

Fabiana Andrade Caetano

Estudo dos ligantes da proteína prion celular com ênfase em stress inducible protein 1: modificação pós-traducional, tráfego e sinalização.

**Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular
2010**

Fabiana Andrade Caetano

**Estudo dos ligantes da proteína prion celular com ênfase
em stress inducible protein 1: modificação pós-
traducional, tráfego e sinalização.**

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação
em Farmacologia Bioquímica e Molecular da
Faculdade de Medicina da Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito parcial
da obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Marco Antônio Máximo Prado
Co-Orientador: Vânia Ferreira Prado

**Belo Horizonte
Setembro 2010**

*“Com sabedoria se constrói a casa, e com discernimento se consolida.
Pelo conhecimento os seus cômodos se enchem do que é precioso e
agradável. O homem sábio é poderoso, e quem tem conhecimento
aumenta a sua força”. Provérbios 24:4-5*

Dedico esta tese...

À minha família, que com muito amor e sacrifício contribuiu para que este sonho se tornasse uma realidade.

Agradecimentos

Em primeiríssimo lugar eu agradeço a Deus, que sempre faz “infinitamente mais do que pedimos ou pensamos”.

Ao meu orientador Marcão, que realmente me guiou nestes 5 anos de pesquisa, acompanhando ativamente cada projeto e me incentivando a fazer sempre o melhor trabalho. Marcão, você tem sido muito importante para o meu crescimento científico. Muito obrigada por tudo!

A minha co-orientadora Vânia, que sempre foi tão prestativa comigo. Muito obrigada por todo ensinamento e pela sua dedicação.

Aos professores Marcus Vinícius e Luíz Armando que estão sempre prontos pra resolver qualquer problema.

A Sônia por toda ajuda com as papeladas do curso.

A Dra. Vilma Martins, uma simpatia de pessoa, que é uma inspiração científica e pessoal pra mim. Muito obrigada pelos conselhos e milhões de cartas de recomendação!

A todo o pessoal do Instituto Ludwig: Marilene, Gláucia, Camila, Cleiton, Michelle, Nicolle, Tiago, que contribuíram muito para esse trabalho.

A todo o pessoal do neurofar: Luciene, Alessandra, Célio, Bráulio, Lucimar, Grace, Danuza, Diogo, Ana Pinheiro, Monalize, Mariele, Bruno, Cíntia, Bruno Rezende, Dani, Renan, Nancy, Rita (me perdoem se eu me esqueci de alguém).

A todos do laboratório do professor Marco Aurélio e Luiz Armando.

A nossa querida técnica Adriana. Dri, sem você a vida é difícil viu!

A minha querida aluna de iniciação científica Mônica. Mônica adorei trabalhar com você. Você é uma garota muito dedicada, inteligente e um doce!

Um agradecimento especial as minhas amigas Iacizinha, Ivaninha, Crica, Cristiane e Aninha. Meninas, vocês são muito mais do que companheiras de trabalho, vocês são minhas irmãs de coração. Amo vocês! Obrigada por tudo!

Um agradecimento especial aos meus amigos Flávio e Xavier. Muito obrigada pela ajuda científica e sobretudo pelos ótimos momentos e gargalhadas no laboratório.

Ao André Guimarães por todo esforço, ajuda e pela boa convivência.

Às técnicas Sanda e Jue por toda ajuda no laboratório e pela amizade.

Aos colegas Ash, Aline, Enéas e 'Raul' pela boa convivência e amizade.

Ao Dr. Ferguson e todos do seu laboratório pelo suporte científico, em especial Lianne por toda ajuda com os microscópios.

A Dra. Jane Rylett e a técnica Daisy por fornecer o peptídeo Abeta.

Ao Ricardo, grande companheiro e conselheiro. Obrigada por todo suporte durante meu mestrado e boa parte do meu doutorado. Você é muito especial!

Aos meus pais queridos Angela e Francisco e meu irmãozinho Felipe. Obrigada por todo apoio e amor. Amo vocês pra sempre!!

A todos os meus primos (em especial Juninho, Jefferson, Laiane, Laíse, Fabíola e Priscila) que sempre acreditaram no meu potencial e me apoiaram.

Aos meus avós e a todos os meus tios (em especial tia Rosa e tio Chaves, que sempre me apoiaram quando estive no exterior) por toda paciência e compreensão.

Ao meu querido Andrew, pela força, carinho, amor, compreensão e incentivo. Andrew obrigada por toda paciência por todo suporte no final da minha tese. Você é um anjo na minha vida. Amo você pra sempre!

Às minhas queridas amigas Angélica, Adriana, Kellen, Marcela e Sabrina. Vocês sempre compreenderam minha ausência e sempre me apoiaram. Obrigada!

A Universidade Federal de Minas Gerais e CNPq que financiaram este trabalho.

Enfim a todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para que esta tese se transformasse em realidade.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Neurofarmacologia do ICB-UFMG com o auxílio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)
- Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX)
- Instituto do Milênio (Projeto Toxinas)
- FINEP
- PrioNet-Canada

Parte deste trabalho foi desenvolvido em colaboração com a Dra. Vilma R. Martins do Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer, em São Paulo.

Parte deste trabalho também foi desenvolvido no Instituto de Pesquisa Roberts, Universidade Western Ontário – Canada.

Informações Importantes aos leitores

Durante o desenvolvimento deste trabalho, diferentes conteúdos foram abordados. Por isso, esta tese foi escrita em dois capítulos. No capítulo I, novas funções intracelulares do ligante da proteína prion celular (PrP^C), STI1, foram discutidas. Tendo em vista que os resultados apresentados neste capítulo ainda não foram publicados, os itens Materiais e Métodos e Resultados foram completamente descritos. No segundo capítulo deste trabalho o enfoque foi dado sobre a importância do tráfego da proteína prion celular sobre a sinalização mediada por sua interação com STI1. Além disso outros ligantes que alteram o tráfego de PrP^C foram descritos. Neste capítulo, como a maior parte dos resultados já foram publicados ou submetidos à publicação, os artigos correspondentes foram apresentados como resultados, acrescentando-se apenas os resultados adicionais que não foram publicados. Da mesma forma o item Materiais e Métodos se resume àqueles não descritos nas publicações.

Sumário

| | |
|--|----|
| Conteúdo | |
| LISTA DE ABREVIATURAS | I |
| LISTA DE FIGURAS E TABELAS | IV |
| RESUMO | 1 |
| ABSTRACT | 3 |
| 1 INTRODUÇÃO | 5 |
| 1.1 STRESS INDUCIBLE PROTEIN1 | 5 |
| 1.2 MECANISMOS DE SECREÇÃO | 7 |
| 1.3 A VIA DE SUMOILAÇÃO | 10 |
| 1.4 COMPONENTES DA VIA DE SUMOILAÇÃO | 14 |
| 1.5 PROTEÍNAS PIAS | 16 |
| 1.6 PROTEÍNA POLICOMB 2 – Pc2 | 18 |
| 1.7 MECANISMOS QUE REGULAM A SUMOILAÇÃO | 20 |
| 1.7.1 CHOQUE TÉRMICO | 20 |
| 1.7.2 DANO AO DNA POR IRRADIAÇÃO | 22 |
| 2 MATERIAIS E MÉTODOS | 25 |
| 2.1 CONSTRUÇÕES | 25 |
| 2.2 CULTURA DE CÉLULAS | 25 |
| 2.3 CULTURA DE ASTRÓCITOS | 26 |
| 2.4 TRANSFEÇÃO | 26 |
| 2.5 CO-IMUNOPRECIPITAÇÃO | 27 |
| 2.6 AVALIAÇÃO DAS FRAÇÕES NUCLEARES E CITOPLASMÁTICAS | 28 |
| 2.7 IMUNOFLUORESCÊNCIA | 29 |
| 2.8 ANTICORPOS | 29 |
| 2.9 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS EM EXTRATOS DE CÉREBRO DE CAMUNDONGO | 31 |
| 2.10 ENSAIO DE CHOQUE TÉRMICO | 31 |
| 2.11 ENSAIO DE DANO AO DNA POR IRRADIAÇÃO | 31 |
| 2.12 AQUISIÇÃO DE IMAGENS | 32 |
| 2.13 ANÁLISE DAS IMAGENS | 32 |
| 2.14 QUANTIFICAÇÕES | 32 |
| 2.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 33 |
| 3 OBJETIVOS | 34 |
| 4 RESULTADOS | 35 |
| 4.1 CONFIRMAÇÃO DAS INTERAÇÕES DETECTADAS NA VARREDURA DE DUPLO HÍBRIDO | 35 |

| | |
|--|-----|
| 4.2 STI1 E AS PROTEÍNAS SUMO | 38 |
| 4.3 STI1 e Ubc9 | 41 |
| 4.4 STI1 e PIAS | 43 |
| 4.5 STI1 e Pc2..... | 49 |
| 4.6 FRACIONAMENTO SUBCELULAR..... | 49 |
| 4.7 INFLUÊNCIA DA SUMOILAÇÃO DE STI1 EM ASTRÓCITOS | 54 |
| 4.8 STI1 E OS CORPOS PML | 62 |
| 4.9 STI1 E CHOQUE TÉRMICO | 64 |
| 4.10 STI1 E DANO AO DNA | 68 |
| 5 DISCUSSÃO | 72 |
| 6 INTRODUÇÃO | 81 |
| 6.1 PRIONS | 81 |
| 6.2 PROTEÍNA PRION CELULAR (PrP ^C) | 82 |
| 6.3 FUNÇÕES DA PROTEÍNA PRION CELULAR | 86 |
| 6.4 STI1 COMO LIGANTE DE PrP ^C | 90 |
| 6.5 PROTEÍNA RELACIONADA AO RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE..... | 92 |
| 6.6 PEPTÍDEOS A β -AMILÓIDES, DOENÇAS PRIÔNICAS E DOENÇA DE ALZHEIMER | 93 |
| 6.7 TRÁFEGO E SINALIZAÇÃO..... | 95 |
| 6.8 INTERNALIZAÇÃO DE PROTEÍNAS | 96 |
| 6.9 TRÁFEGO DE PROTEÍNAS APÓS ENDOCITOSE | 100 |
| 6.10 INTERNALIZAÇÃO E TRÁFEGO DE PrP ^C E PrP ^{Sc} | 106 |
| 7 MATERIAIS E MÉTODOS | 110 |
| 7.1 CONSTRUÇÕES..... | 110 |
| 7.2 DESENVOLVIMENTO DAS LINHAGENS ESTAVELMENTE TRANSFECTADAS | 111 |
| 7.3 PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS PARA SELEÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO | 112 |
| 7.4 PREPARO DA STI1 | 113 |
| 7.5 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS E <i>WESTERN BLOTTING</i> | 113 |
| 7.6 ANÁLISE DA ENDOCITOSE DE STI1 NA PRESENÇA DE AP180-C | 115 |
| 7.7 ANÁLISE DA ENDOCITOSE DE STI1 NA PRESENÇA DE METIL- β -CICLODEXTRINA | 115 |
| 7.8 ANÁLISE DA INTERAÇÃO DE AP180-C E MARCADORES DE LÍPIDE <i>RAFTS</i> .. | 115 |
| 7.9 ENSAIO DE ATIVAÇÃO DE MAP KINASE | 116 |
| 7.9.1 DINAMINA WT, DINAMINA K44A E AP180-C..... | 116 |
| 7.9.2 RAP..... | 116 |

| | |
|--|-----|
| 7.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR LRP1..... | 117 |
| 7.11 MARCAÇÃO DOS ANTICORPOS PRIMÁRIOS COM ZENON..... | 117 |
| 7.12 QUANTIFICAÇÕES..... | 117 |
| 8 OBJETIVOS | 119 |
| 9 RESULTADOS..... | 120 |
| 9.1 ENDOCYTOSIS OF PRION PROTEIN IS REQUIRED FOR ERK1/2 SIGNALING INDUCED BY STRESS-INDUCIBLE PROTEIN 1 | 120 |
| 9.2 ENDOCITOSE DE STI1 E SINALIZAÇÃO..... | 135 |
| 9.3 ENVOLVIMENTO DE LRP1 NA SINALIZAÇÃO MEDIADA PELA INTERAÇÃO STI1-PrP ^C | 142 |
| 9.4 AMYLOID-BETA INCREASES THE LOCALIZATION OF PRION PROTEIN AT THE CELL SURFACE..... | 145 |
| 10 DISCUSSÃO | 190 |
| 11 CONCLUSÕES | 199 |
| 12 ANEXOS | 201 |
| ANEXO 1 – SUMOilação <i>in vitro</i> de STI1 | 201 |
| ANEXO 2 – SUMOilação de STI1 em células de mamíferos..... | 202 |
| ANEXO 3 – Caracterização de PIAS1 como E3 ligase para STI1 | 203 |
| ANEXO 4 – Avaliação da SUMOilação de STI1 após estresse genotóxico | 204 |
| ANEXO 5 – Lista do material disponível no cd que acompanha a tese | 205 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------|---|
| aa | Aminoácidos |
| AD | Doença de Alzheimer |
| AF | Alexa Fluor |
| AP | Proteína adaptadora |
| APP | Proteína precursora amilóide |
| ATM | Cinase “Ataxia Telangiectasia mutated” |
| ATR | Cinase relacionada a ATM e Rad3 |
| cAMP | Adenosina Monofosfato cíclico |
| CCV | Vesículas cobertas por Clatrina |
| Cdc2 | Caseína Cinase II de divisão celular |
| CJD | Creutzfeldt-Jakob Disease |
| CKII | Caseína Cinase II |
| COPI | Complexo de revestimento protéico I |
| COPII | Complexo de revestimento protéico II |
| CTxB | Subunidade B da Cholera Toxina |
| DMEM | <i>Dulbecco’s Modified Eagle Medium</i> |
| DSB | <i>Double Strand Break</i> |
| ECM | Componentes da matrix extracelular |
| ED | Endosoma de Distribuição |
| EDTA | Ácido etileno diaminotetracético |
| ER | Endosoma de Reciclagem |
| ERK | Cinase regulada por sinal extracelular |
| ET | Endosoma Tardio |
| FFI | <i>Fatal Familial Insomnia</i> |
| GFP | Proteína fluorescente verde |
| GPCR | Receptores acoplados à proteína G |
| GPI | Glicosil-fosfatidilinositol |
| GSS | Gertmann-Straussler Syndrome |

| | |
|-------------------|---|
| HIPK2 | <i>Homeodomain Interacting Protein Kinase 2</i> |
| Hop | <i>Human Heat Shock cognate Protein</i> |
| HS | Choque Térmico |
| HSP70 | Proteína de Choque Térmico de 70 kDa |
| HSP90 | Proteína de Choque Térmico de 90 kD |
| kDa | kiloDalton |
| kvp | <i>Kilovoltage Peak</i> |
| LRP1 | Proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade |
| LTP | Potenciação a longo termo |
| MAPK | Proteína Cinase Ativada por Mitógenos |
| MVBs | Corpos Multivesiculares |
| NCAM | Molécula de adesão celular neuronal |
| NGF | Fator de Crescimento Nervoso |
| NHEJ | Recombinação não homóloga “end-joining” |
| NLS | Peptídeo sinal de localização nuclear |
| PBS | <i>Phosphate-buffered Solution</i> |
| Pc2 | Proteína Policomb 2 |
| PDGF | Fator de crescimento derivado de plaquetas |
| pH | Potencial de hidrogênio |
| PIAS | Proteínas Inibidoras de STAT ativada |
| PK | Proteinase K |
| PKA | Proteína Cinase dependente de AMP cíclico |
| PKC | Proteína Cinase C |
| PML | Proteína <i>Pro-Myelocytic Leukaemia</i> |
| PRNP | Gene que codifica para a proteína prion celular |
| PRION | Partícula infecciosa proteinácea |
| PrP ^c | Proteína prion celular |
| PrP ^{sc} | Proteína prion scrapie |
| RE | Retículo endoplasmático |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |

| | |
|--------------|---|
| rpm | Rotações por minuto |
| SDS – PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| SENP | Proteases específicas para SUMO |
| SIM | Sítios de ligação não covalente a SUMO |
| SNC | Sistema nervoso central |
| SNARE | <i>N-ethylmaleimide-sensitive fusion proteins (NSF) accessory proteins (SNAP) receptors</i> |
| STAT | Transdutor de sinal e ativador da transcrição |
| SUMO | <i>Small ubiquitin related modifier</i> |
| STI-1 | <i>Stress Inducible Protein 1</i> |
| TBS | Tris-Buffered Saline |
| TGF- β | Fator de Crescimento Transformante β |
| TGN | Rede Trans-Golgi |
| TPR | Tricopeptídeos Repetidos |
| Trk | Receptores de Cinases relacionados à tropomiosina |
| TSE | Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis |
| uPAR | Receptor urokinase de plasminogênio ativado |
| vCJD | Nova variante da doença de Creutzfeld-Jakob |

