampus

STI1 is expressed in a variety of neurons and glia during neural development as well as in the adult nervous system, suggesting potential roles for this protein during development, plasticity and regeneration (data not shown). We compared the expression of STI1 and PrP<sup>c</sup> in the embryonic brain. Sections from E17 mouse brain showed strong immunoreactivity of both STI1 and PrP<sup>c</sup> in the cerebral cortex and developing hippocampus (Fig.1A and B respectively). STI1 levels were examined in brain homogenates from *Prnp*<sup>+/+</sup> and *Prnp*<sup>0/0</sup> mice using SDS-PAGE followed by immunoblotting. Figure 1C shows that STI1 levels are similar in the brains from both genotypes. Thus, STI1 expression seems to be independent of PrP<sup>c</sup>. When viewed through confocal fluorescence microscopy, brain sections from *Prnp*<sup>+/+</sup> mice confirmed an abundant concentration of both STI1 (Fig.1 G and J) and PrP<sup>c</sup> in cortex and hippocampus (Fig1 H and K). Figures 1D, E and F represent brain sections from *Prnp*<sup>0/0</sup> mice, in which only STI1 was detected. The distributions of both PrP<sup>c</sup> and STI1 in hippocampus are relatively uniform, and immunolabeling is co-localized (Fig. 1 I and L), suggesting that both proteins can interact in this region of the brain. In dissociated *Prnp*<sup>+/+</sup> hippocampal cells, we detected extensive co-localization of STI1 and PrP<sup>c</sup> along neurites and in the perinuclear region (Fig. 2 C).

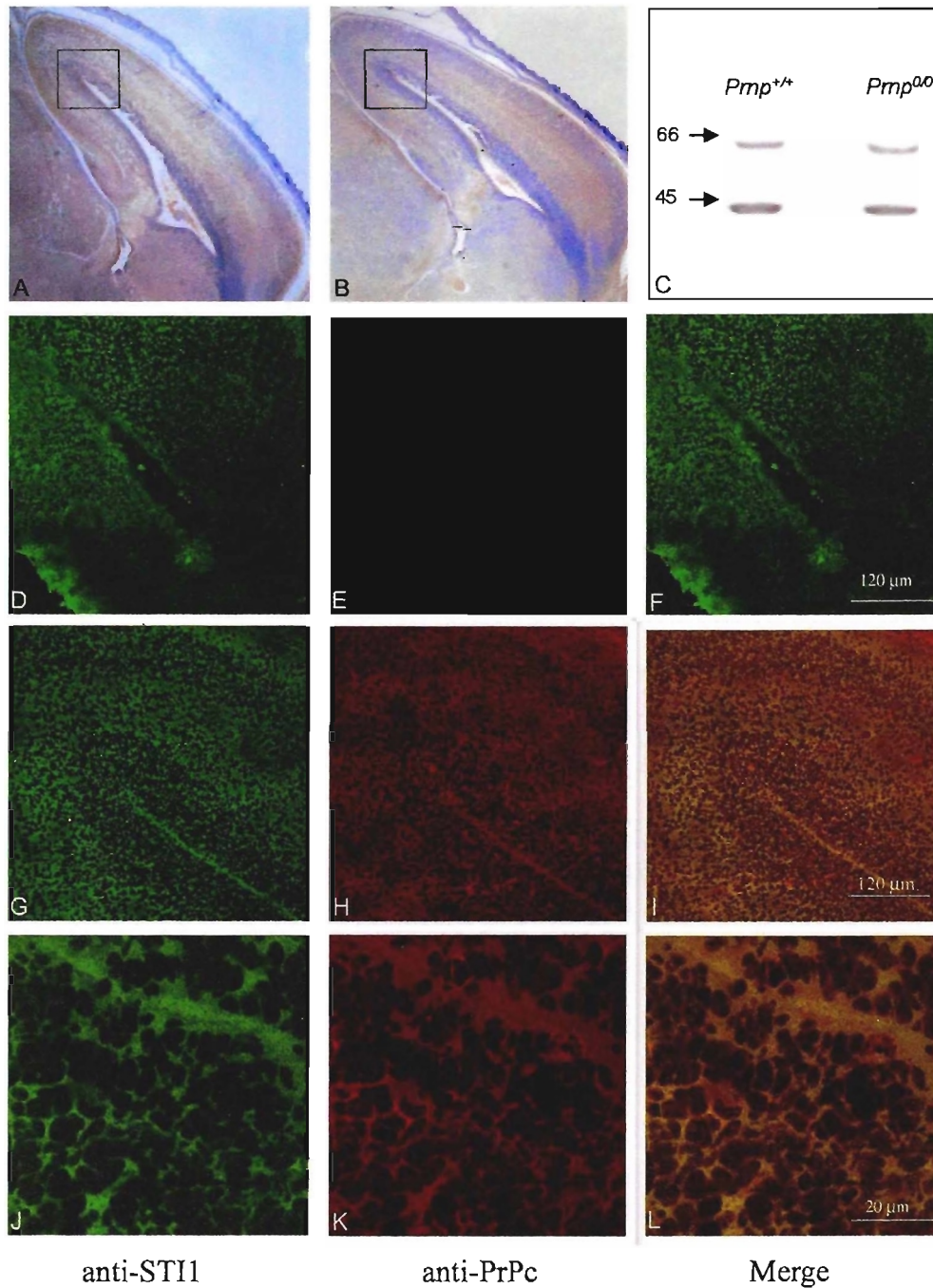
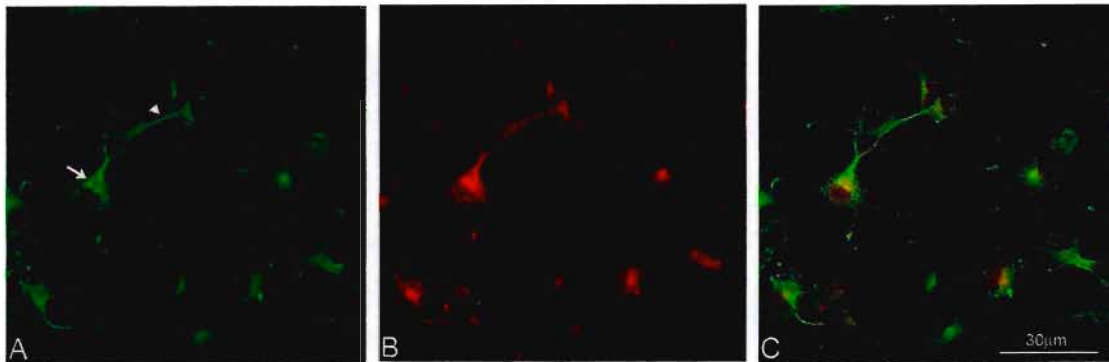


Figure 1: **STI1 and PrP<sup>c</sup> are expressed and co-localize in the hippocampus.** A-B, histological sections of *Prnp*<sup>+/+</sup> mice embryos (E17) brain were immunostained for PrP<sup>c</sup> (A) and STI1 (B) and counterstained with hematoxylin. C, brain homogenates from wild-type (*Prnp*<sup>+/+</sup>) and PrP<sup>c</sup> null (*Prnp*<sup>0/0</sup>) mice were analyzed by immunoblotting using anti-STI1 and actin antibodies. The arrows point to the molecular weights. Histological sections of *Prnp*<sup>+/+</sup> (G, H, I, J, K and L) and *Prnp*<sup>0/0</sup> (D, E and F) mice embryos (E17) brain were immunostained for PrP<sup>c</sup> and STI1. Panels (F, I and L) are merged images of immunostaining for STI1 (green) and PrP<sup>c</sup> (red). There is extensive co-localization (yellow) of the two proteins in the developing hippocampus.



**Figure 2: Co-localization of STI1 and PrP<sup>c</sup> in hippocampal neurons.** Dissociated hippocampal neurons from wild-type mice were immunostained for STI1 (green) and PrP<sup>c</sup> (red). Confocal images show co-localization in the perinuclear region (arrow) and neurites (arrowhead).

### STI1 promotes neurite outgrowth

Based on the co-localization of STI1 and PrP<sup>c</sup> in neurites of hippocampal cells, we investigated whether STI1 may promote neurite outgrowth mediated by PrP<sup>c</sup>. Primary hippocampal cultures from *Prnp*<sup>+/+</sup> or *Prnp*<sup>0/0</sup> mouse embryos (E17) were treated with increasing concentrations of recombinant wild-type STI1. Treatment led to a substantial increase in the proportion of wild-type cells with neurites, whereas *Prnp*<sup>0/0</sup> neurons did not extend neurites in response to STI1 (Fig. 3A).

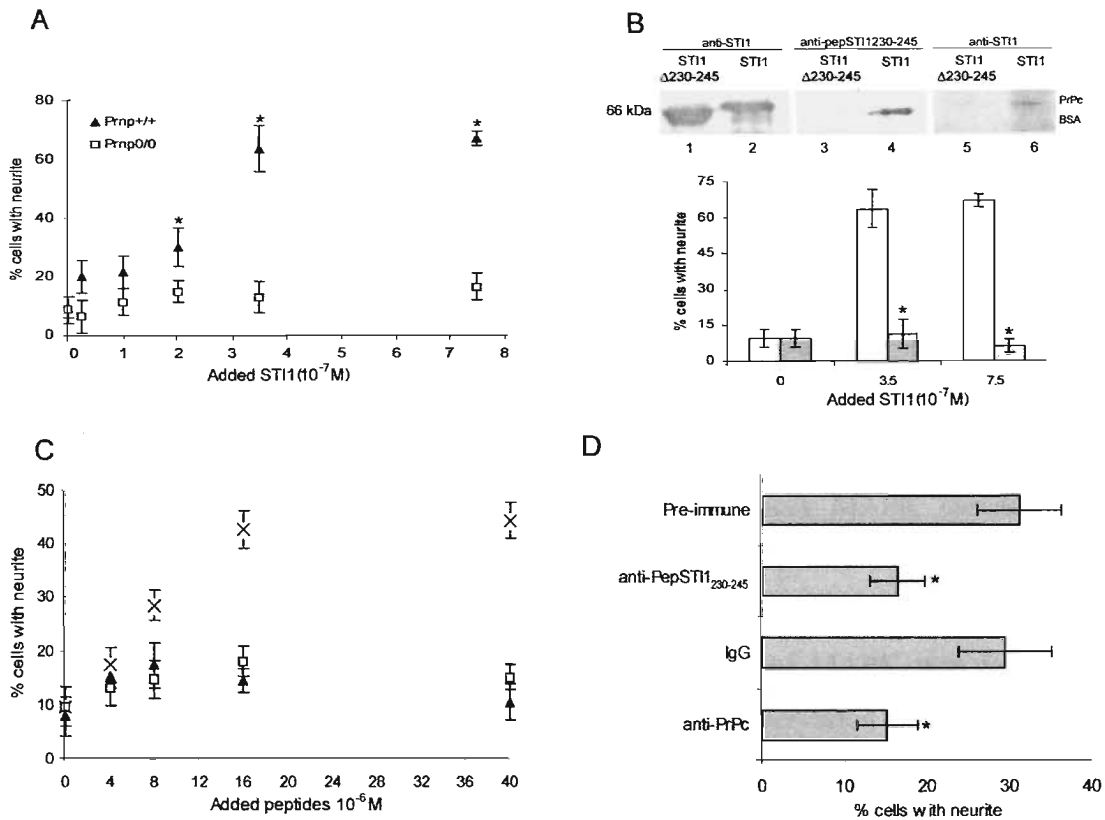
To characterize whether neuritogenesis promoted by STI1 depends on its specific interaction with PrP<sup>c</sup>, we constructed a STI1 deletion mutant lacking residues 230-245 (STI1Δ230-245), a domain previously characterized as containing the PrP<sup>c</sup> binding site (Zanata et al., 2002). Figure 3B shows that mutant STI1 (STI1Δ230-245) has the expected molecular weight and is recognized by the anti-STI1 antiserum (lane 1), but not with an antibody that recognizes the deleted residues (anti-pepSTI1<sub>230-245</sub>, lane 3), whereas wild-type STI1 is recognized by both antibodies (lanes 2 and 4). An overlay experiment was done to test the binding capacities of the wild-type and mutant STI1 to PrP<sup>c</sup>. PrP<sup>c</sup> and BSA were immobilized into a nitrocellulose membrane, incubated with wild-type STI1 (lane 6) or STI1Δ230-245 (lane 5) and immunoreacted with the anti-STI1 antibody. This experiment confirmed that mutant STI1Δ230-245 is unable to bind PrP<sup>c</sup> (lane 5). The graph in figure 3B shows that STI1Δ230-245 was unable to promote neurite

growth in wild-type neurons, thus demonstrating that the PrP<sup>c</sup>-binding domain of STI1 is necessary to induce the neuritogenic response.

We next assessed the ability of the STI1 peptide which corresponds to the PrP<sup>c</sup> binding site (pepSTI1<sub>230-245</sub>), to promote neurite outgrowth. *Prnp*<sup>+/+</sup> hippocampal neurons were treated with either pepSTI1<sub>230-245</sub> or with a control C-terminal peptide (pepSTI1<sub>422-437</sub>), and only STI1<sub>230-245</sub> elicited neurite outgrowth (Fig. 3C). *Prnp*<sup>0/0</sup> hippocampal neurons, did not respond to pepSTI1<sub>230-245</sub> (Fig. 3C).

We further tested the effect of blocking PrP<sup>c</sup>-STI1 interaction in wild-type cells. Hippocampal neurons treated with STI1 in the presence of either anti-PrP<sup>c</sup> or anti-STI1 antibodies showed a reduced neuritogenic response, when compared with cells treated with STI1 and non-immune serum or a control IgG (Fig. 3D).

Taken together the results demonstrated that specific STI1-PrP<sup>c</sup> interaction, driven by the PrP<sup>c</sup>-binding domain of STI1, induced neurite outgrowth.



**Figure 3: STI1 and its PrP<sup>c</sup>-binding domain induce PrP<sup>c</sup>-dependent neurite outgrowth.** *A*, Dissociated hippocampal neurons from wild-type (▲) or PrP<sup>c</sup> null mice (□) were grown on poly-L-lysine, and incubated with increasing concentration of STI1. Neurons were fixed, counterstained and the percentage of cells with neurites was quantified. *B*, Immunoblotting of wild-type STI1 (lanes 2 and 4) and STI1Δ230-245 (lanes 1 and 3) with anti-STI1 (lanes 1 and 2) and anti-pepSTI1<sub>230-245</sub> antibodies (lanes 3 and 4). Lanes 5 and 6 show the overlay assay, where bovine serum albumin (BSA-2□g) and PrP<sup>c</sup> (1□g) were adsorbed onto a membrane, which was incubated with STI1 and STI1Δ230-245 and immunoblotted with anti-STI1 antibody. The graph shows neurite outgrowth of primary hippocampal neurons from wild-type embryos treated with either STI1 (white bars) or STI1Δ230-245 (grey bars). *C*, The graph shows neurite outgrowth of wild-type neurons treated with increasing concentrations of synthetic peptides pepSTI1<sub>230-245</sub> (x) and pepSTI1<sub>422-437</sub> (□), or of PrP<sup>c</sup> null neurons treated with pepSTI1<sub>230-245</sub> (▲). *D*, wild-type hippocampal cells were incubated with STI1 (2x10<sup>-7</sup>M) followed by treatment with anti-PrP<sup>c</sup>, anti-pepSTI1<sub>230-245</sub>, pre-immune serum and IgG. Values represents the average of at least three experiments, vertical bars represent standard deviation. \*, denotes statistical significance p < 0.05 (Mann-Whitney test for unpaired samples).

## **MAP kinase activity is required for neurite outgrowth induced by STI1-PrP<sup>c</sup> interaction**

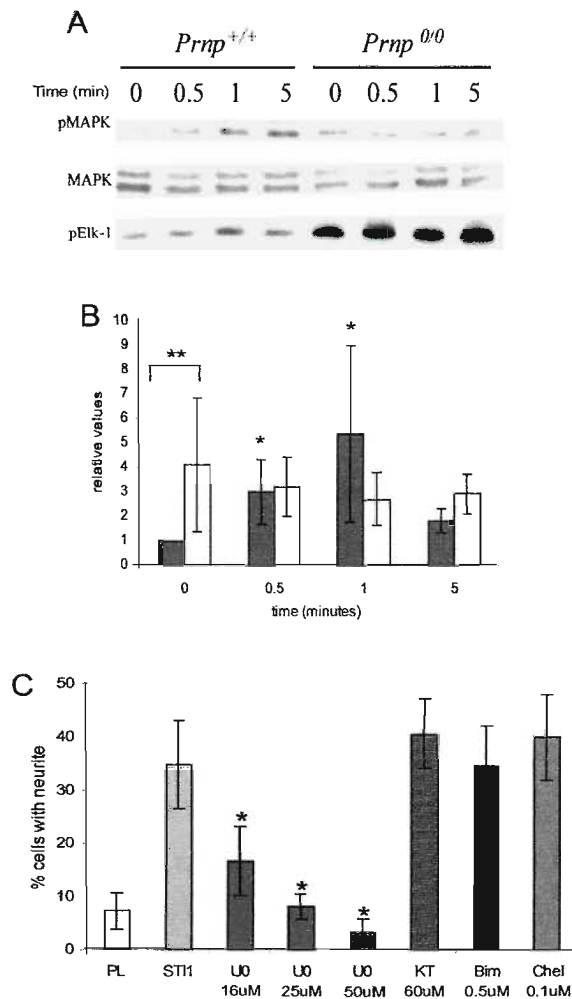
We previously showed that engagement of PrP<sup>c</sup> with a peptide mimicking the PrP<sup>c</sup> binding site of the STI1 molecule produces the activation of both cAMP/PKA and MAPK pathways (Chiarini et al, 2002; Zanata et al, 2002). However, the neuroprotection mediated by engagement of PrP<sup>c</sup> required activity of PKA rather than MAP kinase. Interestingly, MAPKs have been implicated in neurite outgrowth stimulated by cell adhesion molecules and neurotrophic factors (Doherty et al., 2000; Huang and Reichardt, 2001).

We investigated whether STI1-PrP<sup>c</sup> interaction induces MAPK cascades in hippocampal neurons. STI1 caused a rapid and sustained increase in both the phosphorylation and activity of ERK 1/2 in *Prnp*<sup>+/+</sup> cells, whereas no effect was observed in *Prnp*<sup>0/0</sup> neurons. A higher basal activity/phosphorylation of MAPK was found in *Prnp*<sup>0/0</sup> than in wild-type cells, confirming our previous observation in the newborn mouse retinae (Chiarini *et al.*, 2002), as well as the finding of other authors in adult brain and cerebellum (Brown et al., 2002).

To test whether ERK activation is required for the STI1-PrP<sup>c</sup> neuritogenic response, we cultured hippocampal neurons in the presence of U0126, a specific inhibitor of the MAPK kinases MEK-1 and MEK-2 which blocks ERK1/2 phosphorylation (Favata et al., 1998). STI1-PrP<sup>c</sup> induced neurite outgrowth was impaired by U0126 in a dose-dependent manner (figure 4B). Using cresyl violet staining, we estimated viability at 99% among cells treated with U0126 (data not shown). Conversely, neither KT5720 (KT), a cell-permeable, selective inhibitor of cAMP-dependent protein kinase (PKA), nor specific PKC inhibitors chelerythrin chloride (Chel) and bisindolylmaleimide (BIM) (Audesirk et al., 1997) had any effect upon neuritogenesis induced by STI1 (Fig. 4B).

These results showed that the neuritogenesis induced by PrP<sup>c</sup>-STI1 interactions depends on MAPK, and not on PKA or PKC.