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

| | |
|---|-----|
| Figura 1: Domínios estruturais da STI-1. | 6 |
| Figura 2 – Secreção não-convencional de proteínas citoplasmáticas solúveis. | 10 |
| Figura 3: A via de SUMOilação. | 13 |
| Figura 4: Confirmação da interação de STI1 com proteínas da via de SUMOilação em célula de mamíferos. | 36 |
| Figura 5: Avaliação da expressão de STI1 e seus ligantes em diferentes regiões do cérebro de camundongos. | 38 |
| Figura 6: Avaliação da distribuição intracelular de STI1 na presença de SUMO1 e SUMO3. | 40 |
| Figura 7: : Ubc9 não altera a distribuição intracelular de STI1. | 42 |
| Figura 8: Alteração na distribuição intracelular de STI1 induzida por PIAS1. | 46 |
| Figura 9: Avaliação da distribuição intracelular de STI1 na presença de PIASy. | 48 |
| Figura 10: Avaliação da distribuição celular de STI1 na presença de Pc2. | 50 |
| Figura 11: Avaliação da distribuição intracelular de STI1 por fracionamento celular na presença de SUMO1. | 51 |
| Figura 12: Avaliação da distribuição intracelular de STI1 por fracionamento celular na presença de SUMO3. | 52 |
| Figura 13: Distribuição intracelular de STI1-YFP em astrócitos na presença de componentes da via se SUMOilação. | 56 |
| Figura 14: Distribuição intracelular de STI1 endógena em astrócitos na presença de componentes da via se SUMOilação. | 58 |
| Figura 15: Ubc9 não altera a distribuição intracelular de STI1 endógena em astrócitos. | 58 |
| Figura 16: PIAS1 altera a distribuição intracelular de STI1 mas não de PrP ^C | 60 |
| Figura 17: Proteínas da via de SUMOilação não alteram a distribuição intracelular de PrP ^C | 61 |
| Figura 18: STI1 endógena é direcionada para os corpos PML. | 64 |
| Figura 19: Choque Térmico não altera distribuição intracelular de STI1. | 66 |
| Figura 20: SUMO1 e SUMO3 não alteram a distribuição intracelular de STI1 após Choque Térmico. | 68 |
| Figura 21: Choque Térmico não altera distribuição intracelular de PrP ^C | 69 |
| Figura 22: Dano no DNA induz tranlocamento de STI1 para o núcleo. | 71 |
| Figura 23: Estrutura primária da proteína PrP ^C | 85 |
| Figura 24: Processos fisiológicos mediados por PrP ^C | 86 |
| Figura 25: Ligantes da proteína prion celular. | 89 |
| Figura 26: Endocitose pela via clássica. | 104 |
| Figura 27: Vias de endocitose independentes de clatrina. | 105 |
| Figura 28- Endocitose de PrP ^C e STI1 é inibida por AP180-C. | 136 |

| | |
|--|-----|
| Figura 29: AP180-C altera a distribuição celular de Clatrina e também dos marcadores de lípide <i>Rafts</i> | 138 |
| Figura 30: Endocitose de STI1 é dependente de lípidos. | 140 |
| Figura 31 – Avaliação da ativação de ERK1/2 dependente de STI1- PrP ^C na presença de bloqueadores da endocitose. | 141 |
| Figura 32 – Avaliação da expressão endógena de LRP1. | 143 |
| Figura 33 – Avaliação da ativação de ERK1/2 dependente de STI1- PrP ^C na presença de RAP. | 144 |
| | |
| Tabela 1 – Proteínas identificadas como ligantes de STI1 através do ensaio de duplo híbrido em leveduras (Soares et al., manuscrito em preparação). | 12 |
| Tabela 2: Construções | 25 |
| Tabela 3: Anticorpos utilizados | 30 |
| Tabela 4: Comprimento de onda de absorção e emissão dos marcadores fluorescentes utilizados. | 32 |
| Tabela 5: Construções utilizadas nos experimentos de tráfego e sinalização..... | 110 |
| Tabela 6: Anticorpos utilizados | 114 |

RESUMO

A proteína prion celular (PrP^C) constitui uma plataforma na membrana plasmática capaz de interagir com diversos ligantes mediando a reunião de complexos de sinalização na superfície celular. Um dos ligantes mais bem descritos para PrP^C é a co-chaperonina Stress Inducible Protein1 ou STI1. STI1 é secretada por astrócitos e interage com PrP^C na superfície neuronal induzindo neuritogênese e neuroproteção por ativação de vias de sinalização diferentes. Embora pouco se saiba sobre os mecanismos de secreção de STI1, acredita-se que este processo é fundamental na regulação das funções neurotróficas medidas pela interação STI1-PrP^C. A STI1 intracelular tem papel importante na reunião do complexo Hsp70-Hsp90 sendo portanto, considerada uma proteína com funções intra e extracelulares. Na tentativa de elucidarmos mecanismos envolvidos com as funções de STI1, novos ligantes de STI1 foram identificados em um ensaio de duplo híbrido. Dentre os principais ligantes, estão as proteínas da via de SUMOilação, cujas interações de STI1 com os componentes desta via foram confirmadas neste trabalho. Nós mostramos que STI1 é SUMOilada por SUMO1 e SUMO3, sendo PIAS1 a E3 ligase específica para este processo. A interação de STI1 com PIAS1 e SUMO3 levou ao aumento da localização nuclear de STI1. Uma vez no núcleo, STI1 foi direcionada para os corpos PML (do inglês *Pro-Myelocytic Leukaemia*), de forma dependente de PIAS1, onde se co-localizou com SUMO1 e SUMO3. O estresse celular por Choque Térmico não induziu alterações na distribuição celular de STI1, mesmo quando as proteínas da via de SUMOilação foram co-expressas. Por outro lado, nós mostramos que o dano no DNA por irradiação ionizante induziu a translocação de STI1 para o núcleo, onde ela se co-localizou parcialmente com os *Foci*. Em conjunto os nossos resultados mostram que STI1 é preferencialmente modificada por SUMO3 e PIAS1. O seu direcionamento para os corpos PML, mediado por PIAS1, e translocação nuclear induzido por estresse genotóxico sugerem o envolvimento de STI1 na via de reparo ao DNA. Tendo em vista a alteração na distribuição celular induzida pela sua interação com as proteínas da via de SUMOilação, novos estudos estão sendo realizados para avaliar o papel desta via sobre a secreção de STI1.

Em relação ao contexto extracelular, nós mostramos que STI1 ao se ligar a PrP^C na membrana induz a internalização desta última proteína. A internalização de PrP^C foi fundamental para a regulação da ativação de ERK1/2, mas não de PKA, induzida pela sua interação com STI1. STI1 também foi endocitada, de forma independente da presença de PrP^C. Através de microscopia em tempo real, utilizando marcadores de vias endocíticas, nós mostramos que STI1 é internalizada por duas vias: parte de STI1 é internalizada por vias dependentes de lípide *rafts*, enquanto uma segunda fração é internalizada pela via clássica, dependente de clatrina. Uma vez internalizada STI1 segue uma via intracelular distinta daquela vista para PrP^C, sendo diretamente direcionada para vesículas ácidas sem passar pelos endosomas primários. Imagens em tempo real de células transfectadas com GFP-PrP^C, perfundidas com STI1 fluorescente, confirmaram a natureza transiente da interação entre estas proteínas na membrana celular e em vesículas, sugerindo que o tráfego de PrP^C induzido por STI1 regula a duração da sinalização mediada por estas proteínas. O uso de bloqueadores da endocitose (K44A e AP180-C) permitiu a visualização de forte co-localização entre estas proteínas na membrana plasmática. A endocitose de PrP^C ocorre via a ligação com o receptor transmembrana LRP1, que dirige PrP^C para vesículas cobertas com clatrina. Utilizando o ligante de LRP1, RAP, nós mostramos o bloqueio da ativação de ERK1/2 induzida pela interação STI1-PrP^C. Este resultado sugere que LRP1 seja a ponte que conecta o estímulo extracelular com as vias de sinalização intracelulares, através da sua participação na endocitose de PrP^C. Ainda explorando a internalização de PrP^C, nós também mostramos que os oligômeros A β alteram o seu tráfego. Porém, ao contrário de STI1, A β induziu um aumento de PrP^C na superfície celular. Futuros experimentos serão necessários para revelar a implicação deste resultado nos efeitos neurotóxicos mediados pela interação A β -PrP^C. Concluindo, os nossos resultados mostram que STI1 exerce vários papéis na regulação do sistema nervoso. Além disso, o tráfego de PrP^C parece ser um mecanismo dinâmico que pode ser rapidamente regulado por uma série de ligantes para modular o funcionamento do sistema nervoso. Esses resultados sugerem que STI1 e PrP^C tem papéis não antecipados na função neuronal.

ABSTRACT

The cellular prion protein (PrP^C) is a dynamic platform for the assembly of signalling modules at the cell surface. One of the best described ligand of PrP^C is the co-chaperonine Stress Inducible Protein1 or STI1. This protein is secreted by astrocytes and interacts with PrP^C at neuronal surface inducing neuritogeneses and neuroprotection through different signaling pathways. Although the mechanisms underlying STI1 secretion are still poorly understood, it is believed that this process is important for modulation of neurotrophic functions mediated by STI1-PrP^C interaction. The intracellular STI1 also has an important role in the assembly of HSP70-HSP90 complex. Therefore, STI1 is considered a protein with intra and extracellular functions. To further investigate the mechanisms involved with STI1 functions, new ligands were identified in a yeast two hybrid screening. Amongst them, we found several proteins involved with the SUMOylation pathway, whose interaction with STI1 were confirmed in this work. We have shown that STI1 is SUMOylated by SUMO1 and SUMO3, and PIAS1 is the specific E3 SUMO ligase for this process. The interaction between STI1 and PIAS1 or SUMO3 promoted an increase in the nuclear localization of STI1. Once in the nucleus, STI1 was directed to PML bodies (Pro Myelocytic Leukaemia bodies) in a PIAS1 dependent process. In these structures STI1 was observed co-localized with SUMO1 and SUMO3. The cellular stress by Heat Shock did not induce alterations on STI1 intracellular distribution, even when proteins from the SUMOylation pathway were over expressed. On the other hand, we showed that the DNA damage by ionizing irradiation induced the translocation of STI1 to the nucleus, where this protein partly co-localizes with Foci. Combined, our results show that STI1 is preferentially modified by SUMO3 and PIAS1. STI1 targeting to PML bodies mediated by PIAS1 and nuclear translocation induced by genotoxic stress strongly suggest its participation in the DNA repair pathway. Considering the alteration in STI1 intracellular distribution induced by proteins from the SUMOylation pathway, new experiments are being performed to better evaluate the involvement of this pathway in STI1 secretion.

In relation to the role of STI1 in the extracellular environment, we have shown that STI1 binds to PrP^C at the cell surface and induces its internalization. This process was specific and critical for regulation of ERK1/2, but not PKA activation,

which is mediated by STI1-PrP^C interaction. STI1 was also internalized by cells in a PrP^C-independent way. Using real-time microscopy and several endocytic markers, we showed that STI1 is internalized by two main pathways: part of STI1 is endocited through a lipid raft-dependent pathway, whereas another fraction is internalized via a clathrin-mediated pathway. Once internalized, STI1 takes a distinct intracellular route from that described for PrP^C. STI1 is directed to acidic vesicles bypassing early endosomes. Real time images of GFP-PrP^C transfected cells perfused with fluorescent STI1 showed that the interaction between these proteins at the cell surface and in vesicles has a transient nature, suggesting that the trafficking of STI1 regulates the duration of signalling through PrP^C. By using endocytosis inhibitors (dynamin K44A and AP180-C), we were able to visualize strong co-localization between STI1 and PrP^C at the plasmatic membrane. PrP^C endocytosis occurs through interaction with the membrane receptor LRP1. We used the LRP1 ligand RAP to block its interaction with PrP^C. We noticed the block of the ERK1/2 activation mediated by STI1-PrP^C interaction in cells treated with RAP. This result suggests that LRP1 can be part of the transmembrane complex connecting the extracellular stimulus with the intracellular signalling. A β peptides are the major culprits in Alzheimer's disease and have recently been shown to bind to PrP^C. We examined if A β oligomers affected PrP^C trafficking. We find that in contrast to the STI1 effect, A β induced an increase in PrP^C at cell surface, by blocking the constitutive endocytosis of PrP^C. New experiments will be necessary to elucidate the implication of this result upon neurotoxicity mediated by A β peptides. In conclusion, our results show that STI1 has different roles in regulation of CNS. Moreover, PrP^C trafficking seems to be a dynamic mechanism which can be quickly regulated by several ligands to modulate neuronal homeostasis. These results suggest that STI1 and PrP^C have unanticipated roles in neuronal function.

1 INTRODUÇÃO

1.1 STRESS INDUCIBLE PROTEIN1

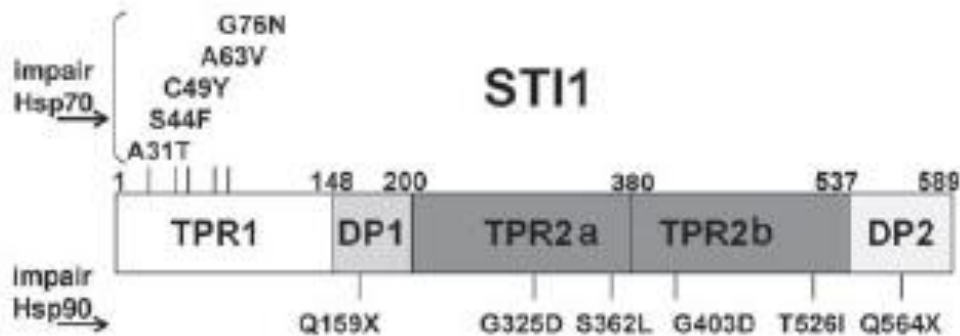
A STI1 é uma co-chaperona homóloga à proteína organizadora da HSP70 e HSP90 -(Hop)- em humanos, envolvida no enovelamento de proteínas recém sintetizadas. Esta proteína foi primeiro identificada em leveduras durante um screening para proteínas envolvidas na resposta ao estresse por Choque térmico (Nicolet and Craig, 1989).

Estruturalmente, STI1 é formada por motivos TPRs (domínios ricos em tetratricopeptídeos repetidos) e motivos contendo resíduos conservados de aspartato e prolina chamados domínios DP. Os motivos TPRs são domínios formados por sequências repetidas de 34 aminoácidos degenerados, presentes em um grande número de proteínas (Young et al., 2004). Proteínas que contêm motivos TPR participam do controle do ciclo celular, transcrição, auxiliam na conformação, transporte e translocação protéica, transdução de sinal, metabolismo de glicose, liberação de neurotransmissor e “splicing” de RNA (Das et al., 1998; Blatch and Lasse, 1999). Estudos de modelagem e cristalografia revelaram que a STI1 humana contém 9 sequências tipo TPR arranjados em três domínios os quais foram denominados TPR1, TPR2A e TPR2B, sendo que cada um compreende três regiões TPR (Scheufler et al., 2000; van der et al., 2000). HSP70 e HSP90 interagem respectivamente, nas regiões N-terminal e C-terminal de STI1, através dos motivos TPR1 (para HSP70) e TPR2A (para HSP90, Fig. 1A).

Além destes domínios a STI1/Hop contém regiões menores onde são encontrados resíduos conservados de aspartato e prolina adjacentes a TPR1 (designado DP1) e a TPR2B (designado DP2) (Fig. 1A). Estes domínios estão envolvidos na regulação da atividade de HSP70 e HSP90 e na ativação de receptores esteróides (Young et al., 2004). Também foi identificado um peptídeo sinal de localização nuclear (NLS), que está localizado no mesmo domínio de ligação à HSP90 – o domínio TRP2A (Longshaw et al., 2004). Imediatamente adjacente a NLS, foram também identificados dois potenciais sítios de fosforilação: um para caseína Cinase II (CKII, S189) e um para a Cinase 2 de divisão celular (cdc2, T198) (Longshaw et al., 2000).

O gene que codifica STI1 em humanos encontra-se no cromossomo 11q13.1 e este contém 14 exons (Fig 1B). Já em murinos este gene está localizado no cromossomo 19, também contendo 14 exons. O transcrito de STI1 humano, assim como o murino, contém aproximadamente 2,079 pares de bases que codificam uma sequência de 543 aminoácidos resultando em uma proteína de massa molecular de 66 KDa (Fig 1B).

A



B

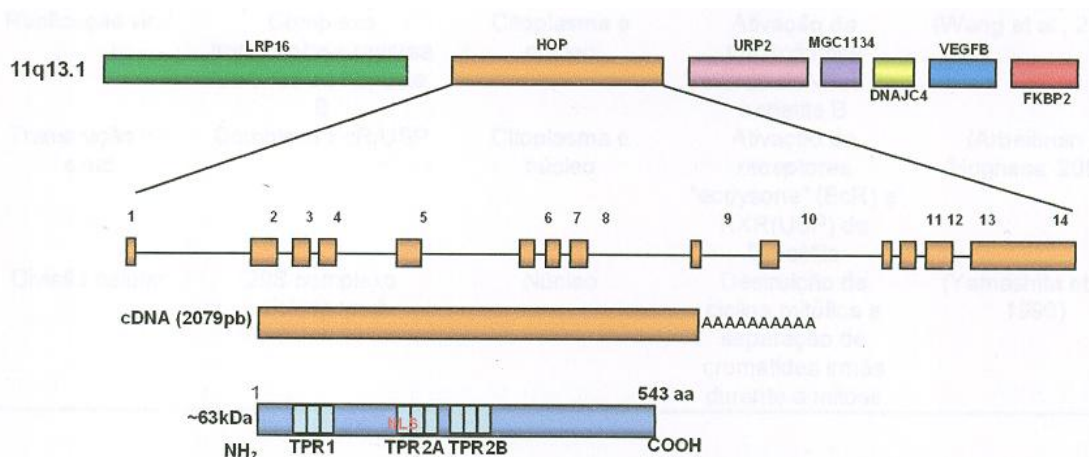


Figura 1: Domínios estruturais da STI1.

A: A STI1 possui domínios de ligação às chaperonas HSP70 e HSP90, formados por tetratricopeptídeos repetidos (TPR), e domínios de ativação a receptor esteróide, ricos em aspartato e prolina (DP). Estão representados as substituições em aminoácidos que prejudicam a capacidade de STI1 regular HSP70 (acima) e HSp90 (abaixo da representação dos domínios) (adaptado de Song and Masison, 2005). **B: Estrutura gênica da Hop humana.** O gene da Hop está localizado no cromossomo 11q13.1 e é flanqueado por outros genes como LRP16 e UR2. Este gene contém 14 exons (1-14 barras verticais), separados por introns (barras horizontais). O fragmento de c-DNA (2097 pb) codifica para uma proteína de 543 aminoácidos (aa) (Adaptado de Lopes, 2004).

Em camundongos, STI1 é inicialmente detectada no oitavo dia do desenvolvimento embrionário (E8), tendo sua expressão aumentada ao longo do desenvolvimento e sendo constitutivamente expressa em quase todos os tecidos (Hajj et al., 2009). A deleção de STI1 em camundongos é letal em embriões (Beraldo et al, em preparação), enquanto que em leveduras a deleção de STI1 só é letal em conjunto com alterações na função de Hsp90 (Chang et al., 1997). Em *C. elegans* a deleção de STI1 abrevia a vida de vermes mutados (Song et al., 2009).

Quanto à distribuição celular, STI1 é uma proteína predominantemente citoplasmática, embora já tenha sido identificada uma pequena fração no núcleo e na membrana celular (Longshaw et al., 2004;Zanata et al., 2002). Por outro lado, imunomarcação com anticorpo para STI1 e experimentos com STI1-YFP revelaram que a proteína pode também ser encontrada no Golgi e em outros compartimentos envolvidos com secreção (Caetano dados não publicados; Hajj et al, dados não publicados).

Em 2004, Eustace e Jay identificaram a presença de Hop no meio condicionado de células de fibrosarcoma juntamente com a HSP90, sugerindo a secreção destas proteínas em situações patológicas como tumor (Eustace and Jay, 2004). Apesar da ausência em sua estrutura de um peptídeo sinal para secreção convencional, foi demonstrado que a STI1 é secretada por astrócitos (Lima et al., 2007). Outras chaperonas, como HSP70 e HSP90 também são secretadas a despeito de não terem um peptídeo sinal (Liao et al., 2000;Robinson et al., 2005). Dados recentes sugerem que estas chaperonas desempenhem atividades neuroprotetoras e neurotróficas (Doepfner et al., 2009). Os mecanismos de secreção de STI1 ainda não estão esclarecidos; mas dada a importância da STI1 secretada na sobrevivência e diferenciação neuronal e também no desenvolvimento dos astrócitos (Lima et al., 2007;Arantes et al., 2009), é muito importante a compreensão de como este processo é regulado.

1.2 MECANISMOS DE SECREÇÃO

A maior parte das proteínas eucarióticas são secretadas por uma via conhecida como via secretória convencional. Essa via é responsável pelo direcionamento de proteínas para sua exata localização celular - seja ancorada na membrana

plasmática ou como proteína constituinte de alguma organela - sendo vital para o desenvolvimento e função celular (revisado por Dancourt and Barlowe, 2010). Para que uma proteína seja secretada por esta via, é necessário que ela seja, de alguma maneira, reconhecida pelo complexo responsável pelo *Sorting* de proteínas para vesículas secretórias. Este eficiente sistema é conhecido como complexo de revestimento protéico II (COPII) e está localizado em regiões específicas do retículo endoplasmático (RE) (Bannykh et al., 1996). De modo geral, proteínas secretadas possuem uma sequência sinal N-terminal ou interna que permitem sua entrada no retículo endoplasmático. Uma vez no RE, estas proteínas podem sofrer modificações como glicosilação, ancoramento por glicosil fosfatidilinositol (GPI), adequado enovelamento e formação de pontes dissulfeto antes de serem exportadas. As proteínas modificadas são reconhecidas pelas proteínas do COPII formando vesículas secretórias que são direcionadas para o Golgi (revisado por Dancourt and Barlowe, 2010). No Golgi, as proteínas são novamente modificadas, processadas e direcionadas para seu destino final através de outros complexos de formação de vesículas: COPI e SNAREs (do inglês *soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion proteins (NSF) accessory proteins (SNAP) receptors*).

Apesar da via convencional ser extremamente eficiente, algumas proteínas não seguem essa via, sendo secretadas através de mecanismos conhecidos como mecanismos não convencionais de secreção protéica (Nickel and Seedorf, 2008). Dois tipos de transporte não convencionais foram descritos: no primeiro, proteínas contendo peptídeo sinal deixam o RE em direção ao Golgi independente do complexo COPII ou são transportadas para membrana plasmática sem passar pelo Golgi; no segundo, proteínas sem peptídeo sinal para secreção deixam as células de forma independente de RE e Golgi. Foi demonstrado que uma vez no espaço extracelular, as proteínas do segundo tipo de transporte são cruciais para a regulação da resposta imune, angiogênese, diferenciação e para o crescimento celular (revisado por Nickel and Rabouille, 2009). Os mecanismos de secreção não convencional para proteínas solúveis (sem peptídeo sinal) estão melhor ilustrados na figura 2.

Como dito anteriormente, já foi demonstrado que a STI1 é secretada por astrócitos (Lima et al., 2007). Como esta proteína não possui um peptídeo sinal para secreção convencional, é provável que ela seja secretada por um dos mecanismos não convencionais de secreção de proteínas descritos anteriormente. Resultados

preliminares do grupo da Dra. Vilma Martins sugerem que a STI1 seja secretada através de estruturas vesiculares do tipo de microvesículas, e também existe a possibilidade de serem secretadas com exossomos (Arantes et al., 2009; Hajj et al dados não publicados). Exossomos são vesículas de 40-100 nm de diâmetro que são secretadas por diferentes tipos celulares. Estas estruturas correspondem a vesículas internas dos corpos multivesiculares (MVBs) que são liberadas quando esta organela se funde à membrana plasmática (Stoorvogel et al., 2002). A biogênese dos MVBs, que está diretamente relacionada com a biogênese dos exossomos, depende primeiramente de uma seleção efetiva das proteínas que serão secretadas. A ubiquitinação é um dos principais sinais para o direcionamento para os MVBs (Katzmann et al., 2001), mas diversas outras interações estão envolvidas na secreção de proteínas por exossomos.

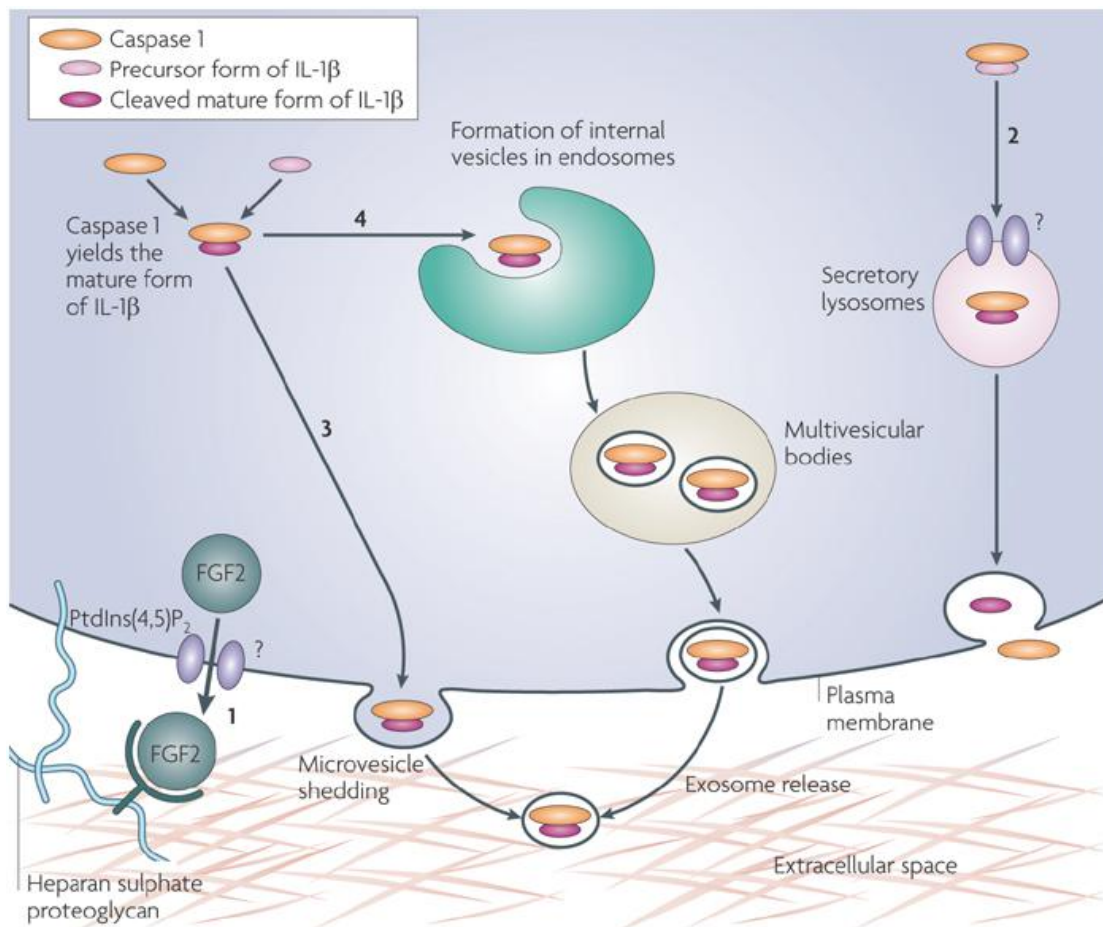


Figura 2 – Secreção não-convencional de proteínas citoplasmáticas solúveis.

Quatro diferentes mecanismos de secreção não convencional têm sido propostos. O primeiro deles (1), proteínas citoplasmáticas como o fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF2) são diretamente translocadas para a membrana plasmática através de sua interação com fosfolípidos (PtdIns(4,5)P₂) e proteoglicanos (HSPGs). Os outros 3 mecanismos dependem de intermediários vesiculares e estão exemplificados pela secreção de interleucina 1β (IL-1β). No segundo, proteínas são secretadas através da fusão de lisosomas secretórios com a membrana plasmática, liberando toda a carga contida nesta organela para o meio extracelular (2). A formação de vesículas a partir da membrana plasmática através da interação direta da proteína alvo com a membrana constitui o terceiro mecanismo (3). O último processo requer a formação dos corpos multivesiculares (MVBs), que se fundem com a membrana liberando suas vesículas chamadas exossomos (4). Adaptado de Nickel et al., 2004.

Na tentativa de identificação de componentes chave para regulação de funções intracelulares e da secreção de STI1, Soares e colaboradores (manuscrito em preparação) realizaram varredura por ensaio de duplo híbrido em leveduras, utilizando a porção N-terminal de STI1 e c-DNAs provenientes de biblioteca de cérebro humano e de murinos. Nestas varreduras, diversos clones foram isolados. Através de análises de bioinformática, as proteínas codificadas por estes clones foram identificadas. As principais delas (aquelas cujos clones foram isolados mais de uma vez no ensaio) estão listadas na tabela 1. Nesta tabela também estão listados o número de vezes que clones correspondentes a uma mesma proteína foram isolados da biblioteca de humano e murino. Interessantemente, os resultados deste ensaio mostram que várias proteínas envolvidas na via da SUMOilação (destacadas em negrito na tabela1) interagem com STI1.

Embora não se saiba se a SUMOilação é um processo envolvido na secreção não convencional de proteínas, há exemplos de proteínas constitutivamente secretadas, como o fator de crescimento derivado de hepatoma, que são SUMOiladas (Thakar et al., 2008). Portanto, esta foi uma via explorada neste trabalho. Além disso, a SUMOilação pode ter um papel importante em outras funções de STI1 não reconhecidas até o momento.

1.3 A VIA DE SUMOILAÇÃO

As modificações pós-traducionais são mecanismos rápidos, eficientes e reversíveis de regulação da estabilidade, localização, interação e funções proteicas.

Entre elas incluem-se a fosforilação, acetilação, metilação e ubiquitinação (revisado por Dorval and Fraser, 2007). SUMO (do inglês *small ubiquitin related modifier*) foi identificado em 1996 como sendo um modificador pós-traducional de proteínas, cujo processo de conjugação é relacionado com a via de ubiquitinação (Mahajan et al., 1997). A maior parte dos alvos de SUMO são proteínas envolvidas na regulação transcricional, manutenção da estrutura da cromatina, transdução de sinal, no reparo do DNA e transporte nuclear (Welchman et al., 2005). As consequências da ligação de SUMO a seu substrato são diversas, mas de modo geral, a SUMOilação altera a localização, atividade e estabilidade das proteínas alvo por modificar suas interações com outras proteínas (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007).

Tabela 1 – Proteínas identificadas como ligantes de STI1 através do ensaio de duplo híbrido em leveduras (Soares et al., manuscrito em preparação).

| Proteínas identificadas | Número De Clones Na Biblioteca Cérebro Humano | Número De Clones Na Biblioteca Cérebro Murino |
|--|---|---|
| HSP-70 | 5 | 5 |
| MAGED4 | 2 | - |
| Zygin II (FEZ 2) | 3 | 2 |
| Inibidor da STAT ativada 3 (PIAS3) | 2 | - |
| Inibidor da STAT ativada (PIAS2) | - | 1 |
| Inibidor da STAT ativada (PIAS1) | - | 1 |
| Inibidor da STAT ativada (PIASY) | - | 2 |
| Ubiquitin-conjugating enzyme E2I (UBC9) | 4 | 14 |
| Choque Térmico protein 8 | - | 36 |
| Chromobox homolog 4 (Pc2) | - | 20 |
| Laminin, beta 2 | - | 2 |
| RAS protein-specific guanine nucleotide-releasing | - | 14 |
| Chromodomain helicase DNA binding protein 3(Chd3) | - | 4 |
| E3 ubiquitin protein ligase.HECT domain containing, 1, transcript variant 5 (Edd1) | - | 1 |
| Homeodomain-interacting protein kinase 2b (HIPK2) | - | 2 |

SUMO são proteínas de aproximadamente 10 kDa, que possuem uma estrutura tridimensional muito parecida com a da ubiquitina; apesar de compartilharem menos de 20% de homologia na estrutura primária (Bayer et al., 1998). O genoma humano codifica 4 proteínas SUMO distintas: SUMO1 a SUMO4. SUMO4 possui expressão restrita à apenas alguns órgãos como rins, linfonodos e baço; especula-se que SUMO4 seja na verdade um pseudo-gen, cujas funções fisiológicas ainda não são conhecidas (Martin et al., 2007b). Já SUMO1 a 3 são ubiquamente expressas.

Acredita-se que a diferença de função entre estas proteínas seja dada pela especificidade ao substrato alvo (Gueiss-Friendlander e Melchior, 2007).

A ligação de SUMO ao seu substrato ocorre através da ligação entre o grupamento carboxílico C-terminal de SUMO e o grupo ϵ -amino de um resíduo de lisina da proteína alvo. Na maioria dos casos, a lisina alvo esta localizada em uma sequência consenso composta de Ψ KxE (onde Ψ é um aminoácido hidrofóbico e x qualquer aminoácido) (revisto por Johnson, 2004). O processo de conjugação envolve proteínas ativadoras de SUMO, as E1 ligases, uma proteína conjugadora, a E2 ligase Ubc9, e proteínas que contribuem para a especificidade do substrato alvo, as E3 ligases. A via de conjugação bem como as proteínas envolvidas estão representadas na figura 3.