**Figure 4: MAPK pathway is required for neurite outgrowth induced by STI1.**

*A*, Hippocampal neurons from wild-type (*Prnp*<sup>+/+</sup>-grey bars) and PrPc null (*Prnp*<sup>0/0</sup>-white bars) mice were grown on poly-L-lysine and treated with STI1 ( $4.9 \times 10^{-7} M$ ) for different incubation periods. Protein extracts were subject to SDS-PAGE followed by immunoblotting using anti-phospho MAPK antibodies. After stripping, the blots were reprobed with anti-MAPK. MAPK activity was measured by immunoprecipitation followed by incubation with Elk-1 substrate, SDS-PAGE and immunoblotting using anti-phospho-Elk-1. *B*, The bands obtained from immunoblotting against phospho-MAPK were analyzed by densitometric scanning. Values obtained in wild-type cells were taken as 1. The graph shows (*Prnp*<sup>+/+</sup>-grey bars) and PrPc null (*Prnp*<sup>0/0</sup>-white bars); *C*, *Prnp*<sup>+/+</sup> hippocampal neurons were plated on poly-L-lysine, pretreated for 1h with U0126 (16-50 $\mu M$ ), KT5720 (60nM), bisindolylmaleimide (Bim, 0.5 $\mu M$ ) or chelerythrine chloride (Chel, 0.1 $\mu M$ ), and incubated with STI1 ( $4.9 \times 10^{-7} M$ ). Cells were fixed, stained with hematoxylin and the percentage of cells with neurites was determined. Values represent the average and standard deviation of three independent experiments. Statistical significance: figure B, \*, control compared with treatments and \*\*, wild-type compared with PrPc null mice ( $p < 0.005$ ). Figure C \*, control compared with treatments  $p < 0.05$  (Mann-Whitney test for unpaired samples).

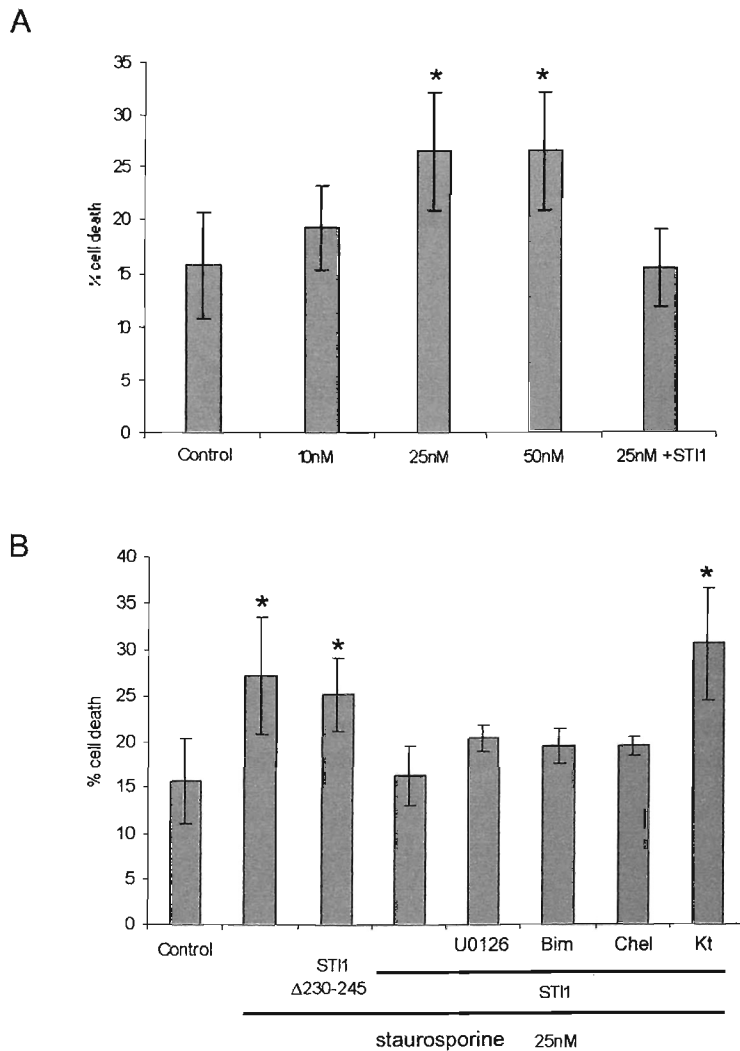
## **STI1 promotes neuroprotection in hippocampal neurons through cAMP-dependent protein kinase A**

We tested whether STI1 would induce neuroprotective responses in hippocampal neurons similar to retinal explants (Chiarini et al., 2002;Zanata et al., 2002). Primary hippocampal cultures from mouse embryos (E17) were treated with Staurosporine (*Streptomyces staurospores*), a non-selective protein kinase inhibitor (Ruegg and Burgess, 1989), that is often used as a general method to induce apoptosis (Nicotera et al, 1998).

Hippocampal neurons from *Prnp*<sup>+/+</sup> mice were responsive to cell death induced by staurosporine in a dose dependent-manner (figure 5A). Treatment with STI1 rescued *Prnp*<sup>+/+</sup> neurons depending on the PrP<sup>c</sup> binding site of STI1, because the mutated STI1 $\Delta$ 230-245 had no effect on cell survival (figure 5B).

We have previously found that STI1, pepSTI1<sub>230-245</sub> and other PrP<sup>c</sup>-engaging peptides prevents programmed cell death of undifferentiated post-mitotic retinal cells induced by anisomycin, through the cAMP-dependent protein kinase (PKA) (Chiarini et al., 2002;Zanata et al., 2002). In an attempt of clarify if the PKA pathway is also involved in STI1-induced neuroprotection of hippocampal neurons against programmed cell death, we tested the effects of specific signaling inhibitors. The neuroprotective effect of STI1 was abrogated by the PKA inhibitor (KT5720), whereas PKC (Bim or Chel) and MAPK (U0126) inhibitors had no effect (Fig. 5B). These results suggest the involvement of PKA pathway in neuroprotection induced by STI1 in hippocampal neurons, similar to our previously described results in retinal tissue (Chiarini et al., 2002).

Therefore, PKA activity is required for neuroprotection induced by the interaction of STI1 with PrP<sup>c</sup>, while neither MAPK nor PKC are necessary for the neuroprotective response.



**Figure 5: STI1 rescues hippocampal neurons from staurosporin-induced apoptosis through PKA signaling pathway.** A, hippocampal neurons from wild-type (*Prnp*<sup>+/+</sup>) and PrP<sup>c</sup> null (*Prnp*<sup>0/0</sup>) mice were plated on poly-L-lysine, pre-treated with STI1 (7 $\mu$ M) for 1 hour and incubated with increasing concentrations of staurosporine (10nM, 25nM and 50nM) for 16h. B, hippocampal neurons from wild-type mice were plated on poly-L-lysine, pretreated for 1h with either U0126 (50 $\mu$ M), KT5720 (60nM), Bim (0.5 $\mu$ M) or Chel (0.1 $\mu$ M), then either STI1 (7 $\mu$ M) or STI1 $\Delta$ 230-245 (7 $\mu$ M) was added, and after 1h cell death was induced by staurosporine (25nM) for an additional 16h. The cells were fixed, stained with propidium iodide and the percentage of pyknotic profiles indicating cell death was counted. Values represent the average and standard deviations of at least three experiments. \*, denotes statistical significance  $p < 0.02$  (Mann-Whitney test for unpaired samples).

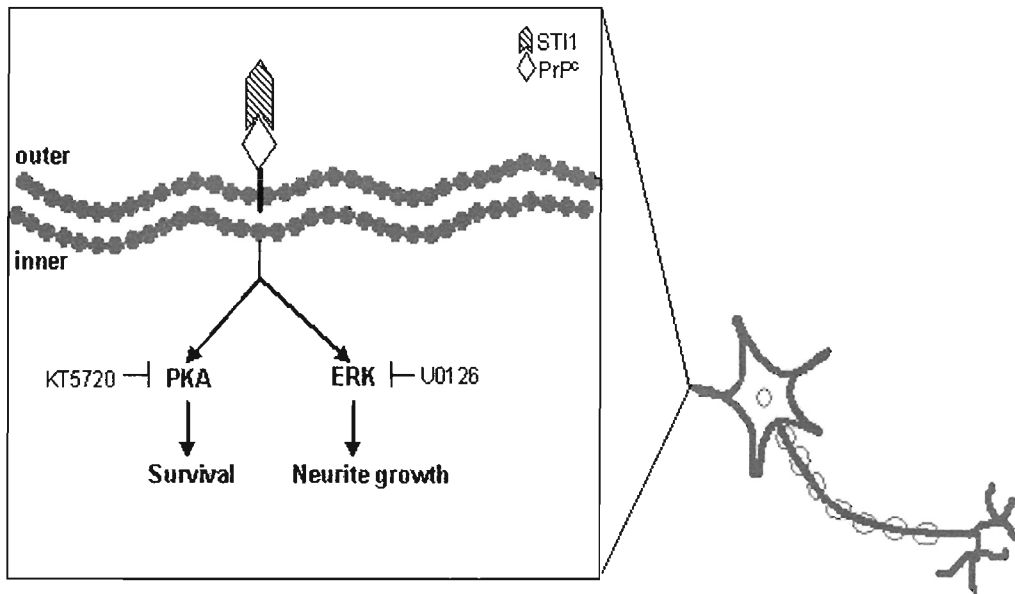


Figure 6- **Interaction of ST11 with PrP<sup>c</sup> induces both neuritogenesis and neuroprotection through distinct pathways.** The cAMP-PKA dependent pathway is implicated in neuroprotection, demonstrated in both retinal and hippocampal neurons (Chiarini et al., 2002;Zanata et al., 2002), whereas MAPK signaling is involved in neurite outgrowth.

## DISCUSSION

This investigation showed that: (a) The cellular prion protein (PrP<sup>c</sup>) and its binding partner stress-induced protein 1 (STI1) co-localize in hippocampal neurons; (b) Interaction of STI1 with PrP<sup>c</sup> mediated by their cognate binding domains induces both neurite outgrowth and neuroprotection of hippocampal neurons in culture; (c) Neurite outgrowth induced by STI1 is mediated by the Erk MAP kinase pathway, whereas neuroprotection induced by the same protein depends on a PKA pathway. These data add to the growing body of evidence that PrP<sup>c</sup> is involved in neurotrophic signaling within the central nervous system.

It is becoming increasingly clear that PrP<sup>c</sup> has a role in neuronal differentiation. Earlier studies from our group showed that PrP<sup>c</sup> is the main cellular receptor for the  $\gamma$ 1-laminin chain. This specific interaction between laminin and PrP<sup>c</sup> induced neuritogenesis in mouse hippocampal neurons (Graner *et al.*, 2000a).

We also showed the participation of PrP<sup>c</sup> in neurite adhesion and maintenance through its interaction with laminin (Graner *et al.*, 2000b). PrP<sup>c</sup> has been proposed to be a cell surface adhesion protein (Endo *et al.*, 1989), and its early developmental distribution resembles that of adhesion proteins (Sales *et al.*, 2002). Recent studies using a time controlled transcatheter perfusion cross-linking procedure showed that proteins involved in cell adhesion and neurite outgrowth can be found in the molecular microenvironment of PrP<sup>c</sup> in the living brain (Schmitt-Ulms *et al.*, 2004). Furthermore, the laminin receptor (LPR/LR), required for cell differentiation and growth, was identified as a cell-surface binding partner of PrP<sup>c</sup> (Hundt *et al.*, 2001;Gauczynski *et al.*, 2001). PrP<sup>c</sup> also interacts with glycosaminoglycans expressed on the cell surface (Shyng *et al.*, 1995;Pan *et al.*, 2002). This is particularly relevant to brain development, because both laminin and glycosaminoglycans are developmentally regulated and contribute to axon growth and the formation of fiber tracts (Dou and Levine, 1995;Fernaund-Espinosa *et al.*, 1996); reviewed in (Reichardt and Tomaselli, 1991). Further support of a role of PrP<sup>c</sup> in the formation of axon tracts comes from PrP<sup>c</sup> null mice, in which the hippocampal mossy fiber projection is disorganized (Colling *et al.*, 1997).

PrP<sup>c</sup> has been reported to activate a signaling pathway that involves the tyrosine

kinase p59fyn in a cell line capable of neuron-like differentiation (Mouillet-Richard et al., 2000). The p59fyn kinase has also been implicated in modulating axonal guidance of olfactory axons, which express high levels of PrP<sup>c</sup> throughout life and mediate N-CAMs-induced neurite outgrowth (Beggs et al., 1997;Morse et al., 1998;Sales et al., 1998;Kolkova et al., 2000; Schmitt-Ulms et al., 2001). In addition, the presence of abundant PrP<sup>c</sup> in elongating axons suggests a role for the protein in axon growth (Sales et al., 2002).

Various studies provided evidence that PrP<sup>c</sup> is implicated in neuroprotection. Hippocampal neurons derived from PrP<sup>c</sup> null mice undergo exacerbated cell death triggered by serum deprivation when compared with wild-type, thereby suggesting that PrP<sup>c</sup> can support an anti-apoptotic tonus (Kawahara et al., 1999). PrP<sup>c</sup> has also been reported to protect human primary neurons against Bax-induced cell death, either from its location at the cell surface through an unidentified signaling pathway, or from the cytosol (Bounhar et al., 2001;Roucou et al., 2003). It was recently reported that several signal transduction pathways involved in survival are activated in mouse primary cerebellar granule neurons grown in PrP molecule-coated tissue culture plates. In this preparation, homophilic PrP<sup>c</sup> interaction led to activation of PKA, Src-related tyrosine kinases, phosphatidylinositol-3-kinase/Akt, and MAPK/ERK kinases. Among downstream targets, increased Bcl-2 levels and decreased Bax levels were observed, consistent with PrP<sup>c</sup> triggering survival signals (Chen et al., 2003).

Differing somewhat from those reports, we have demonstrated that interaction of PrP<sup>c</sup> with its ligand STI1 protein activates a PKA-dependent signaling pathway to rescue retinal cells from induced apoptosis (Chiarini et al., 2002;Zanata et al., 2002).

The data described above is consistent with the hypothesis that PrP<sup>c</sup> participates in a multiprotein complex involved in neuronal differentiation and neuroprotection. On the basis of these findings we investigated whether the interaction of PrP<sup>c</sup> with STI1 modulates neural differentiation. The current experiments provided clear evidence that neurite outgrowth induced by STI1 depends on the expression of PrP<sup>c</sup> expression, and that MAPK family members, sensitive to U0126 are required for neurite outgrowth promoted by STI1.

In turn, neuroprotection induced by STI1-PrP<sup>c</sup> interaction in hippocampal

neurons, similar to our previous studies in retinal cells, is mediated by a PKA signaling pathway.

We propose a model in which PrP<sup>c</sup> interacts with STI1 and constitutively transduces both a survival or protective signal through PKA, and a neurite outgrowth/differentiation signal through the Erk MAP kinase pathway in neuronal cells (Fig. 6). The PrP<sup>c</sup>-STI1 complex may be formed by proteins either in the same or in distinct cells. In our previous study we speculate that STI1 could act as soluble neurotrophic factor (Chiarini et al., 2002) interacting with PrP<sup>c</sup>, and STI1 has indeed been found released by certain tumor cell lines (Eustace and Jay, 2004) and glial cells in culture (F. Lima et al, unpublished results).

The results presented here advance a new biological function for STI1, establish a significant role for PrP<sup>c</sup> as mediator of a response in the neurite outgrowth and neuroprotection promoted by STI1, and provide an insight into the molecular basis of STI1-dependent intracellular signaling. Finally, the understanding of neurite outgrowth and neuronal survival is relevant both for developmental neurobiology as well as for pathology, because compounds that promote neuronal protection and differentiation may lead to novel therapeutic procedures in neurodegenerative conditions such as prion diseases.

## REFERENCES

- Aguzzi,A. and Polymenidou,M. (2004). Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell*, **116**, 313-327.
- Audesirk,G., Cabell,L., and Kern,M. (1997). Modulation of neurite branching by protein phosphorylation in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **102**, 247-260.
- Ausubel,F.M., Brent,R., Kingston,R.E., Moore,D.D., Seidman,J.D., Smith,J.A., and Struhl K. (1993). *Current Protocols in Molecular Biology*, . Wiley Interscience, New York, pp. 3.17.1.
- Beggs,H.E., Baragona,S.C., Hemperly,J.J., and Maness,P.F. (1997). NCAM140 interacts with the focal adhesion kinase p125(fak) and the SRC-related tyrosine kinase p59(fyn). *J. Biol. Chem.*, **272**, 8310-8319.
- Bounhar,Y., Zhang,Y., Goodyer,C.G., and LeBlanc,A. (2001). Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **276**, 39145-39149.
- Brown,D.R., Nicholas,R.S., and Canevari,L. (2002). Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. *J. Neurosci. Res.*, **67**, 211-224.
- Bueler,H., Fischer,M., Lang,Y., Bluethmann,H., Lipp,H.P., DeArmond,S.J., Prusiner,S.B., Aguet,M., and Weissmann,C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell- surface PrP protein. *Nature*, **356**, 577-582.
- Carrigan,P.E., Nelson,G.M., Roberts,P.J., Stoffer,J., Riggs,D.L., and Smith,D.F. (2004). Multiple domains of the co-chaperone Hop are important for Hsp70 binding. *J. Biol. Chem.*, **279**, 16185-16193.
- Chen,S., Mange,A., Dong,L., Lehmann,S., and Schachner,M. (2003). Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. *Mol. Cell Neurosci.*, **22**, 227-233.
- Chiarini,L.B., Freitas,A.R., Zanata,S.M., Brentani,R.R., Martins,V.R., and Linden,R. (2002). Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J.*, **21**, 3317-3326.
- Colling,S.B., Khana,M., Collinge,J., and Jefferys,J.G. (1997). Mossy fibre reorganization in the hippocampus of prion protein null mice. *Brain Res.*, **755**, 28-35.
- de Almeida, C.J.G.; Chiarini. L.B.; Silva, J.P.; Silva, P.M.R.; Martins, M.A.; **Linden, R.** The cellular prion protein modulates phagocytosis and inflammatory response. *J. Leukocyte Biol.*, 2004, in press



Doherty,P., Williams,G., and Williams,E.J. (2000). CAMs and axonal growth: a critical evaluation of the role of calcium and the MAPK cascade. *Mol. Cell Neurosci.*, **16**, 283-295.

Dou,C.L. and Levine,J.M. (1995). Differential effects of glycosaminoglycans on neurite growth on laminin and L1 substrates. *J. Neurosci.*, **15**, 8053-8066.

Endo,T., Groth,D., Prusiner,S.B., and Kobata,A. (1989). Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry*, **28**, 8380-8388.

Eustace BK, Jay DG. Extracellular Roles for the Molecular Chaperone, hsp90. *Cell Cycle*. 2004 Sep 14;3(9) [Epub ahead of print

Favata,M.F., Horiuchi,K.Y., Manos,E.J., Daulerio,A.J., Stradley,D.A., Feeser,W.S., Van Dyk,D.E., Pitts,W.J., Earl,R.A., Hobbs,F., Copeland,R.A., Magolda,R.L., Scherle,P.A., and Trzaskos,J.M. (1998). Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.*, **273**, 18623-18632.

Fernaund-Espinosa,I., Nieto-Sampedro,M., and Bovolenta,P. (1996). Developmental distribution of glycosaminoglycans in embryonic rat brain: relationship to axonal tract formation. *J. Neurobiol.*, **30**, 410-424.

Gauczynski,S., Peyrin,J.M., Haik,S., Leucht,C., Hundt,C., Rieger,R., Krasemann,S., Deslys,J.P., Dormont,D., Lasmezas,C.I., and Weiss,S. (2001). The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *EMBO J.*, **20**, 5863-5875.