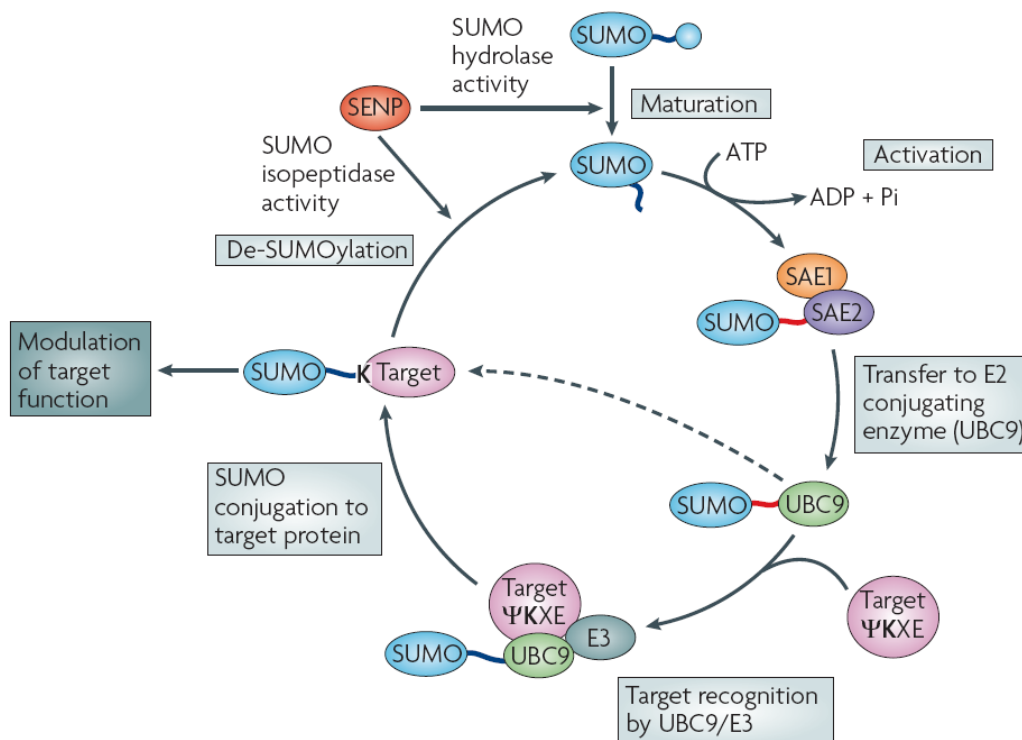


Figura 3: A via de SUMOilação.

Todas as proteínas SUMO são sintetizadas como precursores e são modificados por proteases específicas denominadas SENPs. SUMO é então ativado pelo heterodímero SAE1/Aos1 e SAE2/Uba2 e transferido para a enzima conjugadora (E2) Ubc9. Ubc9 pode então reconhecer diretamente o substrato alvo e catalisar a transferência de SUMO para ele (linha pontilhada) se ligar a uma E3 ligase (PIAS, Pc2 ou RANBP2) que mediará a conjugação (adaptado de Martin e colaboradores, 2007).

Ao contrário da ubiquitinação que em geral marca proteínas para serem degradadas por proteasomas, as consequências exatas da SUMOilação de proteínas são quase imprevisíveis. Em geral a SUMOilação afeta as funções da

proteína alvo através da alteração de sua localização subcelular e de suas interações com outras proteínas. Essa via tem um importante papel na regulação da transcrição, transporte nuclear, organização cromossomal, reparo do DNA, progressão mitótica, biogênese de ribossomos e formação dos corpos nucleares PML (do inglês *Pro-Myelocytic Leukaemia*) (Kolli et al., 2010). Apesar da maior parte das proteínas modificadas por SUMO serem encontradas no núcleo, a SUMOilação também exerce um importante papel no contexto citoplasmático (Martin et al., 2007). Alguns exemplos de funções extra-nucleares da SUMOilação são a modulação das funções do canal de potássio voltagem-dependente Kv1.5 (Benson et al., 2007), e a regulação da endocitose da subunidade GluR6a dos receptores de kainato, cuja SUMOilação altera as correntes excitatórias pós-sinápticas mediadas por estes receptores (Martin et al., 2007).

Além da regulação da homeostasia celular, a SUMOilação também pode estar envolvida na patogênese de algumas doenças degenerativas. Proteínas que têm um papel crucial na patogênese de doenças como câncer, Doença de Huntington, Alzheimer e Parkinson, foram identificadas como alvos para modificação por SUMO (Sarge and Park-Sarge, 2009). Um importante exemplo é a inibição da formação de agregados da proteína A β -amilóide (responsável pela patogênese da Doença de Alzheimer) através da SUMOilação de seu precursor, a proteína APP (Sarge e Park-Sarge, 2009).

1.4 COMPONENTES DA VIA DE SUMOILAÇÃO

Como mostrado na figura 3, a complexa via de SUMOilação é composta por um grande número de proteínas incluindo proteases específicas para SUMO (SENP), enzimas ativadoras (SAE1/SAE2) e enzima conjugadora (Ubc9) de SUMO, as enzimas de ligação (E3 ligases) e as próprias proteínas SUMO.

As proteínas SUMO2 e SUMO3 apresentam 95% de homologia e sua característica chave é a capacidade de formação de cadeias de poli-SUMO (Johnson, 2004). SUMO1 compartilha 46% de homologia com SUMO2 e 3, mas não consegue formar as cadeias de poli-SUMO. Já SUMO4, apesar de compartilhar 86% de homologia com SUMO2 e 3, é ainda uma proteína muito restrita quanto à sua distribuição tecidual, não se sabendo se ela pode realmente modificar proteínas

in vivo (Tatham et al., 2001; Bohren et al., 2004). Todas as proteínas SUMO são expressas como isoformas imaturas que precisam ter seus motivos di-glicina C-terminal expostos para que possam ser conjugados - trabalho realizado pelas proteínas SENPs. Além da ativação das proteínas SUMO, as SENPs também regulam o processo de de-SUMOilação. Seis SENPs foram identificadas em humanos: SENP1, 2, 3, 5, 6 e 7. Quanto à especificidade, SENP1 e 2 hidrolizam tanto SUMO1 quanto SUMO2/3; SENP3 e 5 preferem SUMO2/3 e SENP6 e 7 trabalham melhor com as cadeias de poli-SUMO de SUMO2/3 (revisto por Kolli et al., 2010). Além dessa especificidade por SUMO, as SENPs também apresentam especificidade por substratos, o que é justificada por seus diferentes níveis de expressão e localizações intracelulares.

A maior parte dos organismos possuem apenas uma enzima ativadora de SUMO, que é requerida para a conjugação de todas as variantes de SUMO a todos os seus substratos (Jonhson, 2004). A enzima ativadora de SUMO foi purificada e caracterizada na década de 90, e trata-se de um heterodímero formado pelas subunidades Aos1 (também conhecida como SAE1) e Uba2 (também conhecida como SAE2) (Johnson et al., 1997; Desterro et al., 1999; Gong et al., 1999). No primeiro passo do processo de ativação, o grupo C-terminal de SUMO ataca ATP formando SUMO C-terminal adenilato, e liberando pirofosfato. Em seguida, o grupo tiol do sítio ativo da E1 ataca o SUMO adenilato formando uma ligação tiol-éster de alta energia. O SUMO ativado é então transferido para a E2 ligase Ubc9 (Johnson, 2004)

Da mesma forma, também só existe uma enzima conjugadora de SUMO: a Ubc9. Esta enzima é essencial à sobrevivência; *Knock outs* para Ubc9 morrem logo no início do estágio de pós-implantação (Nacerddine et al., 2005). Estudos em células deficientes para Ubc9 mostram que esta enzima é crucial para a formação correta da arquitetura nuclear e para segregação cromossomal (Nacerddine et al., 2005). Alterações nos níveis de expressão de Ubc9 também têm sido relacionados com malignidade e metástase de tumores (Moschos et al., 2010).

Ubc9 por si só é capaz de se ligar diretamente no sítio consenso de SUMOilação das proteínas alvo promovendo a transferência de SUMO. Durante algum tempo esta observação foi motivo de discussão sobre o requerimento das E3 ligases no processo da SUMOilação (Palvimo, 2007). Ao longo do tempo porém, além da descoberta de várias E3 ligases, foi também demonstrado que estas

proteínas atuam como verdadeiras pontes aproximando Ubc9-SUMO das proteínas alvo, mantendo a conformação correta das mesmas, aumentando assim a eficiência da transferência (revisto por Wilkinson and Henley, 2010). Várias SUMO E3 ligases têm sido descritas tais como, proteínas PIAS, TOPORS, MUL1, MMS21, Pc2, RanBP2 e outras (revisto por Wilkinson e Henley, 2010). As proteínas da família PIAS e Pc2 foram identificadas como ligantes de ST11 no ensaio de duplo híbrido realizados por Soares e colaboradores (manuscrito em preparação). Dessa maneira, dada a importância destas proteínas neste trabalho de tese, elas serão descritas adiante com mais detalhes.

1.5 PROTEÍNAS PIAS

Proteínas PIAS ou proteínas inibidoras de STAT ativada foram inicialmente descritas por sua capacidade de interagir com fatores STAT (transdutor de sinal e ativador da transcrição) (Chung et al., 1997). Além de reguladores das diversas STATs e co-reguladoras da transcrição, as proteínas PIAS também atuam como E3 ligases na via de SUMOilação, agindo como adaptadoras entre o intermediário SUMO-Ubc9 e o substrato a ser SUMOylado (Kotaja et al., 2002;Palvimo, 2007). Sua atuação como E3 ligase confere especificidade ao substrato a ser SUMOylado. A sua capacidade de interagir de modo não covalente com SUMO e com DNA também confere a esta família de proteínas várias outras atividades independentes do seu domínio E3 ligase.

Já foi demonstrado que as PIAS interagem com mais de 70 proteínas, sendo a maioria delas proteínas envolvidas na regulação da transcrição (revisto por Palvimo, 2007). Em mamíferos, as proteínas PIAS são codificadas por 4 genes, dando origem a PIAS1, PIASx (PIAS2), PIAS3 e PIASy (PIAS4). O mRNA para PIASx pode sofrer processamento dando origem a duas isoformas: PIASx α e PIASx β (Moilanen et al., 1999;Kotaja et al., 2002). As proteínas PIAS de mamíferos compartilham elevado grau de homologia, mas acredita-se que elas se liguem substratos específicos e também possuam diferenças na capacidade de promover SUMOilação. PIAS1 e PIAS3, por exemplo, inibem respectivamente a ligação de STAT1 e STAT3 ao DNA (Chung et al., 1997;Liu et al., 1998). Já PIASy reprime as atividades de STAT1, LEF1, Smad4 e receptor de andrógenos (AR) sem interferir com a ligação destas proteínas ao DNA (Palvimo, 2007). PIAS2 interage com

STAT4 seguida da estimulação de células T por IL-12 [interleucina 12 (Roth et al., 2004)]. Embora a grande maioria dos ligantes de PIAS sejam fatores de transcrição ou proteínas ligadas à regulação nuclear, existem exemplos de regulações citoplasmáticas nas quais estas E3 ligases estão envolvidas (Rytinki et al., 2009). Proteínas citoplasmáticas como o receptor metabotrópico de glutamato (mGluR8) e canais de potássio voltagem-dependentes (Kv1.5) interagem com proteínas da família PIAS (Wible et al., 1998; Martin et al., 2007a). Portanto, ainda que STI1 seja uma proteína predominantemente citoplasmática, é possível que ela tenha suas funções modificadas por PIAS. Além disso, como dito anteriormente uma fração de STI1 é encontrada no núcleo, onde provavelmente ela pode interagir com PIAS (Longshaw et al., 2004; Zanata et al., 2002).

Acredita-se que a expressão e localização das diferentes proteínas PIAS contribua ativamente para a seletividade do substrato e para as diferenças nas funções observadas entre estas proteínas. PIASy endógena apresenta uma distribuição difusa no núcleo na forma de pontos (denominados *Speckles*) e também é encontrada na matrix nuclear (Sachdev et al., 2001; Ihara et al., 2005). Esta E3 ligase é auto-SUMOilada preferencialmente por SUMO1 redirecionando SUMO para os *Speckles* nucleares onde se co-localizam (Ihara et al., 2005). PIASy também é encontrada em corpos nucleares especializados conhecidos como corpos PML. A SUMOilação de PIASy aumenta sua associação com os PMLs (Ihara et al., 2005). PIAS1 (expressa extensivamente nos testículos), PIAS2 (α e β) e PIAS3 também apresentam distribuição nuclear em forma de *Speckles*, porém o número destes *Speckles* varia de acordo com o tipo de PIAS (Kotaja et al., 2002). Estas proteínas se ligam à SUMO1, SUMO2/3 e a outras proteínas SUMOiladas redirecionando-as para os grânulos nucleares (Kotaja et al., 2002) e são também SUMOiladas. PIAS1 também já foi identificada em estruturas nucleares de reparo chamadas *Foci*, uma região que acredita-se estar envolvida com reparo de DNA (Dellaire et al., 2003).

A repressão ou ativação de fatores de transcrição por esta família de proteínas normalmente se associa com o direcionamento destes fatores para os corpos nucleares onde PIAS se localizam (Tan et al., 2002; Ihara et al., 2005). Como exemplos pode-se citar o direcionamento dos fatores Tcf-4 e Smad4 mediado por PIASy. PIASy leva ao direcionamento de Tcf-4 para corpos PML onde esse fator é SUMOylado por SUMO1, tendo conseqüentemente sua atividade transcricional aumentada (Yamamoto et al., 2003; Ihara et al., 2005). Em condições normais, sem

a super expressão de SUMO1 ou PIASy, a proteína efetora Smad4 (envolvida na sinalização mediada por TGF- β - fator de crescimento transformante) se localiza difusamente no núcleo. A co-expressão de Smad4 com SUMO1 e PIASy induz a translocação de Smad4 para os spleckles, onde se co-localiza com PIASy (Lee et al., 2003). As consequências deste direcionamento sobre a atividade Smad4 ainda não são conhecidas.

Um dos corpos nucleares mais proeminentes e importantes para o processo de SUMOilação são os corpos PML. Estes grânulos nucleares estão envolvidos na regulação de diversas funções como indução de apoptose, envelhecimento celular, inibição da proliferação, regulação da transcrição, supressão de tumor, estabilidade genômica e reparo de DNA (Heun, 2007; Bernardi and Pandolfi, 2007). Acredita-se que eles formem superfícies catalíticas onde as proteínas trazidas para lá sejam pós-traducionalmente modificadas (Bernardi and Pandolfi, 2007). Estas estruturas nucleares possuem de 0.2-1.0 μm de extensão e estão presentes entre 1 a 30 corpos por núcleo na maior parte das células de mamíferos. Embora pareçam ser uniformes, os PMLs são estruturalmente e funcionalmente heterogêneos (revisto por Bernardi and Pandolfi, 2007). A proteína pró-mielocítica leucêmica (PML) é o principal componente dos corpos PMLs mas diversas outras proteínas são transitoriamente associadas com estas estruturas. PML interage diretamente com SUMO1, SUMO2/3 e Ubc9 e sua SUMOilação é essencial para formação dos corpos nucleares PML (Heun, 2007; Bernardi and Pandolfi, 2007). Além das proteínas SUMO e da E2 ligase Ubc9, já foi demonstrado que algumas E3 ligases como PIAS e TOPORS direcionam substratos para os corpos PML afim de que sejam SUMOylados, dessa forma se co-localizando transitoriamente com estas estruturas (Ihara et al., 2005; Matsuura et al., 2005; Renner et al., 2010a). A presença da maquinaria de SUMOilação nos corpos PML caracteriza estas organelas como um dos principais sítios ativos de SUMOilação de proteínas no núcleo.

1.6 PROTEÍNA POLICOMB 2 – Pc2

As proteínas do grupo Policomb (PcG) são proteínas regulatórias da transcrição que controlam a expressão de uma variedade de genes desde o início da embriogênese até a vida adulta (Kerppola, 2009). Múltiplas atividades enzimáticas

têm sido atribuídas ao grupo policomb, todas relacionadas com modificações na estrutura da cromatina para manutenção do estado transcricional reprimido de diversos genes. Estas proteínas, originalmente descobertas em *Drosophila melanogaster*, formam pelo menos duas classes de complexos multiméricos envolvidos na repressão gênica, os complexos repressivos 1 e 2 (PRC1 e PRC2) (Schuettengruber and Cavalli, 2009). Estes complexos formam discretos aglomerados no núcleo, denominados corpos PcG, constituídos de múltiplas proteínas PcGs associadas ao DNA (revisto por Kagey et al., 2003). Os complexos PRC1 contém proteínas altamente conservadas ao longo das espécies, entre elas a família das proteínas cromobox (Cbx). Essa família possui pelo menos 8 membros e um deles, a proteína Cbx4 ou Pc2, foi identificado como sendo uma SUMO E3 ligase (Kagey et al., 2003).

O primeiro substrato identificado cuja SUMOilação é mediada por Pc2 é o co-repressor transcricional CtBP. Foi demonstrado que Pc2 interage com CtBP recrutando-o para os PcGs, onde catalisa sua SUMOilação (Kagey et al., 2003). Desde então outros substratos para SUMOilação mediada por Pc2 foram identificados, todos eles envolvidos com reparo de DNA e regulação da transcrição (Wotton and Merrill, 2007). Entre eles, pode-se citar HIPK2 (do inglês *Homeodomain Interacting Protein Kinase 2*), o regulador transcricional SIP1 e Dnmt3a (DNA metil-transferase 3a) (Roscic et al., 2006; Li et al., 2007b; Merrill et al., 2010). Comparado com a família de E3 ligases PIAS, o repertório de substratos para Pc2 parece ser bem restrito. É possível que este limitado repertório seja devido a sua específica localização subnuclear dentro do corpos PcG.

Estruturalmente, Pc2 possui um motivo cromodomínio, comum a todos os membros da família cromobox e que capacita alguns destes membros a se ligarem às histonas; um motivo C-box, que é uma pequena região hidrofóbica na extremidade C-terminal de Pc2 requerida para sua localização nos corpos PcG; sítios para SUMOilação e fosforilação, e dois motivos SIM (sítios de ligação não covalente a SUMO) que são requeridos para sua completa atividade como E3 ligase e também para sua própria modificação covalente por SUMO (revisto por Wotton e Merril., 2007; Merril et al., 2010). Os motivos SIM de Pc2 são responsáveis pela sua direta interação com SUMO1 e SUMO2. Foi demonstrado que através destes motivos, Pc2 consegue recrutar SUMO1, SUMO2 e seu substrato CtBP para os corpos PcG, onde CtBP é SUMOylado (Merril et al., 2010). Pc2 também recruta

Ubc9 para os corpos PcG, mas não se sabe se esta atividade é dependente dos seus motivos SIM (Kagey et al., 2003; Merrill et al., 2010). Tendo em vista o recrutamento de toda a maquinaria de SUMOilação para os corpos PcG, estas organelas também constituem um dos principais sítios ativos para SUMOilação de proteínas. A interação de STI1 com Pc2 foi demonstrada por Soares e colaboradores (manuscrito em preparação) e o direcionamento ou não de STI1 para os corpos PcG será abordado neste trabalho.

1.7 MECANISMOS QUE REGULAM A SUMOILAÇÃO

Embora as consequências moleculares da SUMOilação de determinadas proteínas sejam relativamente bem entendidas, os sinais celulares que induzem a conjugação de proteínas por SUMO ainda não são bem conhecidos. Nesta introdução foram descritos dois importantes mecanismos que induzem SUMOilação de proteínas: o Choque Térmico e o Dano ao DNA por irradiação.

1.7.1 CHOQUE TÉRMICO

A resposta ao Choque Térmico é um dos mecanismos de defesa mais evolucionariamente conservado. Este processo leva ao dano protéico e no DNA, que dependendo da severidade da exposição resultará em morte celular programada ou sobrevivência e desensibilização para futuras exposições (Lindquist, 1986; Kaneko et al., 2005). O Choque Térmico (HS) é caracterizado por uma massiva indução da expressão de genes que codificam as proteínas do Choque Térmico (HSPs) que atuam protegendo a células contra o estresse citotóxico (Golebiowski et al., 2009). As HSPs constituem a principal família de chaperonas moleculares que são classificadas de acordo com sua massa molecular em kDa. As chaperonas são proteínas que atuam no enovelamento e estabilização de polipeptídeos recém sintetizados, além do direcionamento de proteínas mal enoveladas para degradação (McClellan et al., 2005). A família de proteínas de choque térmico de 70 KDa (HSP70) reconhece extensões curtas de polipeptídeos hidrofóbicos que estão em uma conformação linear, auxiliando-os a adotar e manter conformações nativas (Young et al., 2004). Ela também atua durante alguns processos celulares nos quais

as proteínas estão parcialmente enoveladas, como transporte através da membrana, e protege as células do estresse por prevenir a agregação de proteínas (Song and Masison, 2005). Desde leveduras a mamíferos, a família de proteínas de choque térmico de 90 KDa (HSP90) atua no enovelamento de diversos grupos de proteínas como fatores de transcrição, cinases regulatórias entre outras. A atividade do complexo HSP70-HSP90 é modulada por um grande número de outras proteínas, que interagem diretamente e especificamente com uma ou com as duas chaperonas (Young et al., 2004). Dentre estes co-fatores, chamados co-chaperonas, está a Hsp40, que interage com as proteínas 'clientes' direcionando-as para HSP70. Em seguida, a STI1 ou Hop se liga simultaneamente à HSP70 e HPS90 aproximando estas duas chaperonas para que o substrato seja transferido e o enovelamento completado (revisto por Song and Masison, 2005). Foi demonstrado recentemente, que o processo de Choque Térmico altera a localização intracelular da co-chaperona STI1, mas ainda não se sabe quais as implicações fisiológicas deste resultado (Daniel et al., 2008).

A resposta ao Choque Térmico envolve regulação da transcrição, tradução, apoptose, controle do ciclo celular, enovelamento e degradação de proteínas (Lindquist., 1986). A conjugação de proteínas por SUMO2/3 mas não por SUMO1 parece ser estimulada durante o Choque Térmico (Saitoh and Hinchev, 2000), implicando a SUMOilação de proteínas como parte do processo de resposta celular ao Choque Térmico. Recentemente foi demonstrado que SUMO2/3 induzem a sobrevivência celular após Choque Térmico, e que a maior parte das proteínas que estão diretamente envolvidas na resposta celular ao HS são alvos de SUMO2 (Golebiowski et al., 2009). Em resposta ao HS SUMO foi polimerizado em polícadeias e redistribuído entre diversas proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular, apoptose, tráfego, enovelamento e degradação de proteínas, transcrição, tradução, replicação do DNA, recombinação e reparo (Golebiowski et al., 2009). Este trabalho confirma o aumento da SUMOilação de proteínas induzida por HS e sugere que este processo seja fundamental para sobrevivência celular a esse tipo de estresse.

1.7.2 DANO AO DNA POR IRRADIAÇÃO

A quebra na fita dupla do DNA (DSB do inglês *Double-strand break*) constitui uma das mais graves formas de danos ao DNA e podem ocorrer espontaneamente durante o ciclo celular ou pode ser induzida por fatores exógenos (Cann and Hicks, 2007). Uma das principais fontes exógenas de DSB é a irradiação ionizante (raios X e radiação gama). As fontes de dano ao DNA são diversas, incluindo irradiação, quimioterapia entre outros. Porém independente da fonte o efeito é similar e resulta na ativação da proteína supressora de tumor p53, que pode levar à repressão do ciclo celular, envelhecimento ou apoptose (Harper and Elledge, 2007).

As células de mamíferos possuem um sistema complexo de reparo do DNA para contornar os danos provocados pelos DSBs, incluindo ativação de vias de sinalização envolvidas no reparo de DNA, *checkpoints* no ciclo celular e apoptose (Cann and Hicks, 2007). Um dos primeiros passos para o reparo é a identificação da presença dos DSBs, que pode ser feita pela identificação da histona H2AX fosforilada, observada após 1 minuto do dano ao DNA (Rogakou et al., 1998; Rogakou et al., 1999). Logo após o dano ao DNA as cinases ATM (do inglês *Ataxia Telangiectasia Mutated*) ou ATR (relacionadas a ATM e Rad3), principais cinases envolvidas na via de sinalização de reparo ao DNA, são ativadas e fosforilam a histona H2AX (forma variante da histona H2A). Após a fosforilação de H2AX, que acontece em uma região de megabases adjacentes ao DSBs, várias proteínas migram para estes sítios formando estruturas conhecidas como *Foci* (revisto por Cann and Hicks., 2007). Os *Foci* recrutam vários outros mediadores formando grandes complexos de reparo. Entre os mecanismos de reparo, a recombinação não homóloga *End-Joining* (NHEJ) representa a principal via, seguida da ativação da sinalização dependente de ATM e da recombinação homóloga (Jeggo and Lavin, 2009). O tipo de lesão e a fase do ciclo celular determinam a via de reparo a ser usada (Morris, 2010), onde NHEJ representa a principal via em G0/G1 e recombinação homóloga atua na fase S/G2 (Jeggo and Lavin., 2009).

Várias proteínas envolvidas no reparo do DNA foram identificadas como alvo da via de SUMOilação (Morris, 2010), sugerindo a participação da SUMOilação nesta via. A regulação da enzima TDG (do inglês *Thymine DNA Glycosylase*) é um exemplo da participação da via de SUMOilação na regulação do reparo do DNA (Morris, 2010). TDG reconhece e remove bases aberrantes no DNA, deixando um

sítio sem base que será logo em seguida reparado por outras enzimas. O passo limitante desse processo é a liberação de TDG do sítio onde a base foi removida. Foi demonstrado que a SUMOilação de TDG induz à mudança conformacional no domínio N-terminal de TDG que reduz a sua afinidade pelo DNA, deixando assim esse sítio livre para atuação das próximas enzimas de reparo (Morris, 2010). Outro importante exemplo da participação da SUMOilação na resposta ao dano ao DNA é modificação de BRCA1 (Morris et al., 2009). BRCA1 participa do processo de reparo ao DNA atuando como uma ubiquitina ligase. Morris e colaboradores demonstraram que em resposta ao estresse genotóxico, BRCA1 co-localiza com SUMO1, SUMO2/3 e Ubc9 nos sítios de dano ao DNA sendo SUMOilada (Morris et al., 2009). Sua SUMOilação aumenta sua atividade como ubiquitina ligase e também auxilia no seu acúmulo nas regiões de DSB. Estes exemplos fortemente sustentam o envolvimento da via de SUMOilação na resposta ao dano no DNA.

Interessantemente, as proteínas SUMO E3 ligase da família PIAS foram encontradas dentro dos *Foci* e têm sido descritas como participantes da resposta ao dano no DNA (Zhao and Blobel, 2005). Foi demonstrado que SUMO1 e SUMO2/3 se acumulam nos sítios de dano no DNA com cinéticas diferentes, sugerindo que esse processo possa requerer diferentes E3 ligases (Morris et al., 2009). De fato, a depleção de PIASy notavelmente reduz o acúmulo de SUMO1 e SUMO2/3, enquanto a depleção de PIAS1 só influencia a cinética deste último (Galanty et al., 2009). PIAS1 e PIASy aumentam a SUMOilação de BRCA1 induzida por radiação ionizante nos sítios DSB. Essas duas E3 ligases são requeridas para o recrutamento de BRCA1 para os sítios de DSB e também participam diretamente da resposta ao dano no DNA (Morris et al., 2009). Além de BRCA1, outro efetor do sistema de reparo, a proteína 53BP1 também foi SUMOilado após estímulo por radiação ionizante, mas esse processo só foi dependente de PIASy e não de PIAS1. PIASy também parece estar envolvida na ubiquitinação de outros fatores da via de reparo como a histona H2A (Galanty et al., 2009). Estes resultados suportam o modelo de que as proteínas PIAS1 e PIASy são recrutadas para os sítios DSB, onde auxiliam na conjugação de SUMO a efetores da via de reparo e também atuam recrutando efetores para estes sítios de maneira independente da sua atividade como E3 ligase (Galanty et al., 2009; Morris et al., 2009).

Não somente PIAS, mas outras SUMO E3 ligases, como Pc2, também foram descritas como participantes da resposta ao dano no DNA (Rosic et al., 2006;

Renner et al., 2010). HIPK2 é uma cinase induzida por dano ao DNA, que atua na retenção do ciclo celular, apoptose e repressão transcricional. O dano ao DNA induz a SUMOilação de HIPK2 mediada por Pc2, consequentemente aumentando a atividade de HIPK2 como repressor transcricional (Roscic et al., 2006). HIPK2 foi identificada como um dos ligantes para STI1 pela varredura em duplo híbrido.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 CONSTRUÇÕES

As construções GFP-STI1, CFP-STI1 e YFP-STI1 foram produzidas no Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer por Marilene H. Lopes e Vilma R. Martins. As demais construções usadas no projeto nos foram gentilmente cedidas por outros grupos e estão listadas na tabela 2, bem como suas principais características.

Tabela 2: Construções

| Construção | Origem | Tamanho em SDS PAGE (kDa) | Sequenciamento | Responsável |
|------------------|--------|---------------------------|----------------|------------------|
| pCS2-YFP-Ubc9 | Humano | 46 kDa | confirmado | David Wotton |
| pCS2-CFP-SUMO1 | Humano | 37 kDa | confirmado | David Wotton |
| pCMV5-FLAG-SUMO3 | Humano | 13 kDa | confirmado | David Wotton |
| pCMV5-FLAG-Pc2 | Humano | 64 kDa | confirmado | David Wotton |
| pCMV MYC – PIASy | ? | ~75 kDa | confirmado | Lienhard Schmitz |
| pCMV MYC - PIAS1 | mouse | 75 kDa | Confirmado | Lienhard Schmitz |
| YFP-PML | Humano | - | Confirmado | Marc Tini |

2.2 CULTURA DE CÉLULAS

Células CF10 (uma linhagem neuronal knock-out para PrP^C, derivada de camundongos 129/Ola Prnp^{0/0}) foram gentilmente cedidas por Suzette Priola (NIH). Estas células foram mantidas em DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's Medium*, Gibco Life Technologies) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco Life Technologies) e 2 mM de glutamina (meio completo), em garrafas de cultura de 50 ml em estufa a 37°C com atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂. Somente após transfecção, estas células eram mantidas por dois dias neste mesmo meio porém desprovido de soro fetal bovino.

A linhagem estavelmente transfectada PrP3F4 foi mantida no mesmo meio utilizado para células CF-10 acrescido de 1,0 µg/µl de Higromicina B (Invitrogen).

2.3 CULTURA DE ASTRÓCITOS

Fêmeas grávidas (15 a 16 dias) foram anestesiadas com injeção de ketamina:xilezina (2:1) e então foram sacrificadas por deslocamento cervical. Os embriões foram removidos e colocados imediatamente em HBSS gelado e estéril. Os hemisférios corticais foram dissecados, separados do estriado e mantidos a 4°C por 1 hora. Dentro do fluxo, os córtexes foram dissociados em 5 ml de meio completo (D-MEM, 10% de soro fetal bovino e antibióticos) pipetando-se várias vezes com pipeta de 10 ml. As células foram plaqueadas em placas de 100 mm pré-tratadas com poli-L-lisina. Completou-se o meio para 10 ml de volume final e manteve-se as culturas na incubadora a 37°C, 5% de CO₂. No dia seguinte lavou-se as culturas com HBSS para remover os neurônios e debris celulares. Trocou-se o meio das culturas a cada dois dias. Para soltar os astrócitos das placas, lavou-se as células com 2 ml de tripsina-EDTA (Invitrogen) e incubou-se com 3 ml desta mesma solução por 4 minutos a 37°C. As células foram soltas, homogeneizadas com meio completo, contadas e plaqueadas em placas de 35 mm com lamínula de vidro (MatTek) pré-tratadas com poli-L-lisina. Novas culturas foram feitas semanalmente.

2.4 TRANSFECCÃO

As células CF-10 e PrP3F4 foram transfectadas utilizando-se lipossomas. Vinte e quatro horas antes da transfecção as células foram plaqueadas, em uma densidade de 1×10^5 células por lamínula (placas de 35mm com lamínula de vidro de 0.085-0.13mm da MaTeck), e mantidas em meio completo.

A transfecção foi realizada utilizando Effectene (Qiagen) ou Lipofectamina (Invitrogen), seguindo-se as instruções do fabricante. As células foram transfectadas com uma quantidade variável de DNA, dependente da construção utilizada, seguindo-se a relação 10µl de efectene ou 2.5µl de Lipofectamina para cada 1 µg de DNA. No caso das placas controle, utilizou-se vetores sem inserto para que a quantidade total de DNA por placa fosse mantida em todas as condições. As placas foram incubadas com os lipossomas por seis (effectene) ou quatro horas (lipofectamina) a 37°C em meio sem soro. Após o período de incubação, as células foram lavadas 2X com tampão HBSS (KCl 5.33 mM; KH₂PO₄ 0.441 mM; NaHCO₃

4.17 mM; Na₂HPO₄ 0.338 mM; D-glicose 5.56 mM), e mantidas em meio sem soro por 48 horas com adição de higromicina B para seleção das células PrP3F4 positivas.

As células HEK foram transfectadas utilizando-se cloreto de cálcio (Ferguson and Caron, 2004). Para os experimentos de Co-Imunoprecipitação estas células foram plaqueadas em placas de 100 mm quarenta e oito horas antes da transfecção, em uma densidade de 1×10^6 . A transfecção com cloreto de cálcio (CaCl₂) foi feita da seguinte maneira: colocou-se 450µl de HBSS 1X em tubos de 1.5ml; colocou-se os respectivos DNAs e em seguida 50µl de CaCl₂ a 2,5 M; gotejou-se 500µl de HBSS 1X sobre a solução com DNA; gotejou-se lentamente a mistura duas vezes e adicionou-se sobre cada placa. As células foram deixadas com o complexo de transfecção por 16 horas, lavadas com tampão HBSS e deixadas em meio completo por quarenta e oito horas.

2.5 CO-IMUNOPRECIPITAÇÃO

Os experimentos de Co-Imunoprecipitação foram realizados em células HEK. Quarenta e oito horas após a transfecção, as células foram lisadas utilizando-se um kit de extração de proteínas da Millipore de acordo com as instruções do fabricante. Este kit foi utilizado para garantir que as proteínas nucleares como PIAS1, PIASy e Pc2 fossem extraídas. Após a lise, a quantidade de proteínas totais foi dosada pelo método de Bradford e em seguida incubou-se 800µg do lisado com as beads pré-tratadas. O pré-tratamento das beads consistiu em 3 lavagens com tampão PBS (58 mM de Na₂HPO₄, 17 mM de NaH₂PO₄ e 68 mM de NaCl) e adição de 1% de albumina bovina (BSA – solução estoque 10%) no momento do uso para dificultar a ligação de proteínas inespecíficas. Para as Co-imunoprecipitações de PIAS1, PIASy e Ubc9 utilizou-se beads com anticorpos para a proteína HA imobilizados em agarose (SIGMA) e para a Co-imunoprecipitação de Pc2 utilizou-se as beads com anticorpos para a proteína FLAG imobilizados em agarose (SIGMA). Os lisados foram incubados com as beads por 4 (Pc2) ou 16 horas (demais proteínas). Após o período de incubação as beads foram centrifugadas a 5000g por 2 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. As beads foram então lavadas 3 vezes em tampão TritonX-100 1% (NaCl 50mM, Tris 50mM, pH= 7.4) e 3X em tampão PBS. Em

seguida, adicionou-se 30µl de tampão de amostra 3 vezes sem agente redutor e ferveu-se os tubos por 5 minutos a 100°C. Preparou-se também tubos contendo 60µg de lisado total para avaliação da expressão das proteínas alvo. Estes lisados foram fervidos a 100°C com tampão de amostra 6 vezes, contendo agente redutor, por 5 minutos. As proteínas dos lisados e precipitados foram separadas por eletroforese e submetidas a *Western Blotting*.