Graner,E., Mercadante,A.F., Zanata,S.M., Forlenza,O.V., Cabral,A.L., Veiga,S.S., Juliano,M.A., Roesler,R., Walz,R., Minetti,A., Izquierdo,I., Martins,V.R., and Brentani,R.R. (2000a). Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **76**, 85-92.

Graner,E., Mercadante,A.F., Zanata,S.M., Martins,V.R., Jay,D.G., and Brentani,R.R. (2000b). Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. *FEBS Lett.*, **482**, 257-260.

Hernandez,M.P., Sullivan,W.P., and Toft,D.O. (2002). The assembly and intermolecular properties of the hsp70-Hop-hsp90 molecular chaperone complex. *J. Biol. Chem.*, **277**, 38294-38304.

Huang,E.J. and Reichardt,L.F. (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.*, **24**, 677-736.

Hundt,C., Peyrin,J.M., Haik,S., Gauczynski,S., Leucht,C., Rieger,R., Riley,M.L., Deslys,J.P., Dormont,D., Lasmezas,C.I., and Weiss,S. (2001). Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor. *EMBO J.*, **20**, 5876-5886.

- Kolkova,K., Novitskaya,V., Pedersen,N., Berezin,V., and Bock,E. (2000). Neural cell adhesion molecule-stimulated neurite outgrowth depends on activation of protein kinase C and the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Neurosci.*, **20**, 2238-2246.
- Kuwahara,C., Takeuchi,A.M., Nishimura,T., Haraguchi,K., Kubosaki,A., Matsumoto,Y., Saeki,K., Matsumoto,Y., Yokoyama,T., Itohara,S., and Onodera,T. (1999). Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature*, **400**, 225-226.
- Martins,A.R., Dias,M.M., Vasconcelos,T.M., Caldo,H., Costa,M.C., Chimelli,L., and Larson,R.E. (1999). Microwave-stimulated recovery of myosin-V immunoreactivity from formalin-fixed, paraffin-embedded human CNS. *J. Neurosci. Methods*, **92**, 25-29.
- Martins,V.R., Graner,E., Garcia-Abreu,J., de Souza,S.J., Mercadante,A.F., Veiga,S.S., Zanata,S.M., Neto,V.M., and Brentani,R.R. (1997). Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. *Nat. Med.*, **3**, 1376-1382.
- Martins,V.R., Linden,R., Prado,M.A., Walz,R., Sakamoto,A.C., Izquierdo,I., and Brentani,R.R. (2002). Cellular prion protein: on the road for functions. *FEBS Lett.*, **512**, 25-28.
- Morse,W.R., Whitesides,J.G., III, LaMantia,A.S., and Maness,P.F. (1998). p59fyn and pp60c-src modulate axonal guidance in the developing mouse olfactory pathway. *J. Neurobiol.*, **36**, 53-63.
- Mouillet-Richard,S., Ermonval,M., Chebassier,C., Laplanche,J.L., Lehmann,S., Launay,J.M., and Kellermann,O. (2000). Signal transduction through prion protein. *Science*, **289**, 1925-1928.
- Nicolet,C.M. and Craig,E.A. (1989). Isolation and characterization of STI1, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, **9**, 3638-3646.
- Nicotera P, Leist M, Ferrando-May E. Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett.* 1998 Dec 28;102-103:139-42.
- Paitel,E., Sunyach,C., Alves,D.C., Bourdon,J.C., Vincent,B., and Checler,F. (2004). Primary cultured neurons devoid of cellular prion display lower responsiveness to staurosporine through the control of p53 at both transcriptional and post-transcriptional levels. *J. Biol. Chem.*, **279**, 612-618.
- Pan,T., Wong,B.S., Liu,T., Li,R., Petersen,R.B., and Sy,M.S. (2002). Cell-surface prion protein interacts with glycosaminoglycans. *Biochem. J.*, **368**, 81-90.
- Reichardt,L.F. and Tomaselli,K.J. (1991). Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. *Annu. Rev. Neurosci.*, **14**, 531-570.
- Rieger,R., Edenhofer,F., Lasmezas,C.I., and Weiss,S. (1997). The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat. Med.*, **3**, 1383-1388.

Roucou,X., Guo,Q., Zhang,Y., Goodyer,C.G., and LeBlanc,A.C. (2003). Cytosolic prion protein is not toxic and protects against Bax-mediated cell death in human primary neurons. *J. Biol. Chem.*, **278**, 40877-40881.

Ruegg,U.T. and Burgess,G.M. (1989). Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol. Sci.*, **10**, 218-220.

Sales,N., Hassig,R., Rodolfo,K., Di Giamberardino,L., Traiffort,E., Ruat,M., Fretier,P., and Moya,K.L. (2002). Developmental expression of the cellular prion protein in elongating axons. *Eur. J. Neurosci.*, **15**, 1163-1177.

Sales,N., Rodolfo,K., Hassig,R., Faucheux,B., Di Giamberardino,L., and Moya,K.L. (1998). Cellular prion protein localization in rodent and primate brain. *Eur. J. Neurosci.*, **10**, 2464-2471.

Schmitt-Ulms,G., Hansen,K., Liu,J., Cowdrey,C., Yang,J., DeArmond,S.J., Cohen,F.E., Prusiner,S.B., and Baldwin,M.A. (2004). Time-controlled transcardiac perfusion cross-linking for the study of protein interactions in complex tissues. *Nat. Biotechnol.*, **22**, 724-731.

Schmitt-Ulms,G., Legname,G., Baldwin,M.A., Ball,H.L., Bradon,N., Bosque,P.J., Crossin,K.L., Edelman,G.M., DeArmond,S.J., Cohen,F.E., and Prusiner,S.B. (2001). Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. *J. Mol. Biol.*, **314**, 1209-1225.

Shyng,S.L., Lehmann,S., Moulder,K.L., and Harris,D.A. (1995). Sulfated glycans stimulate endocytosis of the cellular isoform of the prion protein, PrPC, in cultured cells. *J. Biol. Chem.*, **270**, 30221-30229.

van der,S.J., Kana,B.D., Dirr,H.W., and Blatch,G.L. (2000). Heat shock cognate protein 70 chaperone-binding site in the co-chaperone murine stress-inducible protein 1 maps to within three consecutive tetratricopeptide repeat motifs. *Biochem. J.*, **345 Pt 3**, 645-651.

Watarai M, Kim S, Erdenebaatar J, Makino S, Horiuchi M, Shirahata T, Sakaguchi S, Katamine S. Cellular prion protein promotes Brucella infection into macrophages. *J Exp Med.* 2003 Jul 7;198(1):5-17.

Zanata,S.M., Lopes,M.H., Mercadante,A.F., Hajj,G.N., Chiarini,L.B., Nomizo,R., Freitas,A.R., Cabral,A.L., Lee,K.S., Juliano,M.A., de Oliveira,E., Jachieri,S.G., Burlingame,A., Huang,L., Linden,R., Brentani,R.R., and Martins,V.R. (2002). Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J.*, **21**, 3307-3316.

### III.5

## O Papel da Interação PrPc-Ln no Mecanismo de Formação da Memória

Na última parte deste capítulo, apresentamos um manuscrito intitulado “Cellular prion interaction with laminin mediates memory consolidation by PKA and MAPK”. Este trabalho foi realizado pela Dra. Adriana Coitinho e contou com minha colaboração na realização dos ensaios bioquímicos de ligação entre PrPc e o peptídeo  $\gamma 1$ , competição com peptídeos e anticorpos. Neste trabalho determinou-se a importância da ligação entre PrPc e laminina nos processos de formação da memória.

## CELLULAR PRION INTERACTION WITH LAMININ MEDIATES MEMORY CONSOLIDATION BY PKA AND MAPK

Adriana S. Coitinho <sup>1,7</sup>, Adriana R. O. Freitas <sup>2,7</sup>, Marilene H. Lopes <sup>4,7</sup>, Glaucia N. M. Hajj <sup>2,3,7</sup>, Rafael Roesler <sup>5</sup>, Roger Walz <sup>6</sup>, Janine I. Rossato <sup>1</sup>, Liane Rotta <sup>1</sup>, Kil S. Lee <sup>2</sup>, Rosa M. R. P. S. Castro <sup>4</sup>, Martin Cammarota <sup>1</sup>, Ivan Izquierdo <sup>1</sup>, Vilma R. Martins <sup>2,4</sup>, & Ricardo R. Brentani <sup>2,4</sup>

- 1- Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.
- 2- Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo Branch.
- 3- Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.
- 4- Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer.
- 5- Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.
- 6- Centro de Cirurgia de Epilepsia do Estado de Santa Catarina, Hospital Governador Celso Ramos, Florianópolis, SC, Brazil.
- 7- These authors contributed equally to this work

Acknowledgments: this work was supported by grants from FAPESP (99/07124-8), CNPq and PRONEX, AROF, MHL, GNMH are supported by FAPESP and RMRPC by CAPES fellowships. 8H4 and 8B4 antibodies and PrPc expression vector were kindly provided by Dr. Man-Sun Sy (Case Western Reserve University) and Dr. Ralph Zahn (Institut für Molekularbiologie und Biophysik, Eidgenössische Technische Hochschule, Switzerland) respectively. We thank Dr. Rafael Linden for critical reading of this manuscript.

## ABSTRACT

Cellular prion protein (PrPc), known to have a pivotal participation in prion diseases, is a specific receptor for a laminin (LN)  $\gamma$ -1 chain peptide leading to neural plasticity. Given the abundance of PrPc and LN in the hippocampus we decided to investigate whether these proteins interaction might play a role in memory consolidation. Here we blocked the PrPc-laminin interaction, in wild-type rats, by intra-hippocampal infusion of specific antibodies or peptides and evaluated memory consolidation using an aversively motivated learning test. PrPc peptide 173-182, which contains the LN binding site, or antibodies against interacting domains in both molecules inhibited short and long-term memory consolidation. These reagents also block cAMP-dependent Protein Kinase A and Mitogen-activated Protein Kinase activation which are classical signaling pathways activated during memory retention. The inhibitory effects of anti-PrPc antibodies and PrPc peptide 173-182 in memory consolidation and signaling are reverted by the LN  $\gamma$ -1 peptide, corroborating the evidences that they impair memory through interference in the PrPc-laminin interaction. Thus, our results show that by its interaction with laminin, PrPc has a critical physiological function in cognition and point to a re-evaluation of therapeutic interventions for prion diseases focused on PrPc inactivation.

## INTRODUCTION

In the central nervous system, laminin (LN) has been shown to mediate neural differentiation through its interaction with integrins (Luckenbill-Edds, 1997). It is also known that integrins are involved in neuronal plasticity processes such as those required for long-term potentiation (LTP) in the hippocampus (Lynch, 1998). Given the inhibitory effect of anti-integrin antibodies and RGD peptide in LTP (Lynch, 1998) and the demonstration that *volado* a *Drosophila* memory mutant encodes a new alpha-integrin (Grotewiel et al., 1998), it is possible to speculate that the interaction of extracellular matrix components with specific cellular receptors plays a role in learning and memory.

LNs are heterotrimeric molecules composed by combinations of  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  chains (Colognato and Yurchenco, 2000). LN-10 ( $\alpha 5\beta 1\gamma 1$ ) is the most abundant isoform expressed in hippocampus (Indyk et al., 2003), where the  $\gamma 1$  chain has a critical role in axonal regeneration (Grimpe et al., 2002). We have shown that the cellular prion protein (PrPc) is a specific, high affinity, saturable receptor for a decapeptide (RNIAEIIKDI) at the C-terminus of the LN  $\gamma 1$  chain (Graner et al., 2000). Thus, neurite extension by primary hippocampal neuron cultures in the presence of this peptide was completely inhibited by anti-PrPc antibodies. Furthermore, no neuritogenesis was elicited by LN  $\gamma 1$  chain peptide in neurons obtained from mice in which the gene coding for PrPc (*Prnp*) was ablated, indicating that PrPc-LN association is involved in neural plasticity (Graner et al., 2000).

We therefore decided to investigate whether the interaction between PrPc and LN could participate in memory consolidation. It is well known that *Prnp* null mice (*Zrch1*) have normal development and behavior (Bueler et al., 1992), despite a slight impairment in synaptic function (Collinge et al., 1994) which was not confirmed by another group (Lledo et al., 1996) and higher sensitivity to kainate-induced seizures (Walz et al., 2002). Conversely, another *Prnp* ablated mice strain showed impairment in memory formation (Nishida et al., 1997), but this and other phenotypes observed in the latter group of animals were associated to higher levels of the Doppel protein, rather than absence of PrPc (Moore et al., 1999). In fact, the use of any constitutively knockout animal,



particularly in behavioral tests, has been criticized since the gene deletion approach, genetic background and compensatory mechanisms may influence the results (Bueler et al., 1992; Banbury Conference., 1997). Nonetheless, we have recently showed (Coitinho et al., 2003) that *Prnp* null animals (*Zrch1*) (Bueler et al., 1992) presented an age-dependent impairment in memory consolidation detectable only in 9 month-old animals. These results were replicated in rats of the same age by blocking PrPc by intra-hippocampal infusion of a specific antibody (Coitinho et al., 2003). Interestingly, a PrPc polymorphism at codon 129 has been associated to early cognitive decline in humans (Croes et al., 2003).

Memory has been classically divided into at least two temporally and mechanistically distinct forms (McGaugh, 1966; Davis and Squire, 1984; Izquierdo and Medina, 1997; Izquierdo et al., 1998): short and long-term memory (STM, LTM). The latter requires gene transcription and translation (Davis and Squire, 1984; Izquierdo et al., 1998) mediated, at least in part, by phosphorylation of the cAMP response element binding protein (CREB) by protein kinase A (PKA) and/or Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) (Huang et al., 1994; Bernabeu et al., 1997; Cammarota et al., 2000; McGaugh and Izquierdo, 2000; Taubenfeld et al., 2001). Both signaling pathways are also involved in short-term memory (Vianna et al., 2000; Walz et al., 2000).

Herein, the relevance of the PrPc-LN interaction in memory formation was evaluated in normal rats by blocking the proteins in locus and measuring STM and LTM for an aversively motivated learning task.

## MATERIALS AND METHODS

### *Step-down inhibitory avoidance task*

We used both non-implanted and surgically implanted male Wistar rats (2-3 months old; body weight, 180-210 g). The surgical procedure and the one-trial step-down inhibitory avoidance task was carried out as previously described (Bernabeu et al., 1997; Izquierdo et al., 1998). Briefly, 30-gauge guides were bilaterally implanted at 1 mm above the dorsal CA1 region of the rat hippocampus under deep thionembutal anesthesia. After recovery, the animals were placed in a platform faced to a grid of stainless steel bars and the time taken by the rats to step down onto the grid with all four paws was measured. Once in the grid, rats received an electric shock immediately followed by a bilateral infusion of saline, rabbit anti-PrPc IgG (Chiarini et al., 2002), rabbit anti-laminin IgG (Giordano et al., 1994), rabbit anti-laminin  $\gamma$ -1 chain derived peptide (RNIAEIIKDI) IgG (Bethyl Inc, TX, USA) monoclonal antibodies against PrPc, 8H4 or 8B4 (Cui et al., 2003), rabbit or mouse non-immune IgG, PrPc peptides (Zanata et al., 2002), laminin  $\gamma$ -1 chain derived peptide (RNIAEIIKDI) or laminin  $\gamma$ 1 scrambled peptide (IRANIEIKID) (Neosystem, Strasbourg, France) in a total volume of 0.5  $\mu$ l/side. After 90 min. (STM) and 24 hours (LTM) animals were placed again in the platform as above and tested to see whether they retained the memory of the electric shock.

The first group of rats (n = 290 rats) was tested for memory retention 90 min. (STM) or 24 h later (LTM), as described elsewhere (Bernabeu et al., 1997; Izquierdo et al., 1998). The second group (n = 90) was infused or not with the described reagents and sacrificed 10 min. or 2 h after training and used for the enzymatic assays. The last group (n=10) consisted of naive animals that were used as control for the enzymatic assays. The ICBS Ethics Committee approved this work.

### *Expression and purification of recombinant PrPc*

The expression vector containing the cDNA fragment encoding amino acids 23-231 of the mouse PrPc protein was cloned in the BamH1-EcoR1 restriction sites of pRSET (Invitrogen). His6-PrPc expression and purification were performed as previously described (Zanata et al., 2002).

### *PrPc-LN $\gamma$ 1 peptide binding and competition assays*

His6-PrPc (4 $\mu$ g) was immobilized in Polystyrene wells (Immulon 2) and non-specific sites blocked with 1% BSA (Bovine Serum Albumin) for 2h at room temperature. Increasing concentrations of <sup>125</sup>I-LN  $\gamma$ 1 chain peptide (RNIAEIIKDI) linked to BSA (labeled as described (Chiarini et al., 2002)) with specific activity of 7x10<sup>5</sup>cpm/ $\mu$ g were added to the wells and incubated for 16 h at 4°C. After extensive washing, incorporated radioactivity was measured and originated the total binding curve. In parallel His<sub>6</sub>-PrPc (4 $\mu$ g) was incubated with <sup>125</sup>I – LN  $\gamma$ 1 chain peptide-BSA plus 5-fold excess unlabeled LN  $\gamma$ 1 chain peptide-BSA, generating non-specific binding. Specific binding was obtained by subtraction of non-specific from total values.

Competition assays were performed using PrPc synthetic peptides and antibodies. Synthetic mouse PrPc peptides (Zanata et al., 2002) (Neosystem, Strasbourg, France), 3.8 x 10<sup>-5</sup> M, anti PrPc IgG or non-immune serum IgG were pre-incubated with 1.2x10<sup>-6</sup> M <sup>125</sup>I- LN  $\gamma$ 1 chain peptide-BSA for 3h at room temperature. Then, the reagents were added to the wells containing 4 $\mu$ g adsorbed His6-PrPc and incubated for 16h at 4°C. After extensive washing, incorporated radioactivity was determined using a gamma counter. The PrPc <sup>125</sup>I- LN  $\gamma$ 1 chain peptide total binding was considered 100% and those obtained in the presence of peptides or antibodies (IgGs) were relative to it.

### *Sample preparation and kinase assays*

After sacrifice, hippocampi were dissected and nuclear extracts prepared as previously described (Cammarota et al., 2000). PKA activity of each sample was determined using an assay system (Invitrogen, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Nuclear extracts from each sample was also used to immunoprecipitate the active MAPK using an immobilized phospho-p44/42 MAP kinase monoclonal antibody (Cell Signaling non-radioactive kit, MA, USA). MAPK activity was evaluated by incubation with Elk-1 substrate, followed by electrophoresis and immunoblotting with anti-phospho Elk-1 antibody (1:1,000, Cell Signaling). Densitometric analyses were performed using a MCID Image Analysis System (5.02 v, Image Research). Enzymes activities of each treatment were expressed as relative levels compared to the value obtained for the treatment with non-immune IgG (considered equal 1).

### *Cresyl violet staining*

Rat brains were processed after 48 hours of reagents infusion and stained as previously described (Chen et al., 2003).