2.6 AVALIAÇÃO DAS FRAÇÕES NUCLEARES E CITOPLASMÁTICAS

Com o objetivo de avaliar a expressão de STI1, SUMO1 e 3 e PIAS1 em diferentes compartimentos celulares, realizou-se uma separação bioquímica das frações nucleares e citoplasmáticas em células HEK. Para isto utilizou-se um dos kits de fracionamento celular da Millipore (Kit 2145) adaptando-se às instruções do fabricante. No dia do experimento, lavou-se as placas 1X com PBS gelado e soltou-se as células das placas com PBS-EDTA. A suspensão de células foi transferida para tubos de 15 ml e então centrifugadas a 1000g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 150µl por tubo de tampão **C** para extração de proteínas citoplasmáticas (Tampão C acrescido de Inibidor de Proteases 1:100, N-etilmaleimido 20mM). A suspensão foi submetida a rotação por 20 minutos a 4°C. Após os 20 minutos as células foram passadas em uma seringa de 1ml com agulha bem fina várias vezes, para romper a membrana citoplasmática e liberar os núcleos. A mistura foi então centrifugada a 15000g por 20 minutos a 4°C; o sobrenadante foi transferido para novos tubos e corresponde à fração citoplasmática. O pellet foi ressuscitado em 1ml de tampão **W** e submetido a rotação por 20 minutos a 4°C. Esse procedimento foi realizado duas vezes para lavar o pellet e garantir que não houvesse contaminação com proteínas citosólicas. Após a última lavagem centrifugou-se a suspensão a 15000g por 20 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 60µl por tubo de tampão **N** (acrescido de Inibidor de Proteases 1:100, N-etilmaleimido 20mM). A suspensão foi passada novamente em seringa de 1ml com agulha fina e submetida a rotação por 1 hora a 4°C. A mistura foi centrifugada a 15000g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante, correspondente à fração nuclear, foi transferido para novos tubos.

Após a extração, os lisados foram submetidos à eletroforese de proteínas e *Western Blotting*. Foram utilizados os anticorpos anti-GAPDH como marcador citoplasmático e anti-PIAS como marcador nuclear.

2.7 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Após 48 horas de transfecção, as células foram lavadas 2X com PBS 1X e fixadas por 20 minutos em p-formaldeído 4% (Polyscience) diluído em PBS a partir de uma solução estoque 16% no momento do uso. Após o tempo de fixação as células foram lavadas 3X com PBS abundante e permeabilizadas por 5 minutos em PBS 0.5% Triton X-100. As células foram então bloqueadas utilizando-se PBS 1% BSA (albumina bovina- SIGMA), 2.5% soro de cabra (SIGMA) por 1 hora a temperatura ambiente. Após o bloqueio as células foram incubadas com os respectivos anticorpos primários, preparados em PBS 0.1% BSA 01% Triton X-100, over night a 4°C. No dia seguinte as células foram lavadas 3X (5 minutos cada lavagem) com PBS e incubadas com os respectivos anticorpos secundários preparados em PBS 0.1% BSA 01% Triton X-100, por 1 hora a temperatura ambiente. Nos experimentos em que foram utilizados o marcador de núcleo To-PRO-3 (Invitrogen) ele foi adicionado junto com os anticorpos secundários na concentração final de 1µM por 1 hora. Após as incubações as células foram lavadas 3X (5 minutos cada lavagem) com PBS 1X. Quando não foram usadas as placas da MaTeck, as lamínulas foram montadas em lâminas utilizando-se HydroMount e então analisadas.

2.8 ANTICORPOS

Os anticorpos e as respectivas diluições utilizadas estão listados na Tabela 3

Tabela 3: Anticorpos utilizados

| Anticorpo | Fabricante | Diluição para Imunofluorescência | Diluição para Western Blotting |
|--|-------------------|---|---------------------------------------|
| Coelho anti-SUMO1 | Zymed | - | 1:1000 |
| Coelho anti-SUMO3 | Zymed | 1:100 | 1:1000 |
| camungongo anti-FLAG | SIGMA | 1:200 | 1:1000 |
| Coelho anti-FLAG | SIGMA | 1:200 | 1:1000 |
| camundongo anti-MYC | SIGMA | 1:300 | 1:1000 |
| galinha anti-MYC | ABCAM | 1:200 | 1:1000 |
| Coelho anti-STI1 | ILPC | 1:200 | 1:5000 |
| camundongo anti-PrPC | ILPC | 1:200 | 1:1000 |
| Camundongo anti-PrPc 8H4 | ABCAM | 1:100 | - |
| cabra anti-PIAS1 | Santa Cruz | 1:100 | 1:500 |
| cabra anti-PIASy | Santa Cruz | 1:100 | 1:500 |
| Coelho anti-Pc2 | ABCAM | - | 1:500 |
| Anti-UBC9 | Zymed | - | 1:1000 |
| Coelho anti-Phospho-Histone H2A.X (Ser139) | Cell signaling | 1:250 | - |
| Coelho anti-histona H3 | SIGMA | - | 1:5000 |
| camundongo anti-GAPDH | ABCAM | - | 1:5000 |
| Camundongo anti-HA | ABCAM | - | 1:1000 |
| Anti-coelho peroxidase | BioRad | - | 1:10 000 |
| Anti-camundongo peroxidase | SIGMA | - | 1:10 000 |
| Anti-cabra peroxidase | SIGMA | - | 1:10 000 |
| Anti-camundongo AF488 | INVITROGEN | 1:800 | - |
| Anti-camundongo AF633 | INVITROGEN | 1:800 | - |
| Anti-coelho AF546 | INVITROGEN | 1:800 | - |
| Anti-coelho AF633 | INVITROGEN | 1:800 | - |
| Anti-cabra AF633 | INVITROGEN | 1:800 | - |

ILPC = Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer; AF = Alexa Fluor

2.9 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS EM EXTRATOS DE CÉREBRO DE CAMUNDONGO

Foram utilizados extratos de diferentes regiões do cérebro de camundongos selvagens. Estes extratos foram produzidos por um dos estudantes de Pós-doutorado do laboratório e mantidos no freezer -80°C . Um total de $100\ \mu\text{g}$ de proteínas totais foram submetidas a eletroforese de proteínas e *Western Blotting* utilizando-se anticorpos específicos para as proteínas alvo.

2.10 ENSAIO DE CHOQUE TÉRMICO

Culturas primárias de astrócitos plaqueados em lâminas de microscopia e não transfectados ou transfectados com as construções alvo desejadas foram submetidos a um ensaio de Choque Térmico. Neste ensaio os astrócitos foram lavados com meio DMEM sem soro pré-aquecido a 40°C e incubados nas estufa a 43°C por 30 minutos. As placas controles foram tratadas da mesma maneira, porém incubadas a 37°C por 30 minutos. Após o período de incubação, as células foram lavadas uma vez com PBS e fixadas durante 20 minutos utilizando-se p-formaldeído 4% diluído em PBS. Seguiu-se então o protocolo de imunofluorescência e aquisição das imagens.

2.11 ENSAIO DE DANO AO DNA POR IRRADIAÇÃO

Cultura primária de astrócitos plaqueados em lâminas de microscopia e não transfectados ou transfectados com as construções alvo desejadas foram submetidos a um ensaio de dano ao DNA por irradiação. As placas foram submetidas a raio X na intensidade de 60 kvp por 5 minutos ou 50 kvp por 10 minutos no aparelho Faxitron RX-650. As células foram então imediatamente fixadas ou deixadas na estufa de CO_2 a 37°C por 30 minutos e 1 hora. Após o período de incubação as células foram fixadas durante 20 minutos utilizando-se p-formaldeído 4% diluído em PBS. Seguiu-se então o protocolo de imunofluorescência e aquisição das imagens.

2.12 AQUISIÇÃO DE IMAGENS

As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência confocal, Leica SP5, com objetivas de imersão em água (63 x 1.2 NA) e óleo (63 x 1.4 NA), utilizando o Software LAS AF LITE. Para excitar as preparações foram utilizados laser de argônio (458, 476, 488, 496 e 514 nm) e laser de hélio-neônio (543, 594 e 633 nm). A luz emitida foi selecionada por separação espectral, para cada comprimento de onda de excitação utilizado. Os comprimentos de onda de absorção e emissão dos anticorpos e marcadores fluorescentes utilizados neste trabalho estão listados na tabela 4.

Tabela 4: Comprimento de onda de absorção e emissão dos marcadores fluorescentes utilizados.

| Marcador fluorescente | Absorção (nm) | Emissão (nm) |
|------------------------------|----------------------|---------------------|
| Alexa-633 | 632 | 647 |
| Alexa-546 | 546 | 570 |
| Alexa-488 | 489 | 508 |
| EGFP | 484 | 510 |
| CFP | 434 | 477 |
| YFP | 514 | 527 |
| TO-PRO-3 | 642 | 661 |

2.13 ANÁLISE DAS IMAGENS

Para análise das imagens foram utilizados os seguintes programas: LAS AF LITE da Leica, LSM Image Browser da Zeiss, Metamorph e Adobe Photoshop.

2.14 QUANTIFICAÇÕES

As quantificações das imagens de microscopia foram feitas utilizando-se o programa Metamorph. A intensidade da fluorescência no núcleo e no citoplasma das células foram determinadas e normalizadas pelas respectivas áreas. Para corrigir as diferenças de expressão de STI1 em cada célula, a fluorescência normalizada do núcleo foi então dividida pela fluorescência normalizada do citoplasma.

No caso das quantificações de proteínas submetidas a *Western Blotting*, foi utilizado o software FluorChem Q e também Image J.

2.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas dos dados foram feitas utilizando-se o programa Sigma Stat e os gráficos foram feitos no Graph Pad.

3 OBJETIVOS

A primeira parte deste trabalho de tese teve como objetivo geral:

Estudar os mecanismos intracelulares que regulam as funções fisiológicas de STI1.

Objetivos específicos:

- 1- confirmar as interações de STI1 com seus novos ligantes identificados no screening de duplo híbrido, em células de mamíferos;
- 2- estudar, através de microscopia confocal, possíveis alterações na distribuição intracelular de STI1 na presença de SUMO1 ou SUMO3;
- 3- estudar, através de microscopia confocal, co-localização de STI1 e da E2 ligase Ubc9;
- 4- estudar, através de microscopia confocal, a co-localização de STI1 e das E3 ligases PIAS1, PIASy e Pc2;
- 5- investigar possíveis alterações na distribuição intracelular de STI1 e PrP^C em cultura primária de astrócitos, na presença das proteínas da via da SUMOilação;
- 6- identificar suborganelas positivas para STI1 endógena;
- 7- investigar a influência de certas condições de stresse sobre a distribuição intracelular de STI1.

4 RESULTADOS

4.1 CONFIRMAÇÃO DAS INTERAÇÕES DETECTADAS NA VARREDURA DE DUPLO HÍBRIDO

A STI1 é uma co-chaperonina que auxilia no enovelamento de proteínas através da sua interação com as chaperonas HSP90 e HSP70 (Song and Masison, 2005). Apesar de ser uma proteína citoplasmática, a STI1 é direcionada para o núcleo em fases específicas do ciclo celular, sendo este transporte regulado por cinases envolvidas neste evento (Longshaw et al., 2004). Ainda não se sabe qual a finalidade do direcionamento de STI1 para o núcleo bem como todos os mecanismos envolvidos neste transporte. Acredita-se, que assim como as chaperonas HSP70 e HSP90, a STI1 exerça funções específicas no núcleo.

Soares e colaboradores demonstraram que a STI1 interage com proteínas envolvidas na via de SUMOilação - um conhecido processo envolvido no transporte nuclear de diversas proteínas (revisto por Johnson, 2004). Estas interações foram vistas através de ensaio de duplo híbrido em leveduras. Para confirmar estas interações em células de mamíferos, nós realizamos ensaios de Co-Imunoprecipitação. Como mostrado anteriormente na introdução deste trabalho (Capítulo I, Tabela 1), a STI1 interage com várias proteínas de diferentes grupos. Tendo em vista a identificação de várias proteínas envolvidas na via de SUMOilação, nós decidimos explorar melhor estas interações. Dessa forma, o envolvimento nessa via foi um dos critérios usados para seleção das proteínas a serem analisadas.

Células HEK 293 foram co-transfectadas com STI1-HA e Ubc9-Flag, PIASy-Myc, PIAS1-Myc ou Pc2-Flag e lisadas utilizando-se um kit de extração de proteínas citoplasmáticas e nucleares. As frações nucleares e citoplasmáticas foram juntadas e incubadas com beads HA para precipitação de STI1. Após a liberação das proteínas das beads de HA, os extratos foram submetidos a eletroforese e *Western Blotting*, e as membranas reveladas para as proteínas ligantes de STI1. Apenas no caso de Pc2, foi utilizado beads de Flag para precipitação de Pc2 ao invés de STI1 devido a interação do tag Flag com as beads de HA (dados não mostrados). A figura 4 mostra o resultado das Co-Imunoprecipitações, confirmando a interação de STI1 com a SUMO E2 ligase Ubc9 e com as SUMO E3 ligases PIAS1, PIASy e Pc2.

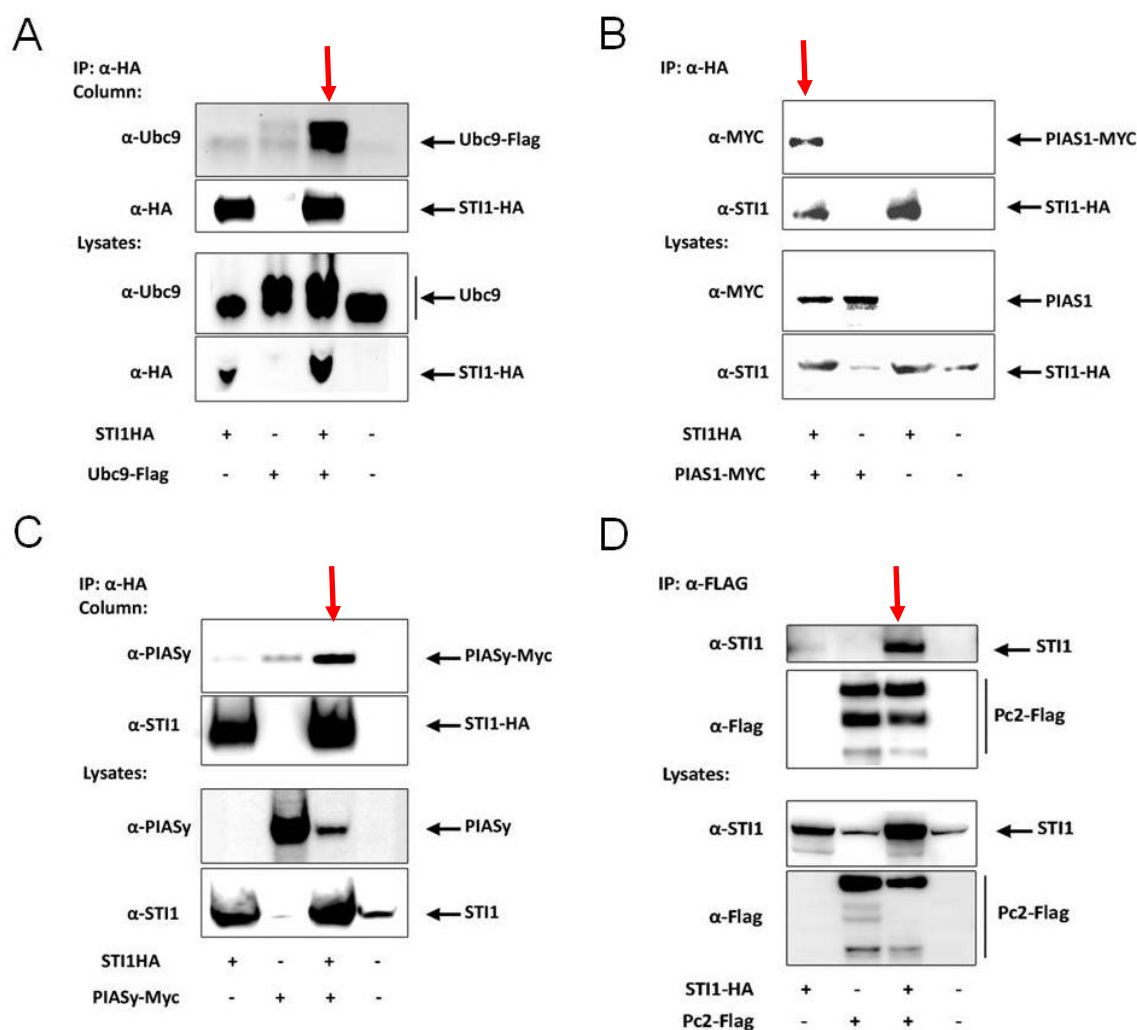


Figura 4: Confirmação da interação de STI1 com proteínas da via de SUMOilação em célula de mamíferos.