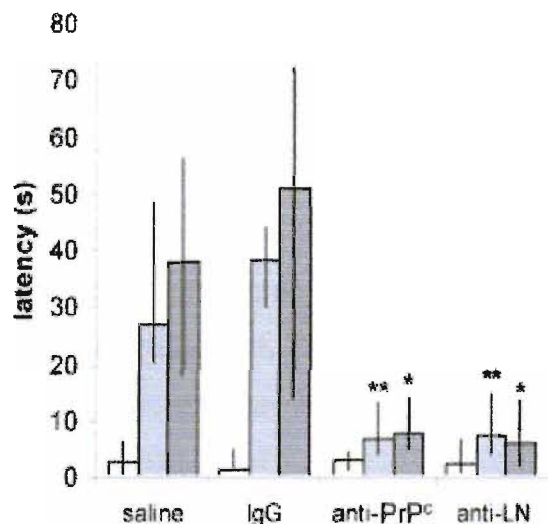
### *Statistical analyses*

Data for inhibitory avoidance are shown as median (interquartile ranges) of latencies to step-down and comparisons between groups were done by two-tailed Mann-Whitney U-test, (n=9 to 10 animals for each treatment). Biochemical results were represented as mean  $\pm$  Standard Deviation (SD), (n=7 to 8 animals for each treatment were used in enzymatic assays and at least 3 independent experiments were conducted for binding assays). Analyses were performed by single mean Student's t test and the comparisons with  $p < 0.05$  were considered statistically different.

## RESULTS

### *PrPc and laminin are involved in STM and LTM consolidation*

The relevance of the PrPc-LN interaction in memory formation was evaluated in normal rats by blocking the proteins in locus and measuring STM and LTM for an aversively motivated learning task (Izquierdo et al., 1998). Antibodies against recombinant PrPc or anti-LN 1 impaired retention of inhibitory avoidance for STM and LTM (Fig. 1) while rabbit non-immune IgG did not affect memory retention. Thus, suggesting that both PrPc and LN, in the dorsal hippocampus, are involved in STM and LTM consolidation.



**Figure 1: Anti PrP<sup>c</sup> and anti LN antibodies impair STM and LTM consolidation.**

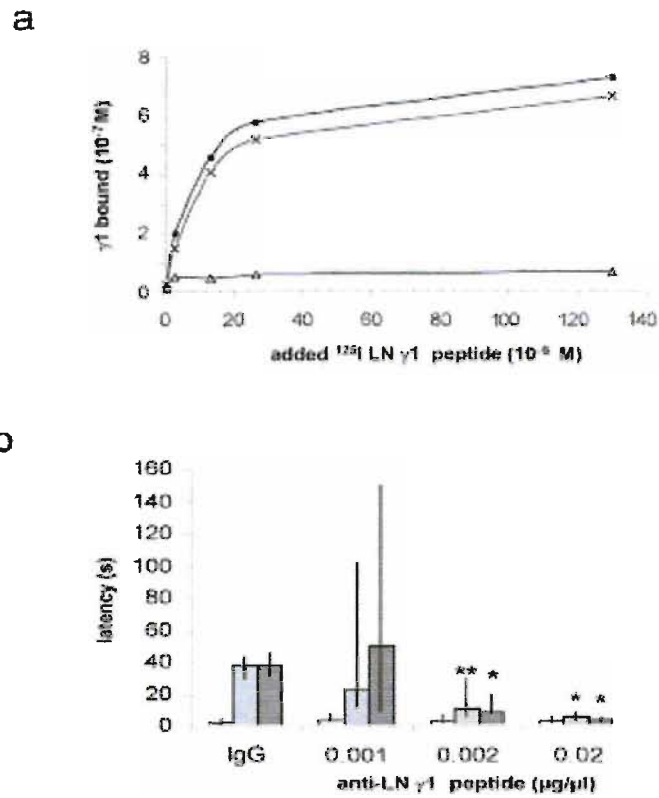
Surgically implanted male Wistar rats were submitted to step down inhibitory avoidance test previously described (Bernabeu et al., 1997; Izquierdo et al., 1998). Immediately after training animals received a bilateral infusion of anti-PrP<sup>c</sup> IgG (1.8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), anti-LN IgG (0.18  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) or purified rabbit non-immune IgG (1.8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) into CA1 area of the hippocampus and memory retention was measured at 0 min (STM) and 24h (LTM) after training. Data are shown as median (interquartile ranges) of latencies to step-down and comparisons between groups were done by two-tailed Mann-Whitney U-test, (n=9 to 10 animals for each treatment). \*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.05$ .

### *LN and PrPc interacting domains mediate memory consolidation*

PrPc is a high affinity cellular ligand for LN and using competition assays we also showed that PrPc binding site resides at the decapeptide RNIAEIIKDI localized at the C-terminus of the LN  $\gamma$ 1 chain (Graner et al., 2000). Indeed, binding experiments using  $^{125}\text{I}$  labeled LN  $\gamma$ 1 chain peptide demonstrated its specific interaction with PrPc (Fig. 2a). An antibody against this peptide was raised in rabbits and immunoblotting and immunohistochemistry approaches showed its specificity for LN  $\gamma$ 1 chain from purified LN-1 and mouse hippocampus (data not shown). Interestingly, this antibody was able to block both STM and LTM in a dose dependent manner when bilaterally infused in hippocampus (Fig. 2b). Note that the infusion of 0.002mg/ $\mu\text{l}$  of the anti LN  $\gamma$ 1 chain peptide IgG completely impaired memory retention while non-immune rabbit IgG at a concentration 100 times higher had no effect. Therefore, the LN domain which is the binding site for PrPc molecule is related to STM and LTM.

We performed competition assays using a series of 20 mer peptides covering the entire PrPc molecule in order to map the LN  $\gamma$ 1 chain peptide binding site in PrPc (Fig. 3a). Two peptides corresponding to amino acids 163 to 182 or 173 to 192 inhibited  $^{125}\text{I}$  LN  $\gamma$ 1 chain peptide interaction with recombinant PrPc and since they presented overlapping sequences we conclude that the domain shared between them, 173 to 182, corresponds to the LN binding site at PrPc.

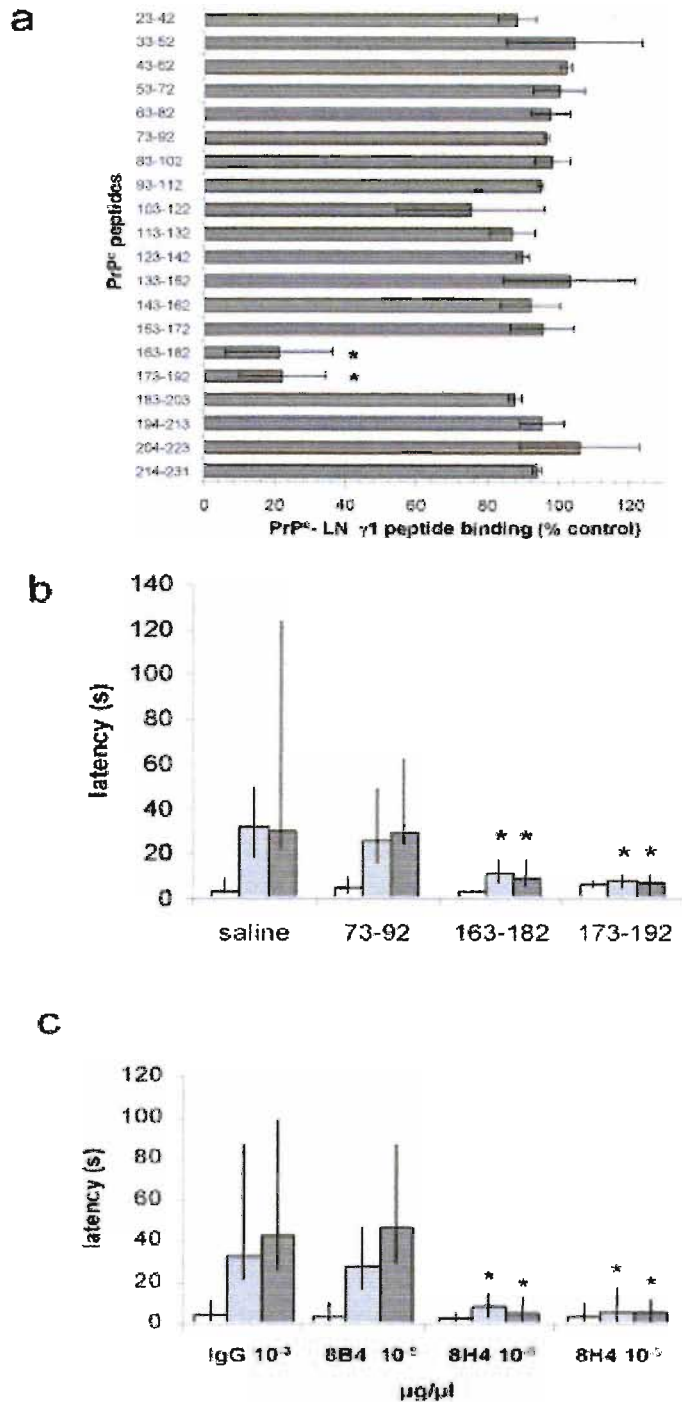
The importance of PrPc domain 173-182 in memory consolidation was initially addressed by intra-hippocampal infusion of PrPc peptides 163 to 182 and 173 to 192 which resulted in STM and LTM impairment (Fig. 3b). This result suggests that, through their interaction with the peptide RNIAEIIKDI at LN  $\gamma$ 1 chain in the hippocampus, these PrPc peptides block PrPc-LN binding and memory consolidation. This argument is strengthened by data showing that a non competitive peptide (PrPc 73 to 92) for the PrPc-LN  $\gamma$ 1 interaction (Fig. 3a) was innocuous for memory retention (Fig. 3b).



**Figure 2: LN domain that interacts with PrP $^c$  is involved in STM and LTM consolidation.**

a) LN  $\gamma 1$  chain peptide (RNIAEIIKDI) binds PrP $^c$  in a specific high affinity manner.  $^{125}\text{I}$ - LN  $\gamma 1$  chain peptide was incubated with adsorbed His $_6$ -PrP $^c$  in the absence (total) or presence of unlabeled LN  $\gamma 1$  chain peptide (non-specific). Non-specific ( $\Delta$ - $\Delta$ ) was subtracted from the total binding ( $\blacksquare$ - $\blacksquare$ ) to yield His $_6$ -PrP $^c$  specific binding to  $^{125}\text{I}$  - LN  $\gamma 1$  chain peptide ( $\times$ - $\times$ ).

b) Antibodies against LN  $\gamma 1$  chain peptide inhibited memory retention. Experiments were performed as described in Fig.1. Animals received a bilateral infusion of IgG anti-LN  $\gamma 1$  chain peptide or non-immune IgG (0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) into CA1 area of the hippocampus. Memory retention was measured at 0  $\square$ , 90 min. (STM)  $\square$  and 24h (LTM) after training  $\blacksquare$ . \*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.05$ .



**Figure 3: PrP<sup>c</sup> domain that interacts with LN is related to STM and LTM consolidation.**

a) Mapping LN binding site domain using competition assay with PrP<sup>c</sup> peptides. Peptides ( $3.8 \times 10^{-5}$  M) covering the mouse PrP<sup>c</sup> (23-231) sequence were pre-incubated with  $1.2 \times 10^{-6}$  M  $^{125}$ I-LN  $\gamma$ 1 chain peptide followed by incubation in His<sub>6</sub>-PrP<sup>c</sup> adsorbed wells. After extensive washing, radioactivity was measured. Total His<sub>6</sub>-PrP<sup>c</sup> and  $^{125}$ I- LN  $\gamma$ 1 peptide binding was set as 100% and the results expressed as the relative percentage of binding produced by competition with each peptide. Results represent mean  $\pm$  Standard Deviation of at least 3 independent experiments and statistical analysis were performed by single mean Student's t test. \* $p < 0.01$ .



b) PrP<sup>c</sup> peptides representing the LN binding site inhibited memory retention. Experiments were performed as in Fig.1. Animals received intra-hippocampal infusion of PrP<sup>c</sup> peptides 73-92, 163-182 or 173-192 (0.2 µg/µl). Memory retention of was measured at 0 □, 90 min. (STM) ■ and 24h (LTM) after training ■. \* p< 0.01.

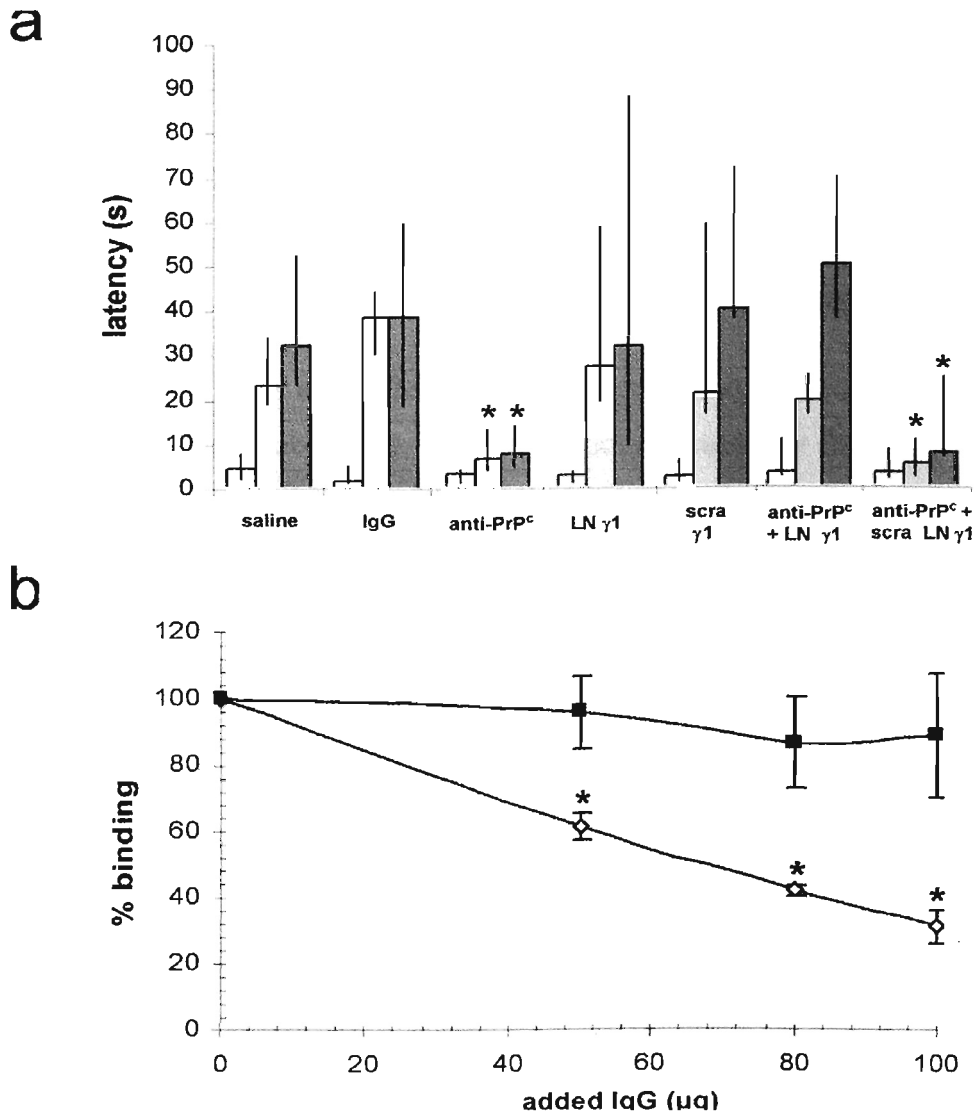
c) Monoclonal antibody against the PrP<sup>c</sup> domain which interacts with LN blocked memory retention. Experiments were performed as in Fig.1. Animals received infusion of purified monoclonal antibodies 8H4, 8B4 or mouse non-immune purified IgG. Memory retention was measured at 0 □, 90 min. (STM) ■ and 24h (LTM) after training ■. \* p< 0.01.

In a second approach, monoclonal antibodies against linear epitopes at PrPc molecule were infused in the hippocampus. The 8H4 antibody (Fig. 3c) which recognizes a PrPc domain from amino acids 175 to 185 (Cui et al., 2003) abrogated STM and LTM consolidation while a second antibody, 8B4, against PrPc residues 34 to 45 (Cui et al., 2003) had no effect even in a concentration 1,000 times higher than 8H4 (Fig. 3c). Thus, the PrPc domain containing the LN binding site is involved in STM and LTM. Additionally, the lack of effect observed for 8B4 antibody rules out an artifact due to antibody interaction with any surface protein. Likewise to what was proposed above for PrPc peptides, we suggest that 8H4 antibody binds to PrPc in the hippocampus impairing its interaction with LN and memory consolidation.

#### *PrPc interaction with LN mediates STM and LTM consolidation*

It was still necessary, however, to demonstrate that the involvement of both macromolecules in memory depends on their binding one another. The LN  $\gamma$ 1 chain peptide is able to bind PrPc (Fig. 2a) and we have results showing that this interaction induces neural plasticity (Graner et al., 2000) and cell signaling in hippocampal neurons in vitro (unpublished data). Although a positive effect was predictable for LN  $\gamma$ 1 chain peptide, its hippocampal infusion (0.08µg/µl) did not affect memory retention (Fig. 4a). This result could be due to ligand (PrPc) or signaling saturation by the LN present in the system. Nonetheless, co-infusion of the LN  $\gamma$ 1 chain peptide was able to prevent the antagonist effect of anti-PrPc antibody infusion on memory retention (Fig. 4a). A control scrambled  $\gamma$ 1 chain peptide was incapable of modifying either normal memory retention or the impairment effect of anti-PrPc antibody. Since the antibody used (same utilized in Fig.1) is a polyclonal against the entire PrPc molecule, we conducted competition

experiments and proved that this antibody is able to dissociate PrP<sup>c</sup>-Ln  $\gamma$ 1 chain peptide binding (Fig.4b).



**Figure 4: PrP<sup>c</sup> interaction with laminin is responsible for STM and LTM.**

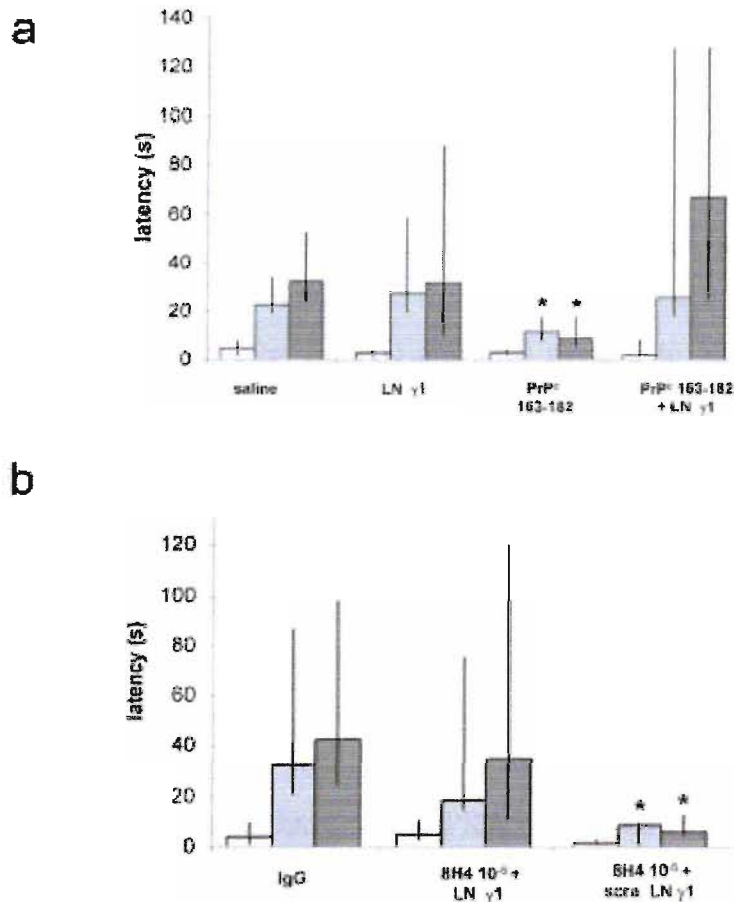
a) LN  $\gamma$ 1 chain peptide reverses anti-PrP<sup>c</sup> antibody inhibition on STM and LTM consolidation. Experiments were performed as in Fig.1. Animals received intra-hippocampal infusion of rabbit non-immune IgG (1.8  $\mu$ g/ $\mu$ l), anti-PrP<sup>c</sup> IgG (1.8  $\mu$ g/ $\mu$ l), LN  $\gamma$ 1 chain peptide (0.08  $\mu$ g/ $\mu$ l), LN  $\gamma$ 1 chain scrambled peptide (0.08  $\mu$ g/ $\mu$ l) (scra  $\gamma$ 1), anti-PrP<sup>c</sup> IgG (1.8  $\mu$ g/ $\mu$ l) plus LN  $\gamma$ 1 chain peptide (0.08  $\mu$ g/ $\mu$ l) (anti-PrP<sup>c</sup> + LN  $\gamma$ 1) or anti-PrP<sup>c</sup> IgG (1.8  $\mu$ g/ $\mu$ l) plus LN  $\gamma$ 1 scrambled peptide (0.08  $\mu$ g/ $\mu$ l) (anti-PrP<sup>c</sup> + scra LN  $\gamma$ 1). Memory retention was measured at 0 □, 90 min. (STM) □ and 24h (LTM) after training ■. \* p < 0.01.

b) LN  $\gamma$ 1 chain peptide binding to PrP<sup>c</sup> is impaired by anti-PrP<sup>c</sup> antibody.  $1.2 \times 10^{-6}$  M  $^{125}$ I- LN  $\gamma$ 1 chain peptide was incubated in His<sub>6</sub>-PrP<sup>c</sup> (4 $\mu$ g) adsorbed wells with increasing concentrations of non-immune rabbit IgG (■- ■) or rabbit anti PrP<sup>c</sup> IgG (◇ - ◇). After extensive washing, radioactivity was measured. Results are expressed as a percentage of the PrP<sup>c</sup> and  $^{125}$ I- LN  $\gamma$ 1 chain peptide binding. Mean  $\pm$  Standard Deviation of at least 3 experiments. Single mean Student's t test, \*p < 0.01.