Células HEK 293 foram co-transfectadas com STI1-HA e Ubc9-Flag (A), PIAS1- Myc (B), PIASy-Myc (C) ou Pc2-Flag (D). O extrato total de proteínas foi incubado com beads de HA ou Flag, para precipitação de STI1 ou Pc2 respectivamente. Após o imunoblotting, as proteínas foram reveladas utilizando-se anticorpos anti-STI1 (Instituto Ludwig, 1:5000), anti-Ubc9 (Zymed, 1:1000), anti-PIAS1 ou anti-PIASy (Santa Cruz, 1:1000) e anti-Flag (Sigma, 1:1000). As setas apontam para as bandas referentes a Co-Imunoprecipitação dos ligantes de STI1. Os dois primeiros painéis de cada grupo representam as proteínas precipitadas pelas beads e os dois últimos painéis de cada grupo representam a expressão das proteínas nos lisados. A figura corresponde a imagens representativas de 5 experimentos independentes.

A confirmação da interação entre STI1 e as proteínas da via de SUMOilação em células de mamífero sugere que estas proteínas sejam encontradas em regiões comuns e interajam in vivo. De modo geral os componentes da via de SUMOilação são altamente conservados entre os eucariotos e são amplamente expressos no organismo (revisto por Johnson, 2004). Dados do Atlas Allen Brain

(<http://www.brain-map.org/>) contituem uma importante fonte de informação sobre a expressão gênica da maior parte das proteínas. Nós utilizamos este atlas para pesquisar a expressão gênica das proteínas da via de SUMOilação ligantes de STI1 (e da própria STI1) e vimos que com exceção de PIASy, os mRNAs para todas estas proteínas são expressos no cérebro, principalmente no hipocampo (Figura 5A). Estes dados estão de acordo com o trabalho de Hajj e colaboradores mostrando que STI1 apresenta uma expressão difusa pelo organismo, sendo observada desde o início do desenvolvimento (Hajj et al., 2009). Nós decidimos então avaliar a expressão protéica dos ligantes de STI1 no cérebro, e para isso nós realizamos *Immunoblotting* com extratos protéicos de diferentes regiões do SNC de camundongos selvagens (Figura 5B).

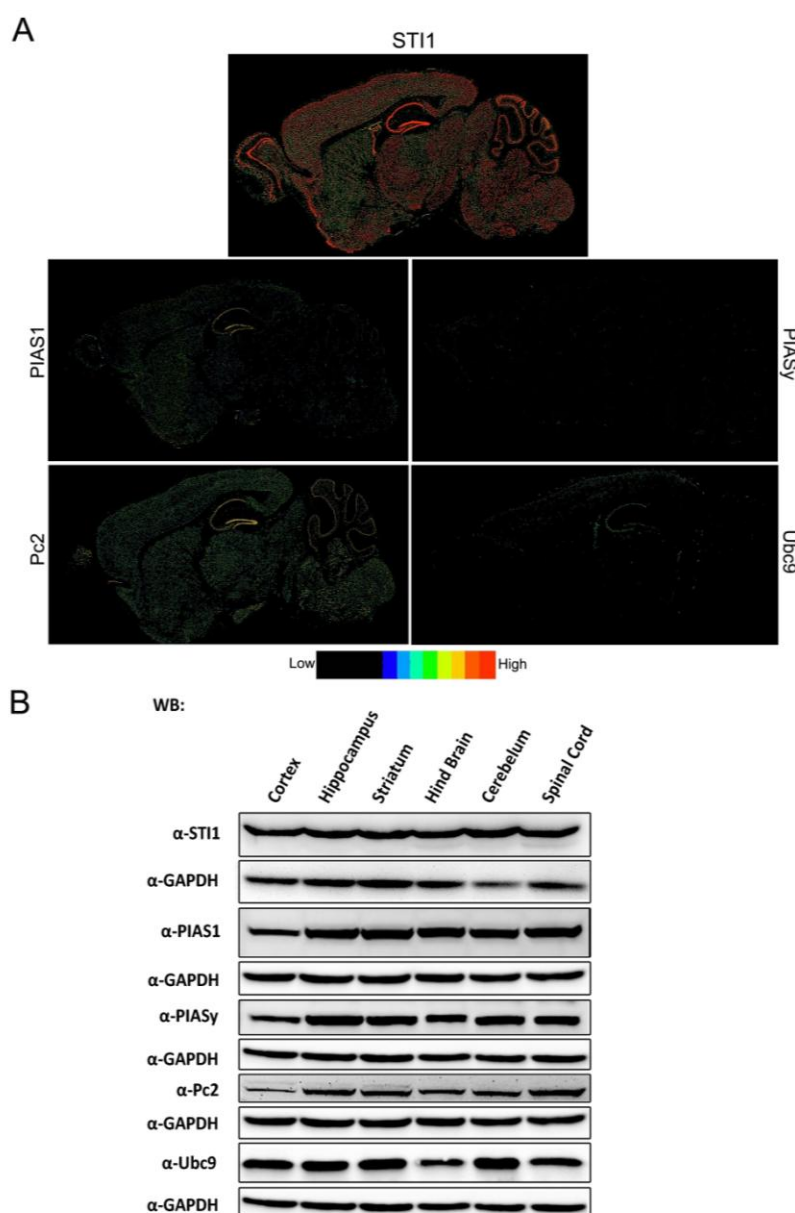


Figura 5: Avaliação da expressão de STI1 e seus ligantes em diferentes regiões do cérebro de camundongos.

A: Expressão gênica de STI1 e das proteínas PIAS, Pc2 e Ubc9 no cérebro de camundongos. A figura mostra a expressão dos mRNAs para as proteínas citadas analisadas através de hibridização *in situ*. As imagens corespondem a cortes sagitais do cérebro. Fonte: Allen Brain Atlas. **B:** Extratos protéicos de várias partes do SNC de camundongos foram submetidas a eletroforese e imunoblotting. A expressão das proteínas foi revelada utilizando-se anticorpos específicos. GAPDH foi utilizado como controle do carregamento do gel. A Figura corresponde a imagem representativa de 3 experimentos independentes.

A expressão de STI1 foi vista em todas as regiões do cérebro analisadas, assim como a expressão de seus ligantes. Estes resultados não invalidam a idéia de que estas proteínas possam interagir *in vivo*.

4.2 STI1 E AS PROTEÍNAS SUMO

A interação entre STI1 e as proteínas SUMO não foi vista no ensaio de duplo híbrido. Porém, a interação de STI1 com os outros componentes da via de SUMOilação sugere que STI possa ser modificada por esta via. De fato, Soares e colaboradores mostraram que STI1 é SUMOilada *in vitro* e *in vivo* por SUMO1 e SUMO2/3 (Anexos 1 e 2). As consequências da SUMOilação de proteínas podem ser diversas, desde modificação na localização intracelular a estabilidade (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007). Para investigar se os ligantes de STI1 encontram-se nos mesmo compartimentos celulares que esta co-chaperonina, e para determinar possíveis consequências da SUMOilação sobre as funções de STI1, nós começamos avaliando a distribuição intracelular dos componentes da via de SUMOilação. Para isso nós utilizamos a STI1 em fusão com diferentes proteínas fluorescentes como GFP, CFP ou YFP e os demais plasmídeos codificando para os ligantes de STI1, SUMO1 e SUMO3.

As proteínas SUMO correspondem a uma família de proteínas de 4 membros. SUMO1 é uma proteína de aproximadamente 11.6 kDa ubiquamente expressa que apresenta 47% de homologia com SUMO2 e 3. Já SUMO 2 e 3 diferem entre eles em apenas 3 resíduos, apresentando 97% de homologia (Martins et al., 2007). SUMO4 é a isoforma menos caracterizada e não foi utilizada neste trabalho. Para avaliarmos se SUMO encontra-se no mesmo compartimento que STI1 e se a

expressão das proteínas SUMO altera o padrão de distribuição celular de STI1, células PrP3F4 foram co-transfectadas com SUMO1-CFP e STI1-YFP ou SUMO3-Flag e STI1-YFP. Quarenta e oito horas após a transfecção as células foram fixadas em p-formaldeído e analisadas por microscopia confocal (Figura 6). Ao contrário do que se esperava, não houve alterações no padrão de localização celular de STI1 por SUMO1 (Figura 6, segundo painel), e há uma fraca co-localização entre estas proteínas no citoplasma. No entanto, observamos mudança na localização de SUMO1. Observa-se que o SUMO1-CFP torna-se bem menos citoplasmático e se organiza em forma de grumos no núcleo. Essa organização de SUMO1 mediada por STI1, sem alteração na distribuição da mesma, sugere que a STI1 pode estar envolvida na SUMOilação de outras proteínas.

Em relação a SUMO3, os resultados mostram um aumento na localização de STI1 no núcleo na presença dessa proteína. Esse aumento foi quantificado e é estatisticamente significativo quando comparado com células que não expressam SUMO3 recombinante. É possível que STI1 seja preferencialmente SUMOilada por SUMO3 em células PrP3F4.

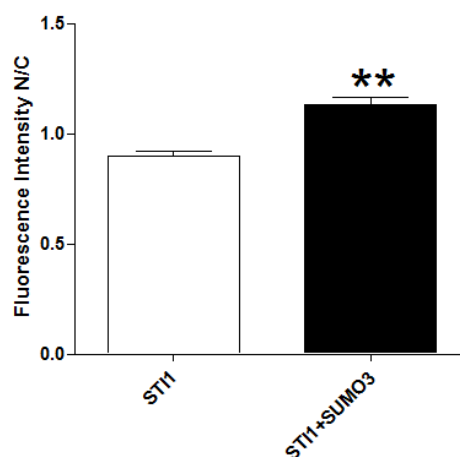
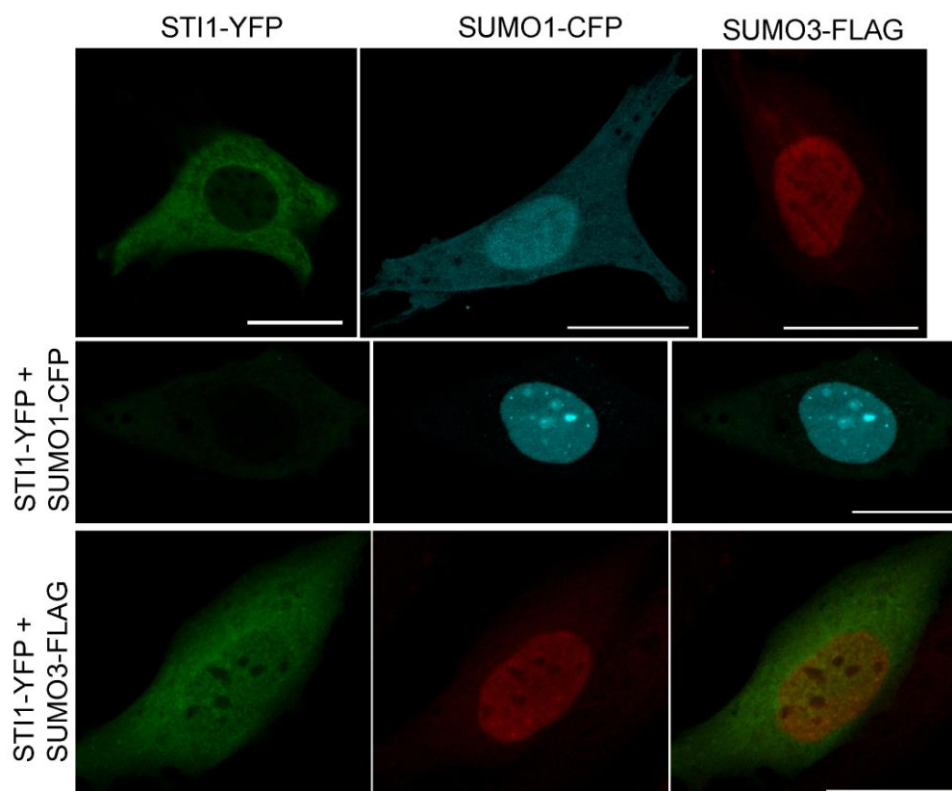


Figura 6: Avaliação da distribuição intracelular de STI1 na presença de SUMO1 e SUMO3.

Células PrP3F4 foram co-transfectadas com STI1-YFP e SUMO1-CFP ou STI1-YFP e SUMO3-Flag. O primeiro painel representa a expressão independente destas proteínas. O segundo painel corresponde a co-expressão de STI1 com SUMO1. Note a alteração no padrão de distribuição de SUMO1 induzido por STI1. As imagens correspondem a fatias óticas representativas de oito experimentos independentes. O terceiro painel corresponde a co-expressão de STI1 com SUMO3, onde observa-se alteração na distribuição de STI1. A quantificação da fluorescência nuclear foi feita no programa Metamorph e os resultados normalizados pela expressão citoplasmática de cada célula. Os resultados mostram a média \pm SD e foram comparados utilizando-se Test *t-student*. Foram utilizadas um mínimo de 80 células para quantificação. * representa diferença estatística, $p < 0.0001$. Barra: 20 μ m.

4.3 STI1 e Ubc9

Para determinar se STI1 e Ubc9 encontram-se nos mesmos compartimentos celulares nós estudamos a distribuição das duas proteínas por microscopia confocal. Além disso, dada a alteração de localização de STI1 por SUMO3, nós decidimos também fazer a mesma análise na presença de SUMO1 e SUMO3 co-expressando Ubc9. Ubc9 é a única E2 ligase para SUMOilação que se liga tanto a SUMO quanto ao substrato mediando a conjugação de várias proteínas. Esse processo algumas vezes acontece de forma independente da presença de E3 ligases (revisto por Johnson, 2004). Os resultados das microscopias mostram que Ubc9 se distribui principalmente no núcleo, com fraca expressão no citosol, onde parece se co-localizar com STI1 (Figura 7B). A co-expressão de Ubc9-YFP com STI1 não induziu alterações na distribuição intracelular de STI1, mesmo na presença de SUMO1 ou SUMO3 (Figura 7B, C, D). Estes resultados sugerem que a SUMOilação de STI1 pode depender da presença de alguma E3 ligase. Interessantemente, não houve alteração na distribuição de STI1 na presença de SUMO3 quando Ubc9 foi co-expressa (Figura 7, D). Tendo em vista a forte co-localização entre Ubc9 e SUMO3, é possível que haja o redirecionamento de SUMO3 para outros sítios celulares por Ubc9. Portanto a maior fração de Ubc9 não se localiza com STI1; como STI1 pode ser encontrada no núcleo em certas fases do ciclo celular, é possível que estas proteínas se encontrem nesta organela.

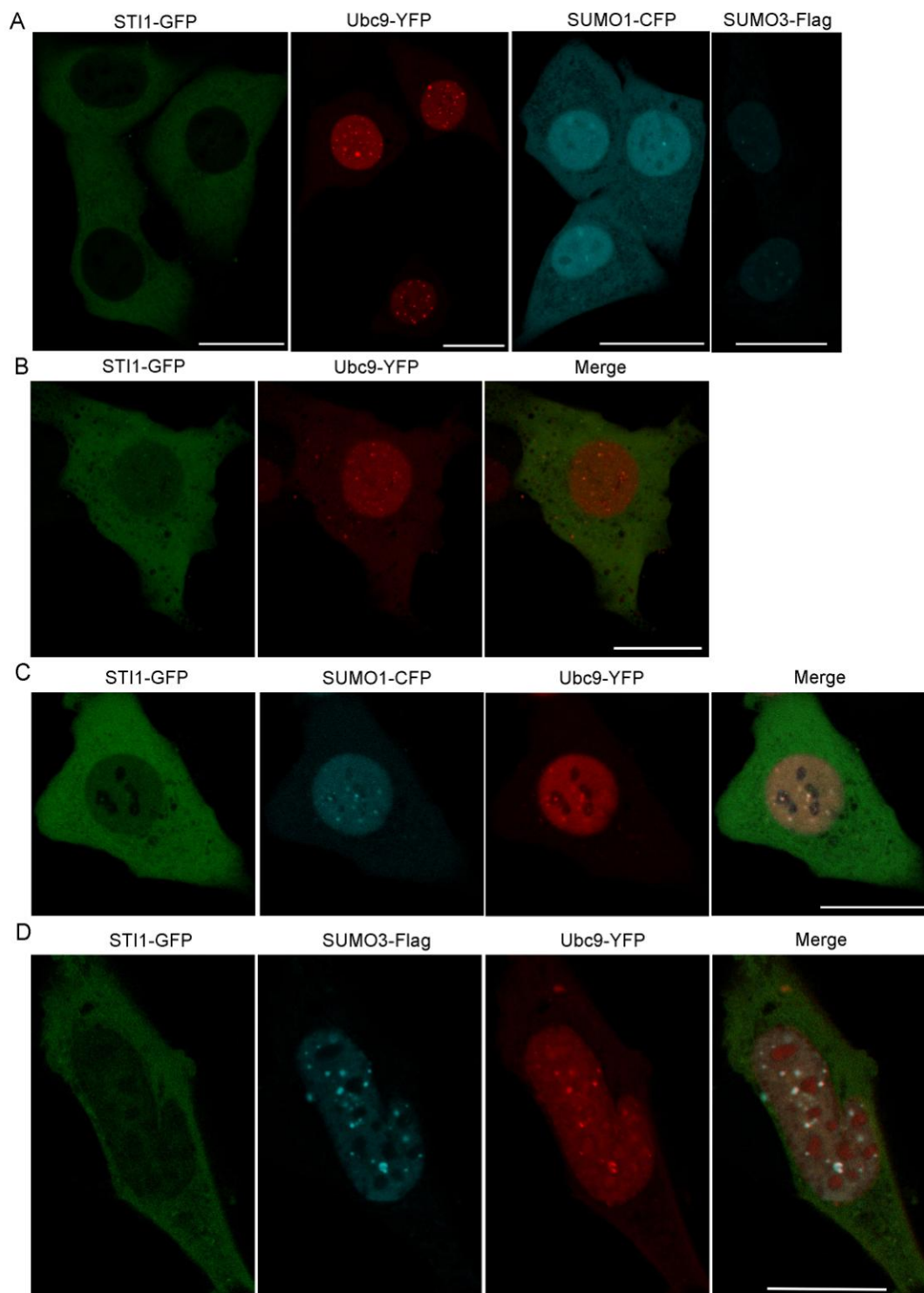


Figura 7: : Ubc9 não altera a distribuição intracelular de ST11.