LN  $\gamma$ 1 peptide co-infusion with stoichiometric amounts of PrPc peptide 163-182, which represents its binding site at the PrPc molecule, abolished memory consolidation inhibition caused by the latter (Fig. 5a). These results may be interpreted in two ways: either the LN  $\gamma$ 1 chain peptide binds the PrPc 163-182 peptide preventing the latter's interaction with LN which becomes accessible to bind endogenous PrPc, or LN  $\gamma$ 1 chain peptide binds PrPc and replaces endogenous LN which is impaired by PrPc peptide 163-182. Indeed, both mechanisms can lead to STM and LTM consolidation.

Additionally, STM and LTM consolidation were also rescued when LN  $\gamma$ 1 chain peptide, but not the scrambled one, was co-infused with antibody 8H4 (Fig. 5b), which recognizes the LN binding site at the PrPc molecule and also blocks memory retention (Fig. 3c). Thus, indicating that 8H4 anti-PrPc antibody effect in memory consolidation is due to its impairment of the PrPc-LN interaction in the dorsal hippocampus.

Recently, Chen and co-workers (Chen et al., 2003) observed that intra-hippocampal infusion of LN peptides or antibodies for 7 days disrupts LN matrix and affects neuronal survival. Moreover, PrPc cross-linking using specific antibodies triggered apoptosis (Solforosi, et al., 2004). Although our infusion time and reagent concentrations were lower than those used by these two groups, we stained treated rat hippocampi using cresyl violet and verified that none of the antibodies or peptides used here affected neuronal viability (data not shown). Additionally, animals that received these reagents were re-evaluated 48 hours after the test session and all behaved like naive animals and were capable of consolidating STM and LTM when trained again (data not shown). Thus, the effects of antibodies and peptides are reversible and nontoxic to the hippocampal structures responsible for memory consolidation.



**Figure 5: PrP<sup>c</sup> interaction with laminin is responsible for STM and LTM.**

a) LN  $\gamma$ 1 chain peptide reverses PrP<sup>c</sup> peptide 163-182 inhibition. Experiments were performed as in Fig.1. Animals received intra-hippocampal infusion of LN  $\gamma$ 1 chain peptide (RNIAEIIKDI) (0.08  $\mu$ g/ $\mu$ l), PrP<sup>c</sup> 163-182 (0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l) or LN  $\gamma$ 1 chain peptide (0.08  $\mu$ g/ $\mu$ l) plus PrP<sup>c</sup> 163-182 (0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l). Memory retention was measured at 0  $\square$ , 90 min. (STM)  $\blacksquare$  and 24h (LTM) after training  $\blacksquare$ . \*  $p < 0.01$ .

b) LN  $\gamma$ 1 peptide reverses anti-PrP<sup>c</sup> 8H4 inhibition on STM and LTM consolidation. Experiments were performed as in Fig.1. Animals received infusion of mouse non-immune IgG ( $10^{-3}$   $\mu$ g/ $\mu$ l), anti-PrP<sup>c</sup> 8H4 ( $10^{-5}$   $\mu$ g/ $\mu$ l) plus LN  $\gamma$ 1 chain peptide (0.08  $\mu$ g/ $\mu$ l) or anti-PrP<sup>c</sup> 8H4 ( $10^{-5}$   $\mu$ g/ $\mu$ l) plus LN  $\gamma$ 1 chain scrambled peptide (0.08  $\mu$ g/ $\mu$ l). Memory retention was measured at 0  $\square$ , 90 min. (STM)  $\blacksquare$  and 24h (LTM) after training  $\blacksquare$ . \*  $p < 0.01$ .

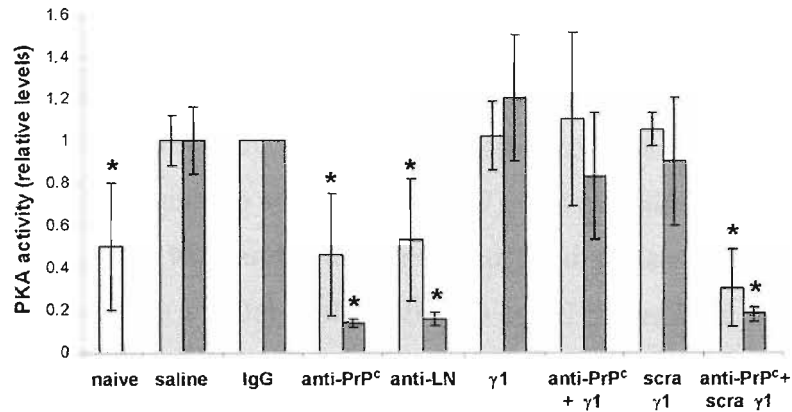
*PrPc-LN binding induces memory consolidation by PKA and MAPK*

Hippocampal cAMP/PKA and Ras/MEK/MAPK pathway cascades are required for inhibitory avoidance memory formation (Bernabeu et al., 1997; Bevilaqua et al., 1997; Izquierdo and Medina, 1997) and for the normal acquisition of different forms of associative learning (Atkins et al., 1998; Walz et al., 2000). Effective consolidation of STM of one-trial inhibitory avoidance requires the continued activity of PKA during the first 90 min. (Vianna et al., 1999), while in the case of LTM, the cAMP/PKA pathway is crucial in CA1 immediately after training and then again 3 to 6h later (Vianna et al., 2000). On the other hand, the MAPK pathway is required immediately after training for STM consolidation and 2 to 3h post-training for LTM consolidation (McGaugh and Izquierdo, 2000).

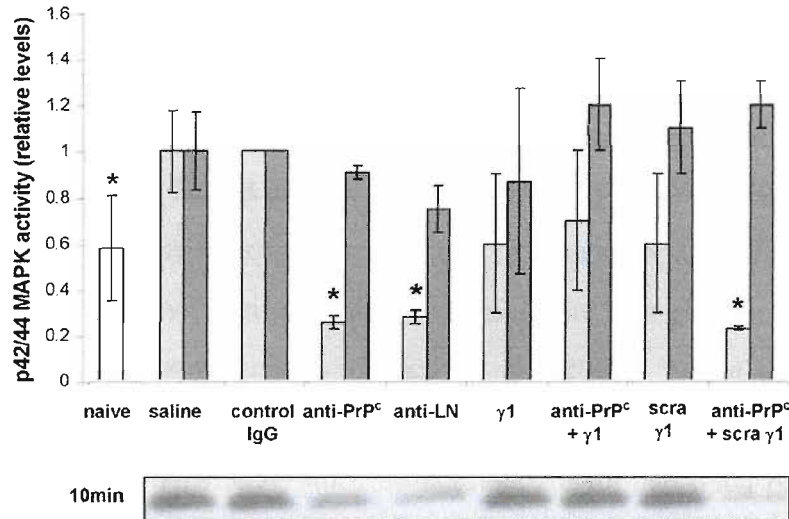
We decided, therefore, to determine whether the observed changes in STM and LTM, caused by interfering on PrPc-LN association, were accompanied by modification of PKA and MAPK activities in the hippocampus. Hippocampal extracts from treated animals were prepared 10 min. and 2h post-training and as previously demonstrated, trained animals receiving saline have higher PKA (Bernabeu et al., 1997; Bevilaqua et al., 1997; Izquierdo and Medina, 1997) and MAPK (Atkins et al., 1998; Walz et al., 2000) activities than naive ones (Figs. 6a and 6b). Interestingly, both anti-PrPc and anti-LN antibodies impaired PKA activity induction both at 10 min. and 2h after training (Fig. 6a) and MAPK activity at 10 min. post-training (Fig. 6b). Conversely, 2h after training no effect on MAPK activation was observed by any of the antibodies (Fig. 6b). Infusion of the LN  $\gamma$ 1 chain peptide or control scrambled  $\gamma$ 1 peptide did not change induction of either PKA or MAPK activities. Nevertheless, when LN  $\gamma$ 1 chain peptide was combined with anti-PrPc antibody it reverted the latter's impairment of PKA and MAPK activation while any inhibitory effect on these enzyme activities was achieved after co-infusion of a control scrambled peptide (Figs. 6a and b). These results indicate that inhibition of PKA and MAPK activities is due to PrPc-LN interaction impairment.

Thus, our data pointed that PrPc-LN interaction induces STM and LTM via PKA and MAPK signaling which are classic pathways for memory consolidation.

a



b



### Figure 6: PrP<sup>c</sup>-LN interaction triggers signal through the cAMP/PKA and MAPK.

Rats received immediately post-training bilateral hippocampal infusions of: saline, non-immune IgG (1.8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) (IgG), anti-PrP<sup>c</sup> IgG (1.8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) (anti-PrP<sup>c</sup>), anti-LN IgG (0.18  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) (anti-LN), LN  $\gamma 1$  chain peptide (0.08  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) ( $\gamma 1$ ), LN  $\gamma 1$  chain scrambled peptide (0.08  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) (scra  $\gamma 1$ ), anti-PrP<sup>c</sup> IgG (1.8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) plus LN  $\gamma 1$  chain peptide (0.08  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) (anti-PrP<sup>c</sup> +  $\gamma 1$ ) and anti-PrP<sup>c</sup> IgG (1.8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) plus LN  $\gamma 1$  chain scrambled peptide (0.08  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) (anti-PrP<sup>c</sup> + scra  $\gamma 1$ ). Naive animals  $\square$ , or infused ones (10 min.  $\square$  or 2h after training  $\blacksquare$ ) were sacrificed and hippocampi nuclear extracts used for enzymatic assays. PKA (a) or MAPK (b) activities were determined using assay systems according to the manufacture's instructions. Enzymes activities of each treatment were expressed as relative levels compared to the value from treatment with non-immune IgG (considered equal 1). Results were represented as mean  $\pm$  Standard Deviation (SD), (n=7 to 8 animals for each treatment) and analyses were performed by single mean Student's t test. \* p<0.05 compared to IgG treated group. Figures bellow graphic b show autoradiograms obtained in MAPK activity assays.

## DISCUSSION

Previous work has shown that memory is not disrupted in mice devoid of *Prnp* which can be explained by the obvious redundancy that must exist in order to preserve such an important phenotype (Bueler et al., 1992). Alterations in essential cellular signaling pathways such as higher PKA and MAPK activities have been described in two

strains of *Prnp* ablated animals with different genetic backgrounds, Zrch-1 and Npu (Brown et al., 2002; Chiarini et al., 2002). Since both enzyme activities are essential for memory consolidation (Izquierdo and Medina, 1997), it is plausible to speculate that their altered pattern contributes to compensatory mechanisms in these mice. Consequently the approach presented here is a suitable alternative to establish the PrPc roles in cognition avoiding misinterpretation related to compensatory mechanisms, genetic manipulation and background.

Another point to be clarified is the addition of PrPc to the range of LN receptors thought to be involved in memory consolidation. Although, a great variety of LN trimers can be formed between the  $5\alpha$ ,  $3\beta$  and  $3\gamma$ , chains (Colognato and Yurchenco, 2000), LN-10 ( $\alpha_5\beta_1\gamma_1$ ) seems to be the major isoform present in hippocampus (Indyk et al., 2003). Integrins  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_5\beta_1$  have been described to bind to the first globular domain of the LN  $\gamma_1$  chain mediating angiogenesis (Ponce et al., 2001). Nonetheless, we have demonstrated (Graner et al., 2000) that PrPc is the only cell receptor for the C-terminal LN  $\gamma_1$  chain domain, RNIAEIIKDI, since no neurites are formed upon plating neurons derived from *Prnp* null mice on this peptide. It was however clear that neurons display other receptors for other LN domains since *Prnp* knockout mice neurons do extend neurites when plated on LN (albeit to a smaller extent than wild-type neurons) which are not inhibitable by anti-PrPc antibodies.

Herein, the observation that only those reagents which actually react with the binding sites of PrPc or LN block memory consolidation is a strong indication that indeed they elicit it because they bind one another. Further confirmation is clearly provided by the experiments in which the LN  $\gamma_1$  chain peptide is able to re-establish memory consolidation or signaling pathways which were silenced either by PrPc162-182 peptide or anti-PrPc antibodies infusion.

Integrins, the classical laminin receptors (Giancotti, 2000), have been described to affect LTP consolidation, indicating that they are participants in plastic events such as memory formation (Lynch, 1998; Kramar et al., 2002; Kramar and Lynch, 2003). Furthermore, antibodies against Integrin Associated Protein were able to block memory

retention in rats (Chang et al., 2001) and mice with reduced expression of  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ , and  $\alpha 8$  integrins are defective in hippocampal LTP and spatial memory in the water maze but have normal fear conditioning (Chan et al., 2003). Since no integrin has hitherto been shown to bind the LN  $\gamma$ -1 domain which is the binding site for PrPc, it is possible to speculate, to the extent that preventing PrPc binding to LN completely impairs memory consolidation, that docking of PrPc to the LN  $\gamma$ 1 chain peptide is the nucleating event which must be followed by integrin binding elsewhere in the LN trimer. This model would thus resemble the multimolecular dystrophin complex, also shown to bind LN at the neuromuscular junction (Tinsley et al., 1994).

Participation of the cAMP/PKA/CREB and RAS/MEK/MAPK/Elk-1 signaling pathways during the formation of new memories is well known (Yin et al., 1994; Martin et al., 1997). The decreased PKA activity at 10 min. and 2h after training mediated by PrPc and LN blockage may be responsible for impairment of both STM and LTM consolidation (McGaugh and Izquierdo, 2000; Vianna et al., 2000). On the other hand, the reduction in MAPK activity by anti-PrPc and anti-LN antibodies infusion 10 min. but not 2h post-training is related to the STM impairment but unconnected to LTM consolidation (McGaugh and Izquierdo, 2000). Thus, other pathways besides MAPK must be involved in LTM consolidation mediated by PrPc-LN interaction. Finally, since association of the LN  $\gamma$ 1 chain peptide with anti-PrPc antibodies reverts the latter's inhibitory activity in STM and LTM signaling through PKA and MAPK we can argue that these events are mediated by PrPc-LN interaction.

In the last few months very important issues have been added to the memory and prion fields. A neuron specific isoform of cytoplasmic polyadenylation element binding protein (CPEB) has been characterized as one the stabilizing components of the synaptic mark (Si et al., 2003a) whose activity is greatly dependent on its prion-like activity, pointing to a conformational change related to its gain-of-function (Si et al., 2003b). On the other hand, prion diseases have been associated to the pathological gain-of-function of the physiologically "needless" PrPc, suggesting that these maladies could be treated by blocking this cellular protein (Heppner et al., 2001; White et al., 2003). Conversely, we have observed that PrPc is responsible for protection against neuronal death (Zanata et



al., 2002; Chiarini et al., 2002) and very recently it was observed that cross-linking PrPc in vivo with specific antibodies induces neuronal death (Solforosi et al., 2004). In the present work we showed that PrPc blocking is not toxic since the event is transient; however it affects memory consolidation while this protein is impaired. Therefore, it seems that prion diseases therapy based on PrPc inactivation must be carefully evaluated.

## REFERENCES

- Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD (1998) The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci* **1**: 602-609.
- Banbury Conference on genetic background in mice (1997) Mutant mice and neuroscience: recommendations concerning genetic background. *Neuron* **19**: 755-759.
- Bernabeu R, Bevilaqua L, Ardenghi P, Bromberg E, Schmitz P, Bianchin M, Izquierdo I, Medina JH (1997) Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 7041-7046.
- Bevilaqua L, Ardenghi P, Schroder N, Bromberg E, Schmitz PK, Schaeffer E, Quevedo J, Bianchin M, Walz R, Medina JH, Izquierdo I (1997) Drugs acting upon the cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A signalling pathway modulate memory consolidation when given late after training into rat hippocampus but not amygdala. *Behav Pharmacol* **8**: 331-338.
- Brown DR, Nicholas RS, Canevari L (2002) Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. *J Neurosci Res* **67**: 211-224.
- Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356**: 577-582.
- Cammarota M, Bevilaqua LR, Ardenghi P, Paratcha G, Levi dS, Izquierdo I, Medina JH (2000) Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. *Brain Res Mol Brain Res* **76**: 36-46.
- Chan CS, Weeber EJ, Kurup S, Sweatt JD, Davis RL (2003) Integrin requirement for hippocampal synaptic plasticity and spatial memory. *J Neurosci* **23**: 7107-7116.

- Chang HP, Ma YL, Wan FJ, Tsai LY, Lindberg FP, Lee EH (2001) Functional blocking of integrin-associated protein impairs memory retention and decreases glutamate release from the hippocampus. *Neuroscience* **102**: 289-296.
- Chen ZL, Indyk JA, Strickland S (2003) The hippocampal laminin matrix is dynamic and critical for neuronal survival. *Mol Biol Cell* **14**: 2665-2676.
- Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R (2002) Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J* **21**: 3317-3326.
- Coitinho AS, Roesler R, Martins VR, Brentani RR, Izquierdo I (2003) Cellular prion protein ablation impairs behavior as a function of age. *Neuroreport* **14**: 1375-1379.
- Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR, Jefferys JG (1994) Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* **370**: 295-297.
- Colognato H, Yurchenco PD (2000) Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn* **218**: 213-234.
- Croes EA, Dermaut B, Houwing-Duistermaat JJ, Van den BM, Cruts M, Breteleur MM, Hofman A, van Broeckhoven C, van Duijn CM (2003) Early cognitive decline is associated with prion protein codon 129 polymorphism. *Ann Neurol* **54**: 275-276.
- Cui T, Daniels M, Wong BS, Li R, Sy MS, Sassoon J, Brown DR (2003) Mapping the functional domain of the prion protein. *Eur J Biochem* **270**: 3368-3376.
- Davis HP, Squire LR (1984) Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull* **96**: 518-559.
- Giancotti FG (2000) Complexity and specificity of integrin signalling. *Nat Cell Biol* **2**: E13-E14.
- Giordano R, Chammas R, Veiga SS, Colli W, Alves MJ (1994) An acidic component of the heterogeneous Tc-85 protein family from the surface of *Trypanosoma cruzi* is a laminin binding glycoprotein. *Mol Biochem Parasitol* **65**: 85-94.

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

Grimpe B, Dong S, Doller C, Temple K, Malouf AT, Silver J (2002) The critical role of basement membrane-independent laminin gamma 1 chain during axon regeneration in the CNS. *J Neurosci* **22**: 3144-3160.

Grotewiel MS, Beck CD, Wu KH, Zhu XR, Davis RL (1998) Integrin-mediated short-term memory in *Drosophila*. *Nature* **391**: 455-460.

Heppner FL, Musahl C, Arrighi I, Klein MA, Rulicke T, Oesch B, Zinkernagel RM, Kalinke U, Aguzzi A (2001) Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic expression of anti-prion protein antibodies. *Science* **294**: 178-182.

Huang YY, Li XC, Kandel ER (1994) cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase. *Cell* **79**: 69-79.

Indyk JA, Chen ZL, Tsirka SE, Strickland S (2003) Laminin chain expression suggests that laminin-10 is a major isoform in the mouse hippocampus and is degraded by the tissue plasminogen activator/plasmin protease cascade during excitotoxic injury. *Neuroscience* **116**: 359-371.

Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza, de Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH (1998) Mechanisms for memory types differ. *Nature* **393**: 635-636.

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

Kramar EA, Bernard JA, Gall CM, Lynch G (2002) Alpha3 integrin receptors contribute to the consolidation of long-term potentiation. *Neuroscience* **110**: 29-39.

Kramar EA, Lynch G (2003) Developmental and regional differences in the consolidation of long-term potentiation. *Neuroscience* **118**: 387-398.

Lledo PM, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB, Nicoll RA (1996) Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 2403-2407.

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

Lynch G (1998) Memory and the brain: unexpected chemistries and a new pharmacology. *Neurobiol Learn Mem* **70**: 82-100.

Martin KC, Michael D, Rose JC, Barad M, Casadio A, Zhu H, Kandel ER (1997) MAP kinase translocates into the nucleus of the presynaptic cell and is required for long-term facilitation in Aplysia. *Neuron* **18**: 899-912.

McGaugh JL (1966) Time-dependent processes in memory storage. *Science* **153**: 1351-1358.

McGaugh JL, Izquierdo I (2000) The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Trends Pharmacol Sci* **21**: 208-210.

Moore RC, Lee IY, Silverman GL, Harrison PM, Strome R, Heinrich C, Karunaratne A, Pasternak SH, Chishti MA, Liang Y, Mastrangelo P, Wang K, Smit AF, Katamine S, Carlson GA, Cohen FE, Prusiner SB, Melton DW, Tremblay P, Hood LE, Westaway D (1999) Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J Mol Biol* **292**: 797-817.

Nishida N, Katamine S, Shigematsu K, Nakatani A, Sakamoto N, Hasegawa S, Nakaoka R, Atarashi R, Kataoka Y, Miyamoto T (1997) Prion protein is necessary for latent learning and long-term memory retention. *Cell Mol Neurobiol* **17**: 537-545.

Ponce ML, Nomizu M, Kleinman HK (2001) An angiogenic laminin site and its antagonist bind through the alpha(v)beta3 and alpha5beta1 integrins. *FASEB J* **15**: 1389-1397.

Solfrosi L, Criado JR, McGavern DB, Wirz S, Sanches-Alavez M, Sugama S, DeGiorgio LA, Volpe BT, Wiseman E, Abalos G, Masliah E, Gilden D, Oldstone MB, Conti B, Willison RA (2004) Cross-Linking Cellular Prion Protein Triggers Neuronal Apoptosis in Vivo. *Science* **303**: 1514-1516.

Si K, Giustetto M, Etkin A, Hsu R, Janisiewicz AM, Miniaci MC, Kim JH, Zhu H, Kandel ER (2003a) A neuronal isoform of CPEB regulates local protein synthesis and stabilizes synapse-specific long-term facilitation in aplysia. *Cell* **115**: 893-904.

Si K, Lindquist S, Kandel ER (2003b) A neuronal isoform of the aplysia CPEB has prion-like properties. *Cell* **115**: 879-891.

Taubenfeld SM, Milekic MH, Monti B, Alberini CM (2001) The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nat Neurosci* **4**: 813-818.

Tinsley JM, Blake DJ, Zuellig RA, Davies KE (1994) Increasing complexity of the dystrophin-associated protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 8307-8313.

Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM, Ardenghi P, Pereira P, Rodrigues C, Moletta B, Medina JH, Izquierdo I (2000) Differential role of hippocampal cAMP-dependent protein kinase in short- and long-term memory. *Neurochem Res* **25**: 621-626.

Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM, Medina JH, Izquierdo I (1999) Intrahippocampal infusion of an inhibitor of protein kinase A separates short- from long-term memory. *Behav Pharmacol* **10**: 223-227.

Walz R, Castro RM, Velasco TR, Carlotti CG, Jr., Sakamoto AC, Brentani RR, Martins VR (2002) Cellular prion protein: implications in seizures and epilepsy. *Cell Mol Neurobiol* **22**: 249-257.

Walz R, Roesler R, Quevedo J, Sant'Anna MK, Madruga M, Rodrigues C, Gottfried C, Medina JH, Izquierdo I (2000) Time-dependent impairment of inhibitory avoidance retention in rats by posttraining infusion of a mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor into cortical and limbic structures. *Neurobiol Learn Mem* **73**: 11-20.

White AR, Enever P, Tayebi M, Mushens R, Linehan J, Brandner S, Anstee D, Collinge J, Hawke S (2003) Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease. *Nature* **422**: 80-83.

Yin JC, Wallach JS, Del Vecchio M, Wilder EL, Zhou H, Quinn WG, Tully T (1994) Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. *Cell* **79**: 49-58.

Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, Hajj GN, Chiarini LB, Nomizo R, Freitas AR, Cabral AL, Lee KS, Juliano MA, de Oliveira E, Jachieri SG, Burlingame A, Huang L, Linden R, Brentani RR, Martins VR (2002) Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J* **21**: 3307-3316.

## I.V Conclusões

Neste trabalho foram abordados vários aspectos da biologia da proteína prion celular, focando principalmente suas interações com outros ligantes e o papel das mesmas nas células.

Entre as muitas interações já descritas na literatura para a proteína PrPc, este trabalho descreve três proteínas que se destacam em meio ao que já foi mostrado, por serem parceiras de PrPc em alguns fenômenos biológicos: Vn, Ln e STI1.

Vn e Ln são proteínas de matriz extracelular que interagem com PrPc em domínios distintos mas que parecem apresentar comportamento similar nos modelos em que ambas as proteínas foram avaliadas. Em sistema nervoso central, ambas as proteínas promovem neuritogênese que está diminuída na ausência de PrPc. Em sistema nervoso periférico, as duas proteínas também são capazes de promover neuritogênese. Pelo menos para vitronectina, este efeito é dependente de PrPc, mas pode ser compensado por integrinas.

Como Ln e Vn fazem parte da matriz extracelular, PrPc pode exercer o papel de âncora neste sistema, localizando-se nos contatos focais que um cone de crescimento precisa construir para poder estender-se.

Entre os efeitos biológicos representados pela neuritogênese em culturas celulares encontra-se a plasticidade neuronal requerida durante o desenvolvimento e o aprendizado. Neste trabalho demonstramos que a interação PrPc-Ln é essencial para a consolidação das memórias de curta e longa duração, reproduzindo *in vivo* a importância desta interação.

Apesar de Ln e Vn ligarem-se a domínios diferentes de PrPc observamos que em ensaios *in vitro* elas competem pela ligação a PrPc. Desta forma, no contexto celular, os efeitos mediados por elas irão depender da disponibilidade de cada uma no microambiente celular e do conjunto dos outros receptores para Ln e Vn que esta célula irá expressar.



O terceiro ligante de PrPc, STI1, é uma proteína de resposta a estresse oxidativo cuja expressão majoritária ocorre no citoplasma. Apenas uma fração desta proteína encontra-se na membrana ou, no que o grupo agora acredita, esteja em trânsito através da membrana a caminho da secreção para o meio extracelular. Se STI1 é uma proteína que se encontra solúvel no meio extracelular ela pode atuar como um fator neurotrófico. De fato, esta proteína promove a neuritogênese em neurônios hipocámpais e da raiz dorsal de maneira totalmente dependente de PrPc. Além de promover a neuritogênese, STI1 também é um fator de sobrevivência neuronal, como observado em retina e hipocampo. Estas duas funções são transmitidas através de cascatas de transdução de sinal independentes. Enquanto a neuritogênese é dependente de MAPK, a neuroproteção ocorre pela via de PKA.

As moléculas Vn e STI1 são mutuamente exclusivas quanto a ligação a PrPc, pois por ambas ligarem-se ao mesmo sítio desta proteína. Além disso, Vn tem uma afinidade cerca de 10 vezes maior por PrPc que STI1. Células tratadas com Vn e STI1 simultaneamente, apresentam o mesmo comportamento que células tratadas somente com Vn, confirmando que esta é capaz de competir com STI1 pela ligação a PrPc.

Já Ln e STI1 ligam-se a domínios independentes em PrPc e assim poderiam agir conjuntamente na neuritogênese. Isto de fato acontece e culturas celulares de neurônios de DRG tratadas com ambas as proteínas em concentrações sub-ótimas apresentam uma potenciação muito grande do efeito neuritogênico, tanto em quantidade quando em velocidade do surgimento de neuritos.

Concluindo, durante os trabalhos realizados nesta tese foi possível determinar três novos ligantes da proteína príon celular e o papel destas interações em mecanismos de plasticidade neuronal que incluem a formação de neuritos, a neuroproteção e, em um contexto mais amplo, a formação da memória. Estes eventos contribuem para o entendimento não somente da

biologia da proteína prion celular e de seus ligantes, mas também lançam uma nova luz aos mecanismos de desenvolvimento neuronal.

## V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguzzi,A., Heikenwalder,M., and Miele,G. (2004). Progress and problems in the biology, diagnostics, and therapeutics of prion diseases. *J. Clin. Invest*, **114**, 153-160.
- Aguzzi,A. and Polymenidou,M. (2004). Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell*, **116**, 313-327.
- Alper,T., Cramp,W.A., Haig,D.A., and Clarke,M.C. (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature*, **214**, 764-766.
- Alper,T., Haig,D.A., and Clarke,M.C. (1966). The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **22**, 278-284.
- Asante,E.A., Gowland,I., Linehan,J.M., Mahal,S.P., and Collinge,J. (2002a). Expression pattern of a mini human PrP gene promoter in transgenic mice. *Neurobiol. Dis.*, **10**, 1-7.
- Asante,E.A., Linehan,J.M., Desbruslais,M., Joiner,S., Gowland,I., Wood,A.L., Welch,J., Hill,A.F., Lloyd,S.E., Wadsworth,J.D., and Collinge,J. (2002b). BSE prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD-like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein. *EMBO J.*, **21**, 6358-6366.
- Aucouturier,P., Kacsak,R.J., Frangione,B., and Wisniewski,T. (1999). Biochemical and conformational variability of human prion strains in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci. Lett.*, **274**, 33-36.
- Banks,W.A., Niehoff,M.L., Adessi,C., and Soto,C. (2004). Passage of murine scrapie prion protein across the mouse vascular blood-brain barrier. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **318**, 125-130.
- Baranyi,L., Campbell,W., Ohshima,K., Fujimoto,S., Boros,M., and Okada,H. (1995). The antisense homology box: a new motif within proteins that encodes biologically active peptides. *Nat. Med.*, **1**, 894-901.
- Basler,K., Oesch,B., Scott,M., Westaway,D., Walchli,M., Groth,D.F., McKinley,M.P., Prusiner,S.B., and Weissmann,C. (1986). Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*, **46**, 417-428.
- Beck,K., Hunter,I., and Engel,J. (1990). Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J.*, **4**, 148-160.

Besnoit,C. and Morel,C. (1898). Note sur les lesions nervoses de la tremblante du mouton. *Revue Veter Toulouse*, **23**, 397-400.

Blalock,J.E. (1990). Complementarity of peptides specified by 'sense' and 'antisense' strands of DNA. *Trends Biotechnol.*, **8**, 140-144.

Blatch,G.L., Lassel,M., Zetter,B.R., and Kundra,V. (1997). Isolation of a mouse cDNA encoding mSTI1, a stress-inducible protein containing the TPR motif. *Gene*, **194**, 277-282.

Boettiger,D., Lynch,L., Blystone,S., and Huber,F. (2001). Distinct ligand-binding modes for integrin alpha(v)beta(3)-mediated adhesion to fibronectin versus vitronectin. *J. Biol. Chem.*, **276**, 31684-31690.

Bolton,D.C., McKinley,M.P., and Prusiner,S.B. (1982). Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*, **218**, 1309-1311.

Bons,N., Mestre-Frances,N., Belli,P., Cathala,F., Gajdusek,D.C., and Brown,P. (1999). Natural and experimental oral infection of nonhuman primates by bovine spongiform encephalopathy agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **96**, 4046-4051.

Brentani,R.R. (1988). Biological implications of complementary hydrophobicity of amino acids. *J. Theor. Biol.*, **135**, 495-499.

Brown,D.R. and Besinger,A. (1998). Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem. J.*, **334 ( Pt 2)**, 423-429.

Brown,D.R., Nicholas,R.S., and Canevari,L. (2002). Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. *J. Neurosci. Res.*, **67**, 211-224.

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., and Kretzschmar,H. (1997a). The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*, **390**, 684-687.

Brown,D.R., Schulz-Schaeffer,W.J., Schmidt,B., and Kretzschmar,H.A. (1997b). Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurology*, **146**, 104-112.

Brown,L.R. and Harris,D.A. (2003). Copper and zinc cause delivery of the prion protein from the plasma membrane to a subset of early endosomes and the Golgi. *J. Neurochem.*, **87**, 353-363.

Bruce,M.E. (2003). TSE strain variation. *Br. Med. Bull.*, **66**, 99-108.

Bruce, M.E., Will, R.G., Ironside, J.W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCordle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H., and Bostock, C.J. (1997). Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, **389**, 498-501.

Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguet, M., and Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, **73**, 1339-1347.

Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H.P., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Aguet, M., and Weissmann, C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*, **356**, 577-582.

Caboclo, L.O., Huang, N., Lepski, G.A., Livramento, J.A., Buchpiguel, C.A., Porto, C.S., and Nitrini, R. (2002). Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease following human growth hormone therapy: case report. *Arq Neuropsiquiatr.*, **60**, 458-461.

Cabral, A.L., Lee, K.S., and Martins, V.R. (2002). Regulation of the cellular prion protein gene expression depends on chromatin conformation. *J. Biol. Chem.*, **277**, 5675-5682.

Castro, R. M. Proteína prion celular em doenças humanas não-priônicas: aspectos moleculares e celulares. 1-163. 2004. Fundação Antônio Prudente.  
Ref Type: Thesis/Dissertation

Cervenakova, L., Buetefisch, C., Lee, H.S., Taller, I., Stone, G., Gibbs, C.J., Jr., Brown, P., Hallett, M., and Goldfarb, L.G. (1999). Novel PRNP sequence variant associated with familial encephalopathy. *Am. J. Med. Genet.*, **88**, 653-656.

Chandler, R.L. (1961). Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet*, **1**, 1378-1379.

Chang, H.C., Nathan, D.F., and Lindquist, S. (1997). In vivo analysis of the Hsp90 cochaperone Sti1 (p60). *Mol. Cell Biol.*, **17**, 318-325.

Chen, S., Mange, A., Dong, L., Lehmann, S., and Schachner, M. (2003a). Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. *Mol. Cell Neurosci.*, **22**, 227-233.

Chen, Z.L., Indyk, J.A., and Strickland, S. (2003b). The hippocampal laminin matrix is dynamic and critical for neuronal survival. *Mol. Biol. Cell*, **14**, 2665-2676.

Chen, Z.L. and Strickland, S. (1997). Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell*, **91**, 917-925.

- Chen,Z.L. and Strickland,S. (2003). Laminin gamma1 is critical for Schwann cell differentiation, axon myelination, and regeneration in the peripheral nerve. *J. Cell Biol.*, **163**, 889-899.
- Chesebro,B., Race,R., Wehrly,K., Nishio,J., Bloom,M., Lechner,D., Bergstrom,S., Robbins,K., Mayer,L., Keith,J.M., and . (1985). Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature*, **315**, 331-333.
- Chiarini,L.B., Freitas,A.R., Zanata,S.M., Brentani,R.R., Martins,V.R., and Linden,R. (2002). Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J.*, **21**, 3317-3326.
- Coitinho,A.S., Roesler,R., Martins,V.R., Brentani,R.R., and Izquierdo,I. (2003). Cellular prion protein ablation impairs behavior as a function of age. *Neuroreport*, **14**, 1375-1379.
- Collinge,J., Palmer,M.S., and Dryden,A.J. (1991). Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, **337**, 1441-1442.
- Collinge,J., Sidle,K.C., Meads,J., Ironside,J., and Hill,A.F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*, **383**, 685-690.
- Collinge,J., Whittington,M.A., Sidle,K.C., Smith,C.J., Palmer,M.S., Clarke,A.R., and Jefferys,J.G. (1994). Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature*, **370**, 295-297.
- Colognato,H. and Yurchenco,P.D. (2000). Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev. Dyn.*, **218**, 213-234.
- Condic,M.L. and Letourneau,P.C. (1997). Ligand-induced changes in integrin expression regulate neuronal adhesion and neurite outgrowth. *Nature*, **389**, 852-856.
- Creutzfeldt,H. (1920). Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z ges Neurol Psychiatr*, **57**, 1-19.
- Croes,E.A., Jansen,G.H., Lemstra,A.W., Frijns,C.J., van Gool,W.A., and van Duijn,C.M. (2001). The first two patients with dura mater associated Creutzfeldt-Jakob disease in the Netherlands. *J. Neurol.*, **248**, 877-880.
- Cuille,J. and Chelle,P.L. (1939). Experimental transmission of trembling to the goat. *Comptes Rendus des Seances de l'Academie des Sciences*, **208**, 1058-1160.

- Degryse,B., Orlando,S., Resnati,M., Rabbani,S.A., and Blasi,F. (2001). Urokinase/urokinase receptor and vitronectin/alpha(v)beta(3) integrin induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization through different signaling pathways. *Oncogene*, **20**, 2032-2043.
- Diarra-Mehrpour,M., Arrabal,S., Jalil,A., Pinson,X., Gaudin,C., Pietu,G., Pitaval,A., Ripoché,H., Eloit,M., Dormont,D., and Chouaib,S. (2004). Prion protein prevents human breast carcinoma cell line from tumor necrosis factor alpha-induced cell death. *Cancer Res.*, **64**, 719-727.
- Ding,Q., Stewart,J., Jr., Olman,M.A., Klobe,M.R., and Gladson,C.L. (2003). The pattern of enhancement of Src kinase activity on platelet-derived growth factor stimulation of glioblastoma cells is affected by the integrin engaged. *J. Biol. Chem.*, **278**, 39882-39891.
- Doh-ura,K., Tateishi,J., Sasaki,H., Kitamoto,T., and Sakaki,Y. (1989). Pro----leu change at position 102 of prion protein is the most common but not the sole mutation related to Gerstmann-Straussler syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **163**, 974-979.
- Finckh,U., Muller-Thomsen,T., Mann,U., Eggers,C., Marksteiner,J., Meins,W., Binetti,G., Alberici,A., Hock,C., Nitsch,R.M., and Gal,A. (2000). High prevalence of pathogenic mutations in patients with early-onset dementia detected by sequence analyses of four different genes. *Am. J. Hum. Genet.*, **66**, 110-117.
- Flechsig,E., Hegyi,I., Enari,M., Schwarz,P., Collinge,J., and Weissmann,C. (2001). Transmission of scrapie by steel-surface-bound prions. *Mol. Med.*, **7**, 679-684.
- Ford,M.J., Burton,L.J., Li,H., Graham,C.H., Frobert,Y., Grassi,J., Hall,S.M., and Morris,R.J. (2002a). A marked disparity between the expression of prion protein and its message by neurones of the CNS. *Neuroscience*, **111**, 533-551.
- Ford,M.J., Burton,L.J., Morris,R.J., and Hall,S.M. (2002b). Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. *Neuroscience*, **113**, 177-192.
- Forloni,G., Angeretti,N., Chiesa,R., Monzani,E., Salmona,M., Bugiani,O., and Tagliavini,F. (1993). Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature*, **362**, 543-546.
- Francois,P.P., Preissner,K.T., Herrmann,M., Haugland,R.P., Vaudaux,P., Lew,D.P., and Krause,K.H. (1999). Vitronectin interaction with glycosaminoglycans. Kinetics, structural determinants, and role in binding to endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **274**, 37611-37619.

- Gabriel,J.M., Oesch,B., Kretzschmar,H., Scott,M., and Prusiner,S.B. (1992). Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 9097-9101.
- Gajdusek,D.C. (1977). Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science*, **197**, 943-960.
- Gajdusek,D.C., Gibbs,C.J., and Alpers,M. (1966). Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature*, **209**, 794-796.
- Gajdusek,D.C. and Zigas,V. (1957). Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *N. Engl. J. Med.*, **257**, 974-978.
- Gasset,M., Baldwin,M.A., Lloyd,D.H., Gabriel,J.M., Holtzman,D.M., Cohen,F., Fletterick,R., and Prusiner,S.B. (1992). Predicted alpha-helical regions of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 10940-10944.
- Gauczynski,S., Peyrin,J.M., Haik,S., Leucht,C., Hundt,C., Rieger,R., Krasemann,S., Deslys,J.P., Dormont,D., Lasmezas,C.I., and Weiss,S. (2001). The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *EMBO J.*, **20**, 5863-5875.
- Gebb,C., Hayman,E.G., Engvall,E., and Ruoslahti,E. (1986). Interaction of vitronectin with collagen. *J. Biol. Chem.*, **261**, 16698-16703.
- Gehlsen,K.R., Sriramarao,P., Furcht,L.T., and Skubitz,A.P. (1992). A synthetic peptide derived from the carboxy terminus of the laminin A chain represents a binding site for the alpha 3 beta 1 integrin. *J. Cell Biol.*, **117**, 449-459.
- Germer,M., Kanse,S.M., Kirkegaard,T., Kjoller,L., Felding-Habermann,B., Goodman,S., and Preissner,K.T. (1998). Kinetic analysis of integrin-dependent cell adhesion on vitronectin--the inhibitory potential of plasminogen activator inhibitor-1 and RGD peptides. *Eur. J. Biochem.*, **253**, 669-674.
- Ghetti,B., Piccardo,P., Spillantini,M.G., Ichimiya,Y., Porro,M., Perini,F., Kitamoto,T., Tateishi,J., Seiler,C., Frangione,B., Bugiani,O., Giaccone,G., Prelli,F., Goedert,M., Dlouhy,S.R., and Tagliavini,F. (1996). Vascular variant of prion protein cerebral amyloidosis with tau-positive neurofibrillary tangles: the phenotype of the stop codon 145 mutation in PRNP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 744-748.
- Giancotti,F.G. and Ruoslahti,E. (1999). Integrin signaling. *Science*, **285**, 1028-1032.



- Gibbons,R.A. and Hunter,G.D. (1967). Nature of the scrapie agent. *Nature*, **215**, 1041-1043.
- Gibbs,C.J., Jr., Gajdusek,D.C., Asher,D.M., Alpers,M.P., Beck,E., Daniel,P.M., and Matthews,W.B. (1968). Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science*, **161**, 388-389.
- Goldfarb,L.G., Brown,P., Little,B.W., Cervenakova,L., Kenney,K., Gibbs,C.J., Jr., and Gajdusek,D.C. (1993). A new (two-repeat) octapeptide coding insert mutation in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*, **43**, 2392-2394.
- Grabham,P.W., Gallimore,P.H., and Grand,R.J. (1992). Vitronectin is the major serum protein essential for NGF-mediated neurite outgrowth from PC12 cells. *Exp. Cell Res.*, **202**, 337-344.
- Graner,E., Mercadante,A.F., Zanata,S.M., Forlenza,O.V., Cabral,A.L., Veiga,S.S., Juliano,M.A., Roesler,R., Walz,R., Minetti,A., Izquierdo,I., Martins,V.R., and Brentani,R.R. (2000a). Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **76**, 85-92.
- Graner,E., Mercadante,A.F., Zanata,S.M., Martins,V.R., Jay,D.G., and Brentani,R.R. (2000b). Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. *FEBS Lett.*, **482**, 257-260.
- Griffith,J.S. (1967). Self-replication and scrapie. *Nature*, **215**, 1043-1044.
- Hadlow,W.J. (1959). Scrapie and kuru. *The Lancet*, **2**, 289-290.
- Hapke,S., Kessler,H., Lubber,B., Bengel,A., Hutzler,P., Hofler,H., Schmitt,M., and Reuning,U. (2003). Ovarian cancer cell proliferation and motility is induced by engagement of integrin alpha(v)beta3/Vitronectin interaction. *Biol. Chem.*, **384**, 1073-1083.
- Harris,D.A. (1999). Cellular biology of prion diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, **12**, 429-444.
- Harris,D.A., Lele,P., and Snider,W.D. (1993). Localization of the mRNA for a chicken prion protein by in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **90**, 4309-4313.
- Hayman,E.G., Pierschbacher,M.D., Ohgren,Y., and Ruoslahti,E. (1983). Serum spreading factor (vitronectin) is present at the cell surface and in tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **80**, 4003-4007.

Herms,J., Tings,T., Gall,S., Madlung,A., Giese,A., Siebert,H., Schurmann,P., Windl,O., Brose,N., and Kretzschmar,H. (1999). Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J. Neurosci.*, **19**, 8866-8875.

Herzog,C., Sales,N., Etchegaray,N., Charbonnier,A., Freire,S., Dormont,D., Deslys,J.P., and Lasmezas,C.I. (2004). Tissue distribution of bovine spongiform encephalopathy agent in primates after intravenous or oral infection. *Lancet*, **363**, 422-428.

Hill,A.F., Desbruslais,M., Joiner,S., Sidle,K.C., Gowland,I., Collinge,J., Doey,L.J., and Lantos,P. (1997). The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*, **389**, 448-50, 526.

Honore,B., Leffers,H., Madsen,P., Rasmussen,H.H., Vandekerckhove,J., and Celis,J.E. (1992). Molecular cloning and expression of a transformation-sensitive human protein containing the TPR motif and sharing identity to the stress-inducible yeast protein STI1. *J. Biol. Chem.*, **267**, 8485-8491.

Houston,F., Foster,J.D., Chong,A., Hunter,N., and Bostock,C.J. (2000). Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet*, **356**, 999-1000.

Hsiao,K., Baker,H.F., Crow,T.J., Poulter,M., Owen,F., Terwilliger,J.D., Westaway,D., Ott,J., and Prusiner,S.B. (1989). Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature*, **338**, 342-345.

Hsiao,K., Dlouhy,S.R., Farlow,M.R., Cass,C., Da Costa,M., Conneally,P.M., Hodes,M.E., Ghetti,B., and Prusiner,S.B. (1992). Mutant prion proteins in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease with neurofibrillary tangles. *Nat. Genet.*, **1**, 68-71.

Huang,Z., Gabriel,J.M., Baldwin,M.A., Fletterick,R.J., Prusiner,S.B., and Cohen,F.E. (1994). Proposed three-dimensional structure for the cellular prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 7139-7143.

Hundt,C., Peyrin,J.M., Haik,S., Gauczynski,S., Leucht,C., Rieger,R., Riley,M.L., Deslys,J.P., Dormont,D., Lasmezas,C.I., and Weiss,S. (2001). Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor. *EMBO J.*, **20**, 5876-5886.

Hutter,G., Heppner,F.L., and Aguzzi,A. (2003). No superoxide dismutase activity of cellular prion protein in vivo. *Biol. Chem.*, **384**, 1279-1285.

Hynes,R.O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, **69**, 11-25.

- Hynes,R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, **110**, 673-687.
- Indyk,J.A., Chen,Z.L., Tsirka,S.E., and Strickland,S. (2003). Laminin chain expression suggests that laminin-10 is a major isoform in the mouse hippocampus and is degraded by the tissue plasminogen activator/plasmin protease cascade during excitotoxic injury. *Neuroscience*, **116**, 359-371.
- Inoue,I., Kitamoto,T., Doh-ura,K., Shii,H., Goto,I., and Tateishi,J. (1994). Japanese family with Creutzfeldt-Jakob disease with codon 200 point mutation of the prion protein gene. *Neurology*, **44**, 299-301.
- Jakob,A. (1921). Über einenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde (Spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Z ges Neurol Psychiatr*, **64**, 147-228.
- Kandel,E.R., Schwartz,J.H., and Jessel T.M (2000). The guidance of axons to their targets. In Eric R.Kandel, James H.Schwartz, and Thomas M.Jessel (Eds.), *Principles of Neural Science*, . McGraw-Hill, New York, pp. 1063-1086.
- Kaneko,K., Vey,M., Scott,M., Pilkuhn,S., Cohen,F.E., and Prusiner,S.B. (1997). COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **94**, 2333-2338.
- Keshet,G.I., Bar-Peled,O., Yaffe,D., Nudel,U., and Gabizon,R. (2000). The cellular prion protein colocalizes with the dystroglycan complex in the brain. *J. Neurochem.*, **75**, 1889-1897.
- Kim,S.J. and Hegde,R.S. (2002). Cotranslational partitioning of nascent prion protein into multiple populations at the translocation channel. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 3775-3786.
- Kitamoto,T., Ohta,M., Doh-ura,K., Hitoshi,S., Terao,Y., and Tateishi,J. (1993). Novel missense variants of prion protein in Creutzfeldt-Jakob disease or Gerstmann-Straussler syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **191**, 709-714.
- Kjoller,L. and Hall,A. (2001). Rac mediates cytoskeletal rearrangements and increased cell motility induced by urokinase-type plasminogen activator receptor binding to vitronectin. *J. Cell Biol.*, **152**, 1145-1157.
- Kocisko,D.A., Come,J.H., Priola,S.A., Chesebro,B., Raymond,G.J., Lansbury,P.T., and Caughey,B. (1994). Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature*, **370**, 471-474.

- Kryndushkin,D.S., Smirnov,V.N., Ter Avanesyan,M.D., and Kushnirov,V.V. (2002). Increased expression of Hsp40 chaperones, transcriptional factors, and ribosomal protein Rpp0 can cure yeast prions. *J. Biol. Chem.*, **277**, 23702-23708.
- Lamprecht,R. and LeDoux,J. (2004). Structural plasticity and memory. *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**, 45-54.
- Lang,C.J., Heckmann,J.G., and Neundorfer,B. (1998). Creutzfeldt-Jakob disease via dural and corneal transplants. *J. Neurol. Sci.*, **160**, 128-139.
- Le Beau,J.M., Liuzzi,F.J., Depto,A.S., and Vinik,A.I. (1995). Up-regulation of laminin B2 gene expression in dorsal root ganglion neurons and nonneuronal cells during sciatic nerve regeneration. *Exp. Neurol.*, **134**, 150-155.
- LeBeau,J.M., Liuzzi,F.J., Depto,A.S., and Vinik,A.I. (1994). Differential laminin gene expression in dorsal root ganglion neurons and nonneuronal cells. *Exp. Neurol.*, **127**, 1-8.
- Lee,K.S., Magalhaes,A.C., Zanata,S.M., Brentani,R.R., Martins,V.R., and Prado,M.A. (2001). Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. *J. Neurochem.*, **79**, 79-87.
- Legname,G., Baskakov,I.V., Nguyen,H.O., Riesner,D., Cohen,F.E., DeArmond,S.J., and Prusiner,S.B. (2004). Synthetic mammalian prions. *Science*, **305**, 673-676.
- Lentz,S.I., Miner,J.H., Sanes,J.R., and Snider,W.D. (1997). Distribution of the ten known laminin chains in the pathways and targets of developing sensory axons. *J. Comp Neurol.*, **378**, 547-561.
- Letourneau,P.C., Pech,I.V., Rogers,S.L., Palm,S.L., McCarthy,J.B., and Furcht,L.T. (1988). Growth cone migration across extracellular matrix components depends on integrin, but migration across glioma cells does not. *J. Neurosci. Res.*, **21**, 286-297.
- Liebkind,R., Laatikainen,T., and Liesi,P. (2003). Is the soluble KDI domain of gamma1 laminin a regeneration factor for the mammalian central nervous system? *J. Neurosci. Res.*, **73**, 637-643.
- Liesi,P., Laatikainen,T., and Wright,J.M. (2001). Biologically active sequence (KDI) mediates the neurite outgrowth function of the gamma-1 chain of laminin-1. *J. Neurosci. Res.*, **66**, 1047-1053.

Llewelyn,C.A., Hewitt,P.E., Knight,R.S., Amar,K., Cousens,S., Mackenzie,J., and Will,R.G. (2004). Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet*, **363**, 417-421.

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

Madore,N., Smith,K.L., Graham,C.H., Jen,A., Brady,K., Hall,S., and Morris,R. (1999). Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface. *EMBO J.*, **18**, 6917-6926.

Magalhaes,A.C., Silva,J.A., Lee,K.S., Martins,V.R., Prado,V.F., Ferguson,S.S., Gomez,M.V., Brentani,R.R., and Prado,M.A. (2002). Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. *J. Biol. Chem.*, **277**, 33311-33318.

Mallucci,G., Dickinson,A., Linehan,J., Klohn,P.C., Brandner,S., and Collinge,J. (2003). Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science*, **302**, 871-874.

Manson,J.C., Clarke,A.R., Hooper,M.L., Aitchison,L., McConnell,I., and Hope,J. (1994). 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol. Neurobiol.*, **8**, 121-127.

Manthorpe,M., Engvall,E., Ruoslahti,E., Longo,F.M., Davis,G.E., and Varon,S. (1983). Laminin promotes neuritic regeneration from cultured peripheral and central neurons. *J. Cell Biol.*, **97**, 1882-1890.

Marella,M., Lehmann,S., Grassi,J., and Chabry,J. (2002). Filipin prevents pathological prion protein accumulation by reducing endocytosis and inducing cellular PrP release. *J. Biol. Chem.*, **277**, 25457-25464.

Martinez-Morales,J.R., Barbas,J.A., Marti,E., Bovolenta,P., Edgar,D., and Rodriguez-Tebar,A. (1997). Vitronectin is expressed in the ventral region of the neural tube and promotes the differentiation of motor neurons. *Development*, **124**, 5139-5147.

Martinez-Morales,J.R., Marti,E., Frade,J.M., and Rodriguez-Tebar,A. (1995). Developmentally regulated vitronectin influences cell differentiation, neuron survival and process outgrowth in the developing chicken retina. *Neuroscience*, **68**, 245-253.

Martins,V.R. and Brentani,R.R. (2002). The biology of the cellular prion protein. *Neurochem. Int.*, **41**, 353-355.

Martins,V.R., Graner,E., Garcia-Abreu,J., de Souza,S.J., Mercadante,A.F., Veiga,S.S., Zanata,S.M., Neto,V.M., and Brentani,R.R. (1997). Complementary hydropathy identifies a cellular prion protein receptor. *Nat. Med.*, **3**, 1376-1382.

Masters,C.L., Gajdusek,D.C., and Gibbs,C.J., Jr. (1981). The familial occurrence of Creutzfeldt-Jakob disease and Alzheimer's disease. *Brain*, **104**, 535-558.

Mastrianni,J.A., Iannicola,C., Myers,R.M., DeArmond,S., and Prusiner,S.B. (1996). Mutation of the prion protein gene at codon 208 in familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*, **47**, 1305-1312.

McKinley,M.P., Bolton,D.C., and Prusiner,S.B. (1983). A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell*, **35**, 57-62.

McKinley,M.P., Hay,B., Lingappa,V.R., Lieberburg,I., and Prusiner,S.B. (1987). Developmental expression of prion protein gene in brain. *Dev. Biol.*, **121**, 105-110.

McKintosh,E., Tabrizi,S.J., and Collinge,J. (2003). Prion diseases. *J. Neurovirol.*, **9**, 183-193.

Medori,R., Tritschler,H.J., LeBlanc,A., Villare,F., Manetto,V., Chen,H.Y., Xue,R., Leal,S., Montagna,P., Cortelli,P., and . (1992). Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *N. Engl. J. Med.*, **326**, 444-449.

Memmo,L.M. and McKeown-Longo,P. (1998). The alphavbeta5 integrin functions as an endocytic receptor for vitronectin. *J. Cell Sci.*, **111 ( Pt 4)**, 425-433.

Merz,P.A., Rohwer,R.G., Kasczak,R., Wisniewski,H.M., Somerville,R.A., Gibbs,C.J., Jr., and Gajdusek,D.C. (1984). Infection-specific particle from the unconventional slow virus diseases. *Science*, **225**, 437-440.

Merz,P.A., Somerville,R.A., Wisniewski,H.M., and Iqbal,K. (1981). Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol. (Berl)*, **54**, 63-74.

Meyer,R.K., McKinley,M.P., Bowman,K.A., Braunfeld,M.B., Barry,R.A., and Prusiner,S.B. (1986). Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **83**, 2310-2314.

Miele,G., Alejo Blanco,A.R., Baybutt,H., Horvat,S., Manson,J., and Clinton,M. (2003). Embryonic activation and developmental expression of the murine prion protein gene. *Gene Expr.*, **11**, 1-12.

- Mironov,A., Jr., Latawiec,D., Wille,H., Bouzamondo-Bernstein,E., Legname,G., Williamson,R.A., Burton,D., DeArmond,S.J., Prusiner,S.B., and Peters,P.J. (2003). Cytosolic prion protein in neurons. *J. Neurosci.*, **23**, 7183-7193.
- Miura,T., Hori-i A, and Takeuchi,H. (1996). Metal-dependent alpha-helix formation promoted by the glycine-rich octapeptide region of prion protein. *FEBS Lett.*, **396**, 248-252.
- Moore,R.C., Lee,I.Y., Silverman,G.L., Harrison,P.M., Strome,R., Heinrich,C., Karunaratne,A., Pasternak,S.H., Chishti,M.A., Liang,Y., Mastrangelo,P., Wang,K., Smit,A.F., Katamine,S., Carlson,G.A., Cohen,F.E., Prusiner,S.B., Melton,D.W., Tremblay,P., Hood,L.E., and Westaway,D. (1999). Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J. Mol. Biol.*, **292**, 797-817.
- Narang,H. (1996). Origin and implications of bovine spongiform encephalopathy. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **211**, 306-322.
- Narang,H.K. (1987a). Scrapie, an unconventional virus: the current views. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **184**, 375-388.
- Narang,H.K. (1987b). Scrapie, an unconventional virus: the current views. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **184**, 375-388.
- Nicolet,C.M. and Craig,E.A. (1989). Isolation and characterization of STI1, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, **9**, 3638-3646.
- Nitrini,R., Rosemberg,S., Passos-Bueno,M.R., da Silva,L.S., Iughetti,P., Papadopoulos,M., Carrilho,P.M., Caramelli,P., Albrecht,S., Zatz,M., and LeBlanc,A. (1997). Familial spongiform encephalopathy associated with a novel prion protein gene mutation. *Ann. Neurol.*, **42**, 138-146.
- Oesch,B., Westaway,D., Walchli,M., McKinley,M.P., Kent,S.B., Aebersold,R., Barry,R.A., Tempst,P., Teplow,D.B., Hood,L.E., and . (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, **40**, 735-746.
- Ogawa,M., Hiraoka,Y., and Aiso,S. (2003). Nuclear translocation of *Xenopus laevis* paxillin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **304**, 676-683.
- Oidtmann,B., Simon,D., Holtkamp,N., Hoffmann,R., and Baier,M. (2003). Identification of cDNAs from Japanese pufferfish (*Fugu rubripes*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) coding for homologues to tetrapod prion proteins. *FEBS Lett.*, **538**, 96-100.

- Paitel,E., Alves,D.C., Vilette,D., Grassi,J., and Checler,F. (2002). Overexpression of PrPc triggers caspase 3 activation: potentiation by proteasome inhibitors and blockade by anti-PrP antibodies. *J. Neurochem.*, **83**, 1208-1214.
- Paitel,E., Fahraeus,R., and Checler,F. (2003a). Cellular prion protein sensitizes neurons to apoptotic stimuli through Mdm2-regulated and p53-dependent caspase 3-like activation. *J. Biol. Chem.*, **278**, 10061-10066.
- Paitel,E., Sunyach,C., Alves,D.C., Bourdon,J.C., Vincent,B., and Checler,F. (2003b). Primary cultured neurons devoid of cellular prion display lower responsiveness to staurosporine through the control of p53 at both transcriptional and post-transcriptional levels. *J. Biol. Chem.*.
- Pan,K.M., Baldwin,M., Nguyen,J., Gasset,M., Serban,A., Groth,D., Mehlhorn,I., Huang,Z., Fletterick,R.J., Cohen,F.E., and . (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 10962-10966.
- Panegyres,P.K., Toufexis,K., Kakulas,B.A., Cernevakova,L., Brown,P., Ghetti,B., Piccardo,P., and Dlouhy,S.R. (2001). A new PRNP mutation (G131V) associated with Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *Arch. Neurol.*, **58**, 1899-1902.
- Patino,M.M., Liu,J.J., Glover,J.R., and Lindquist,S. (1996). Support for the prion hypothesis for inheritance of a phenotypic trait in yeast. *Science*, **273**, 622-626.
- Pattison,I.H. and Millson,G. (1961). Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. *J. Comp Pathol.*, **71**, 101-109.
- Peden,A.H., Head,M.W., Ritchie,D.L., Bell,J.E., and Ironside,J.W. (2004). Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet*, **364**, 527-529.
- Peoc'h,K., Manivet,P., Beaudry,P., Attane,F., Besson,G., Hannequin,D., Delasnerie-Laupretre,N., and Laplanche,J.L. (2000). Identification of three novel mutations (E196K, V203I, E211Q) in the prion protein gene (PRNP) in inherited prion diseases with Creutzfeldt-Jakob disease phenotype. *Hum. Mutat.*, **15**, 482.
- Perera,W.S. and Hooper,N.M. (2001). Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region. *Curr. Biol.*, **11**, 519-523.
- Peters,P.J., Mironov,A., Jr., Peretz,D., van Donselaar,E., Leclerc,E., Erpel,S., DeArmond,S.J., Burton,D.R., Williamson,R.A., Vey,M., and Prusiner,S.B. (2003). Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J. Cell Biol.*, **162**, 703-717.



Piccardo,P., Dlouhy,S.R., Lievens,P.M., Young,K., Bird,T.D., Nochlin,D., Dickson,D.W., Vinters,H.V., Zimmerman,T.R., Mackenzie,I.R., Kish,S.J., Ang,L.C., De Carli,C., Pocchiari,M., Brown,P., Gibbs,C.J., Jr., Gajdusek,D.C., Bugiani,O., Ironside,J., Tagliavini,F., and Ghetti,B. (1998). Phenotypic variability of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease is associated with prion protein heterogeneity. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **57**, 979-988.

Pocchiari,M., Salvatore,M., Cutruzzola,F., Genuardi,M., Allocatelli,C.T., Masullo,C., Macchi,G., Alema,G., Galgani,S., Xi,Y.G., and . (1993). A new point mutation of the prion protein gene in Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol.*, **34**, 802-807.

Ponce,M.L., Nomizu,M., and Kleinman,H.K. (2001). An angiogenic laminin site and its antagonist bind through the alpha(v)beta3 and alpha5beta1 integrins. *FASEB J.*, **15**, 1389-1397.

Pons,S. and Marti,E. (2000). Sonic hedgehog synergizes with the extracellular matrix protein vitronectin to induce spinal motor neuron differentiation. *Development*, **127**, 333-342.

Pons,S., Trejo,J.L., Martinez-Morales,J.R., and Marti,E. (2001). Vitronectin regulates Sonic hedgehog activity during cerebellum development through CREB phosphorylation. *Development*, **128**, 1481-1492.

Preissner,K.T. (1991). Structure and biological role of vitronectin. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **7**, 275-310.

Prusiner,S.B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, **216**, 136-144.

Prusiner,S.B. (1989). Scrapie prions. *Annu. Rev. Microbiol.*, **43**, 345-374.

Prusiner,S.B. (1998). Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **95**, 13363-13383.

Prusiner,S.B., Cochran,S.P., and Alpers,M.P. (1985). Transmission of scrapie in hamsters. *J. Infect. Dis.*, **152**, 971-978.

Prusiner,S.B., Groth,D.F., Cochran,S.P., Masiarz,F.R., McKinley,M.P., and Martinez,H.M. (1980). Molecular properties, partial purification, and assay by incubation period measurements of the hamster scrapie agent. *Biochemistry*, **19**, 4883-4891.

Prusiner,S.B., McKinley,M.P., Bowman,K.A., Bolton,D.C., Bendheim,P.E., Groth,D.F., and Glenner,G.G. (1983). Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell*, **35**, 349-358.

- Richardson,E.P., Jr. and Masters,C.L. (1995). The nosology of Creutzfeldt-Jakob disease and conditions related to the accumulation of PrP<sup>C</sup> in the nervous system. *Brain Pathol.*, **5**, 33-41.
- Riek,R., Hornemann,S., Wider,G., Billeter,M., Glockshuber,R., and Wuthrich,K. (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature*, **382**, 180-182.
- Roberts,M.S., Woods,A.J., Shaw,P.E., and Norman,J.C. (2003). ERK1 associates with alpha(v)beta 3 integrin and regulates cell spreading on vitronectin. *J. Biol. Chem.*, **278**, 1975-1985.
- Roesler,R., Walz,R., Quevedo,J., de Paris,F., Zanata,S.M., Graner,E., Izquierdo,I., Martins,V.R., and Brentani,R.R. (1999). Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP(C). *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **71**, 349-353.
- Royle,G., Deng,G., Seiffert,D., and Loskutoff,D.J. (2001). A method for defining binding sites involved in protein-protein interactions: analysis of the binding of plasminogen activator inhibitor 1 to the somatomedin domain of vitronectin. *Anal. Biochem.*, **296**, 245-253.
- Ruoslahti,E. and Pierschbacher,M.D. (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*, **238**, 491-497.
- 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., and Noda,T. (1996). Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature*, **380**, 528-531.
- Sales,N., Hassig,R., Rodolfo,K., Di Giamberardino,L., Traiffort,E., Ruat,M., Fretier,P., and Moya,K.L. (2002). Developmental expression of the cellular prion protein in elongating axons. *Eur. J. Neurosci.*, **15**, 1163-1177.
- Samaia,H.B., Mari,J.J., Vallada,H.P., Moura,R.P., Simpson,A.J., and Brentani,R.R. (1997). A prion-linked psychiatric disorder. *Nature*, **390**, 241.
- Sasaki,T. and Timpl,R. (2001). Domain IVa of laminin alpha5 chain is cell-adhesive and binds beta1 and alphaVbeta3 integrins through Arg-Gly-Asp. *FEBS Lett.*, **509**, 181-185.
- Scatchard,G. (1949). The attractions of proteins for small molecules and ions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **51**, 666-672.

- Schmitt-Ulms,G., Legname,G., Baldwin,M.A., Ball,H.L., Bradon,N., Bosque,P.J., Crossin,K.L., Edelman,G.M., DeArmond,S.J., Cohen,F.E., and Prusiner,S.B. (2001). Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. *J. Mol. Biol.*, **314**, 1209-1225.
- Schumacher,R.J., Hurst,R., Sullivan,W.P., McMahon,N.J., Toft,D.O., and Matts,R.L. (1994). ATP-dependent chaperoning activity of reticulocyte lysate. *J. Biol. Chem.*, **269**, 9493-9499.
- Schwartz,I., Seger,D., and Shaltiel,S. (1999). Vitronectin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **31**, 539-544.
- Scott,M.R., Will,R., Ironside,J., Nguyen,H.O., Tremblay,P., DeArmond,S.J., and Prusiner,S.B. (1999). Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 15137-15142.
- Seger,D., Gechtman,Z., and Shaltiel,S. (1998). Phosphorylation of vitronectin by casein kinase II. Identification of the sites and their promotion of cell adhesion and spreading. *J. Biol. Chem.*, **273**, 24805-24813.
- Seger,D., Seger,R., and Shaltiel,S. (2001). The CK2 phosphorylation of vitronectin. Promotion of cell adhesion via the alpha(v)beta 3-phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Biol. Chem.*, **276**, 16998-17006.
- Seger,D. and Shaltiel,S. (2000). Evidence showing that the two-chain form of vitronectin is produced in the liver by a selective furin cleavage. *FEBS Lett.*, **480**, 169-174.
- Seiffert,D. (1997). Constitutive and regulated expression of vitronectin. *Histol. Histopathol.*, **12**, 787-797.
- Seiffert,D. and Smith,J.W. (1997). The cell adhesion domain in plasma vitronectin is cryptic. *J. Biol. Chem.*, **272**, 13705-13710.
- Shang,M., Koshikawa,N., Schenk,S., and Quaranta,V. (2001). The LG3 module of laminin-5 harbors a binding site for integrin alpha3beta1 that promotes cell adhesion, spreading, and migration. *J. Biol. Chem.*, **276**, 33045-33053.
- Shmerling,D., Hegyi,I., Fischer,M., Blattler,T., Brandner,S., Gotz,J., Rulicke,T., Flechsig,E., Cozzio,A., von Mering,C., Hangartner,C., Aguzzi,A., and Weissmann,C. (1998). Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell*, **93**, 203-214.

Shono,T., Mochizuki,Y., Kanetake,H., and Kanda,S. (2001). Inhibition of FGF-2-mediated chemotaxis of murine brain capillary endothelial cells by cyclic RGDfv peptide through blocking the redistribution of c-Src into focal adhesions. *Exp. Cell Res.*, **268**, 169-178.

Shyng,S.L., Heuser,J.E., and Harris,D.A. (1994). A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J. Cell Biol.*, **125**, 1239-1250.

Shyng,S.L., Huber,M.T., and Harris,D.A. (1993). A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.*, **268**, 15922-15928.

Sigurdson,C.J. and Miller,M.W. (2003). Other animal prion diseases. *Br. Med. Bull.*, **66**, 199-212.

Simonic,T., Duga,S., Strumbo,B., Asselta,R., Ceciliani,F., and Ronchi,S. (2000). cDNA cloning of turtle prion protein. *FEBS Lett.*, **469**, 33-38.

Smith,D.F., Sullivan,W.P., Marion,T.N., Zaitsu,K., Madden,B., McCormick,D.J., and Toft,D.O. (1993). Identification of a 60-kilodalton stress-related protein, p60, which interacts with hsp90 and hsp70. *Mol. Cell Biol.*, **13**, 869-876.

Sonnenberg,A., Gehlsen,K.R., Aumailley,M., and Timpl,R. (1991). Isolation of alpha 6 beta 1 integrins from platelets and adherent cells by affinity chromatography on mouse laminin fragment E8 and human laminin pepsin fragment. *Exp. Cell Res.*, **197**, 234-244.

Spielhauer,C. and Schatzl,H.M. (2001). PrPC directly interacts with proteins involved in signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, **276**, 44604-44612.

Strumbo,B., Ronchi,S., Bolis,L.C., and Simonic,T. (2001). Molecular cloning of the cDNA coding for *Xenopus laevis* prion protein. *FEBS Lett.*, **508**, 170-174.

Sunyach,C., Jen,A., Deng,J., Fitzgerald,K.T., Frobert,Y., Grassi,J., McCaffrey,M.W., and Morris,R. (2003). The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *EMBO J.*, **22**, 3591-3601.

Suzuki,S., Oldberg,A., Hayman,E.G., Pierschbacher,M.D., and Ruoslahti,E. (1985). Complete amino acid sequence of human vitronectin deduced from cDNA. Similarity of cell attachment sites in vitronectin and fibronectin. *EMBO J.*, **4**, 2519-2524.

Tashiro,K., Monji,A., Yoshida,I., Hayashi,Y., Matsuda,K., Tashiro,N., and Mitsuyama,Y. (1999). An IKLLI-containing peptide derived from the laminin alpha1 chain mediating heparin-binding, cell adhesion, neurite outgrowth and

proliferation, represents a binding site for integrin alpha3beta1 and heparan sulphate proteoglycan. *Biochem. J.*, **340** ( Pt 1), 119-126.

Telling,G.C., Parchi,P., DeArmond,S.J., Cortelli,P., Montagna,P., Gabizon,R., Mastrianni,J., Lugaresi,E., Gambetti,P., and Prusiner,S.B. (1996). Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science*, **274**, 2079-2082.

Tomaselli,K.J., Hall,D.E., Flier,L.A., Gehlsen,K.R., Turner,D.C., Carbonetto,S., and Reichardt,L.F. (1990). A neuronal cell line (PC12) expresses two beta 1-class integrins-alpha 1 beta 1 and alpha 3 beta 1-that recognize different neurite outgrowth-promoting domains in laminin. *Neuron*, **5**, 651-662.

Tomaselli,K.J., Neugebauer,K.M., Bixby,J.L., Lilien,J., and Reichardt,L.F. (1988). N-cadherin and integrins: two receptor systems that mediate neuronal process outgrowth on astrocyte surfaces. *Neuron*, **1**, 33-43.

Turk,E., Teplow,D.B., Hood,L.E., and Prusiner,S.B. (1988). Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. *Eur. J. Biochem.*, **176**, 21-30.

Vassallo,N. and Herms,J. (2003). Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. *J. Neurochem.*, **86**, 538-544.

Vincent,B., Paitel,E., Saftig,P., Frobert,Y., Hartmann,D., De Strooper,B., Grassi,J., Lopez-Perez,E., and Checler,F. (2001). The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *J. Biol. Chem.*, **276**, 37743-37746.

Walker,D.G. and McGeer,P.L. (1998). Vitronectin expression in Purkinje cells in the human cerebellum. *Neurosci. Lett.*, **251**, 109-112.

Walz,R., Amaral,O.B., Rockenbach,I.C., Roesler,R., Izquierdo,I., Cavalheiro,E.A., Martins,V.R., and Brentani,R.R. (1999). Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. *Epilepsia*, **40**, 1679-1682.

Warner,R.G., Hundt,C., Weiss,S., and Turnbull,J.E. (2002). Identification of the heparan sulfate binding sites in the cellular prion protein. *J. Biol. Chem.*, **277**, 18421-18430.

Watarai,M., Kim,S., Erdenebaatar,J., Makino,S., Horiuchi,M., Shirahata,T., Sakaguchi,S., and Katamine,S. (2003). Cellular prion protein promotes Brucella infection into macrophages. *J. Exp. Med.*, **198**, 5-17.

- Wells,G.A., Scott,A.C., Johnson,C.T., Gunning,R.F., Hancock,R.D., Jeffrey,M., Dawson,M., and Bradley,R. (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.*, **121**, 419-420.
- Wells,G.A. and Wilesmith,J.W. (1995). The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. *Brain Pathol.*, **5**, 91-103.
- Wiksten,M., Liebkind,R., Laatikainen,T., and Liesi,P. (2003). Gamma 1 laminin and its biologically active KDI-domain may guide axons in the floor plate of human embryonic spinal cord. *J. Neurosci. Res.*, **71**, 338-352.
- Wilesmith,J.W., Ryan,J.B., and Atkinson,M.J. (1991). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet. Rec.*, **128**, 199-203.
- Will,R.G. (2003). Acquired prion disease: iatrogenic CJD, variant CJD, kuru. *Br. Med. Bull.*, **66**, 255-265.
- Will,R.G., Ironside,J.W., Zeidler,M., Cousens,S.N., Estibeiro,K., Alperovitch,A., Poser,S., Pocchiari,M., Hofman,A., and Smith,P.G. (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*, **347**, 921-925.
- Wyatt,J.M., Pearson,G.R., Smerdon,T.N., Gruffydd-Jones,T.J., Wells,G.A., and Wilesmith,J.W. (1991). Naturally occurring scrapie-like spongiform encephalopathy in five domestic cats. *Vet. Rec.*, **129**, 233-236.
- Xu,D., Baburaj,K., Peterson,C.B., and Xu,Y. (2001). Model for the three-dimensional structure of vitronectin: predictions for the multi-domain protein from threading and docking. *Proteins*, **44**, 312-320.
- Yamada,M., Itoh,Y., Fujigasaki,H., Naruse,S., Kaneko,K., Kitamoto,T., Tateishi,J., Otomo,E., Hayakawa,M., Tanaka,J., and . (1993). A missense mutation at codon 105 with codon 129 polymorphism of the prion protein gene in a new variant of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *Neurology*, **43**, 2723-2724.
- Yip,P.M. and Siu,C.H. (2001). PC12 cells utilize the homophilic binding site of L1 for cell-cell adhesion but L1-alpha5beta3 interaction for neurite outgrowth. *J. Neurochem.*, **76**, 1552-1564.
- Zanata,S.M., Lopes,M.H., Mercadante,A.F., Hajj,G.N., Chiarini,L.B., Nomizo,R., Freitas,A.R., Cabral,A.L., Lee,K.S., Juliano,M.A., de Oliveira,E., Jachieri,S.G., Burlingame,A., Huang,L., Linden,R., Brentani,R.R., and Martins,V.R. (2002). Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J.*, **21**, 3307-3316.

Zheng,X., Saunders,T.L., Camper,S.A., Samuelson,L.C., and Ginsburg,D. (1995). Vitronectin is not essential for normal mammalian development and fertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **92**, 12426-12430.

Zhou,A., Huntington,J.A., Pannu,N.S., Carrell,R.W., and Read,R.J. (2003). How vitronectin binds PAI-1 to modulate fibrinolysis and cell migration. *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 541-544.

Zhuang,P., Blackburn,M.N., and Peterson,C.B. (1996a). Characterization of the denaturation and renaturation of human plasma vitronectin. I. Biophysical characterization of protein unfolding and multimerization. *J. Biol. Chem.*, **271**, 14323-14332.

Zhuang,P., Li,H., Williams,J.G., Wagner,N.V., Seiffert,D., and Peterson,C.B. (1996b). Characterization of the denaturation and renaturation of human plasma vitronectin. II. Investigation into the mechanism of formation of multimers. *J. Biol. Chem.*, **271**, 14333-14343.