Células PrP3F4 foram co-transfectadas com ST11-GFP e Ubc9-YFP na presença ou ausência de SUMO1-CFP ou SUMO3-Flag. O painel **A** representa a expressão independente destas proteínas. A super expressão de Ubc9 não alterou a distribuição intracelular de ST11 (**B**), mesmo quando SUMO1 (**C**) ou SUMO3 (**D**) foram expressos. Note a forte co-localização entre Ubc9 e as proteínas SUMO (**C** e **D**). As imagens correspondem a fatias óticas representativas de 4 experimentos independentes.

4.4 STI1 e PIAS

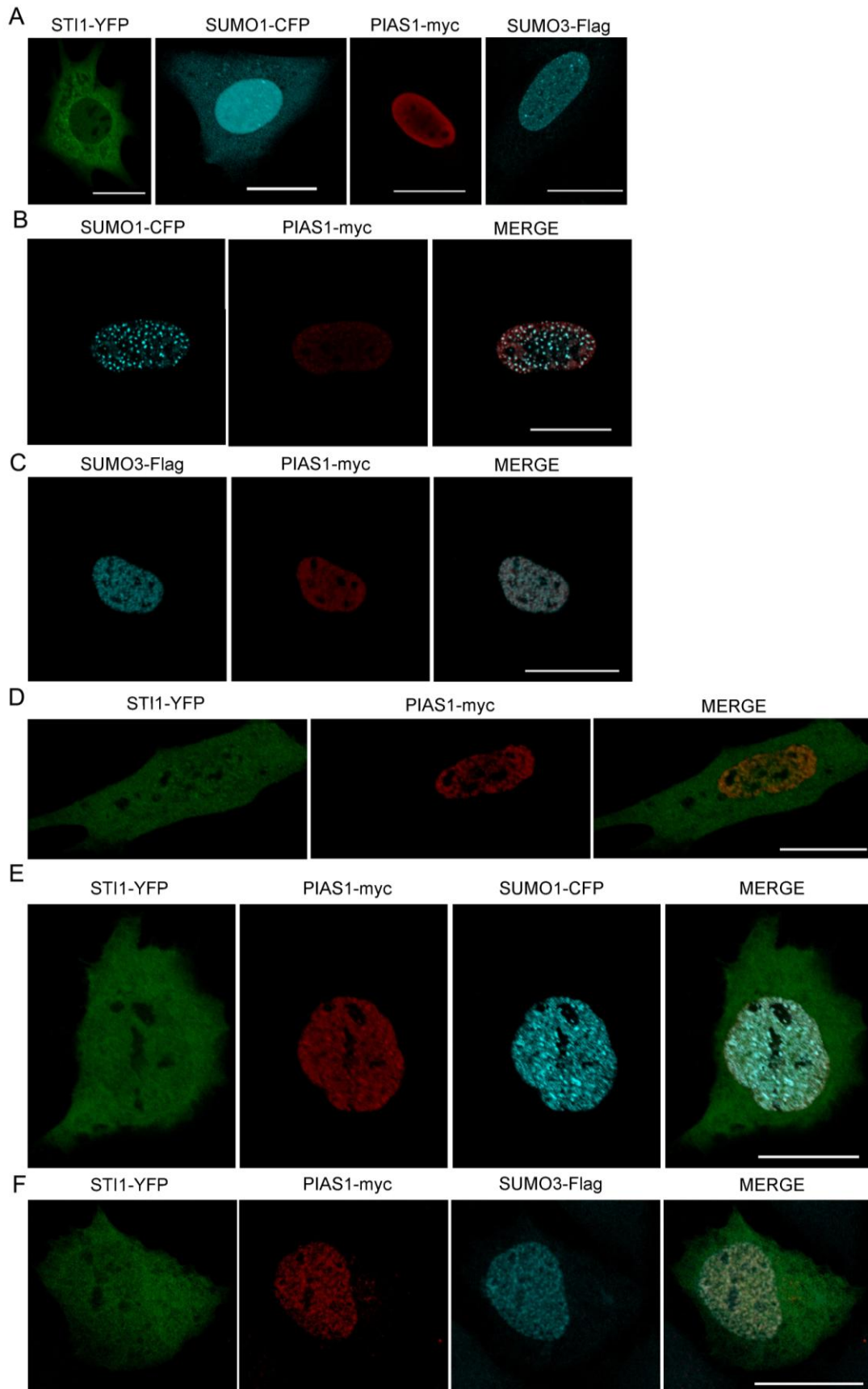
Entre os ligantes de STI1 identificados no ensaio de duplo híbrido estão as proteínas PIAS. Esta família de proteínas identificadas inicialmente como inibidores de fatores STAT, também atua como E3 ligase na via de SUMOilação (Palvimo, 2007). Trata-se de uma família constituída por quatro membros - PIAS1, PIASx, PIAS3 e PIASy – envolvidos na SUMOilação de vários fatores de transcrição.

Sabe-se que as E3 ligases, apesar de não serem necessárias para SUMOilação de várias proteínas, podem aumentar consideravelmente a eficiência desse processo. Nós novamente avaliamos a co-localização entre STI1 e as E3 ligases identificadas no duplo híbrido: PIAS1, PIASy e Pc2, e a distribuição intracelular de STI1 na presença destas proteínas.

Células PrP3F4 foram co-transfectadas com STI1-YFP e PIAS1 (Figura 8) ou PIASy (Figura 9) na ausência e presença de SUMO. As células foram imunomarcadas com anticorpo anti-myc e analisadas no microscópio confocal. A co-expressão de PIAS1 com SUMO1 ou SUMO3 altera o padrão de distribuição destas proteínas (Figura 8B e C). Tanto PIAS1 quanto SUMO deixam de apresentar expressão difusa e passam a se colocalizar em pequenos grânulos espalhados por todo o núcleo. Essas alterações já foram descritas na literatura e correspondem ao direcionamento de SUMO por PIAS para sítios ativos de SUMOilação (Yamamoto et al., 2003; Ihara et al., 2005; Galanty et al., 2009; Morris et al., 2009).

PIAS1 não formou grânulos na presença de STI1, mas aumentou a localização de STI1 no núcleo por si só e na presença de SUMO1 ou de SUMO3 (Figura 8E, F e G). Observou-se a co-localização entre STI1 e PIAS1 no núcleo. Estes resultados sugerem que PIAS1 esteja envolvida na SUMOilação de STI1, atuando como uma E3 ligase nesse processo. É interessante notar que o translocação de STI1 para o núcleo na presença de PIAS1 e SUMO3 foi maior do que aquele visto somente na presença de SUMO3 (gráficos das figuras 6 e 8). Da mesma forma, o translocação de STI1 para o núcleo mediado por SUMO1 só acontece quando PIAS1 é super expressa. Estas observações mais uma vez implicam PIAS1 como E3 ligase para SUMOilação de STI1, responsável pelo aumento da eficiência deste processo.

Apesar de haver redundância quanto a SUMOilação de substratos pelas diferentes E3 ligases, existe uma certa especificidade entre as proteínas PIAS (Palvimo, 2007; Galanty et al., 2009). Nós decidimos então testar se PIASy também se co-localiza com ou altera a distribuição intracelular de STI1. Assim como nos experimentos com PIAS1, na presença de PIASy as proteínas SUMO formaram vários grânulos espalhados por todo núcleo. Porém, ao contrário de PIAS1, a PIASy não foi recrutada para os grânulos positivos para SUMO1. Talvez essa diferença se deva ao fato de PIASy ser mais restritiva quanto a sua atividade de E3 ligase, exercendo vários efeitos independentes de SUMOilação (Zhou et al., 2008).



G

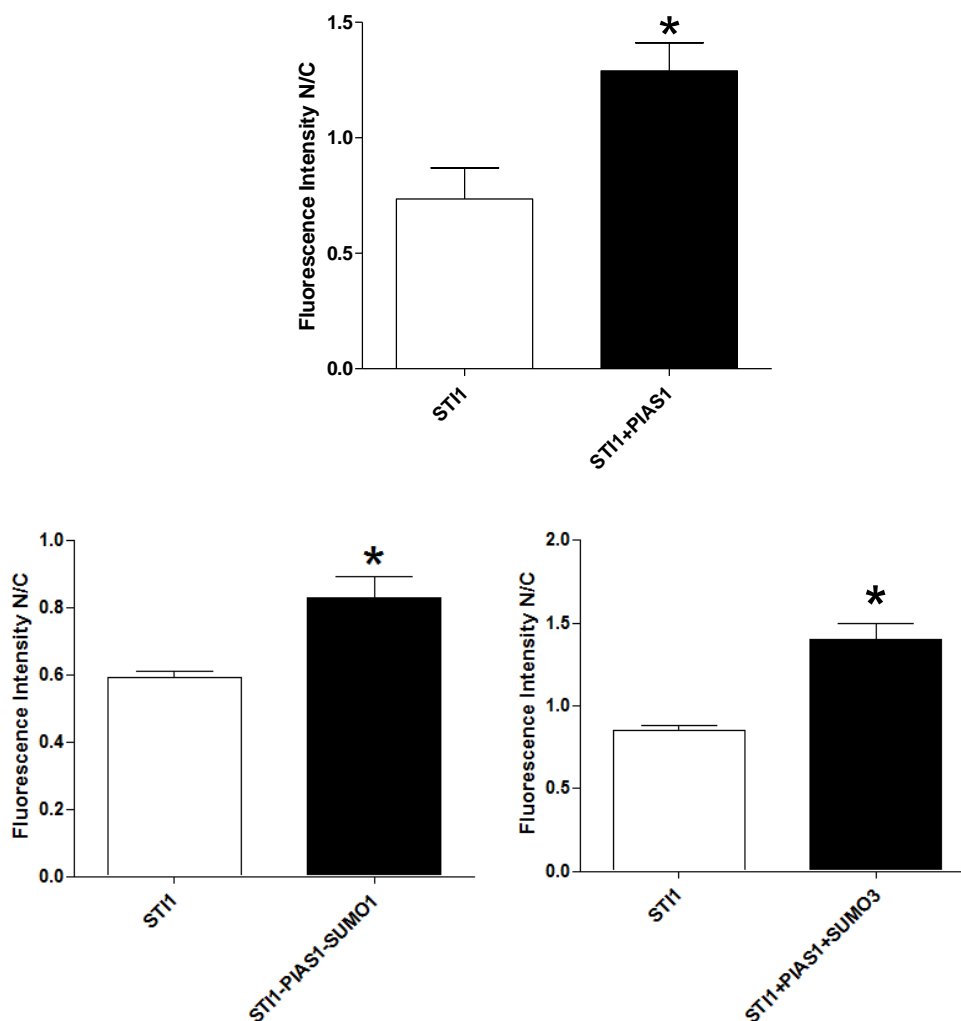
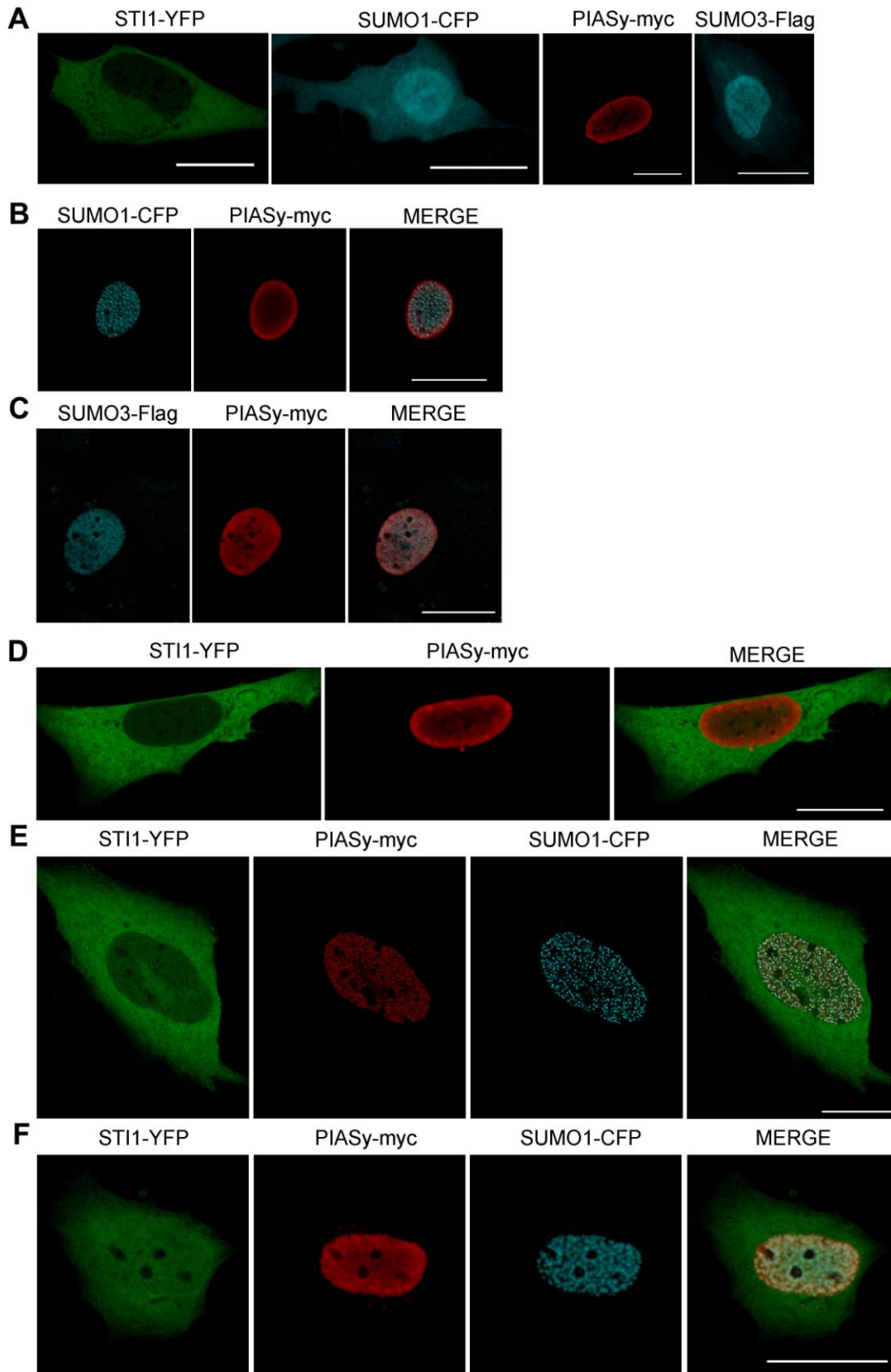


Figura 8: Alteração na distribuição intracelular de STI1 induzida por PIAS1.

Células PrP3F4 foram co-transfectadas com STI1-YFP e PIAS1-myc (D) e STI1-YFP, PIAS1-myc e SUMO1-CFP (E) ou SUMO3-Flag (F). Após quarenta e oito horas as células transfectadas foram submetidas a imunomarcação utilizando-se os anticorpos anti-myc para detecção de PIAS1 (Sigma, 1:100) e anti-Flag para detecção de SUMO3 (Sigma, 1:200). O painel A representa a expressão independente das proteínas alvo. A co-transfecção de PIAS1 com SUMO1 (B) ou SUMO3 (C) foi utilizada como controle do experimento. PIAS1 induziu aumento na expressão de STI1 no núcleo por si só, e também na presença de SUMO1 ou SUMO3 (D, E, F). A quantificação da fluorescência nuclear foi feita no programa Metamorph e os resultados normalizados pela expressão citoplasmática de cada célula. Os resultados mostram a média \pm SD de 4 experimentos independentes e foram comparados utilizando-se Test *t-student*. Foram utilizadas um mínimo de 50 células para quantificação. * representa diferença estatística, $p < 0.0053$ para STI1 e PIAS1; $p < 0.0002$ para STI1, PIAS1 e SUMO1; $p < 0.0001$ para STI1, PIAS1 e SUMO3. Barra: 20 μ m.



G

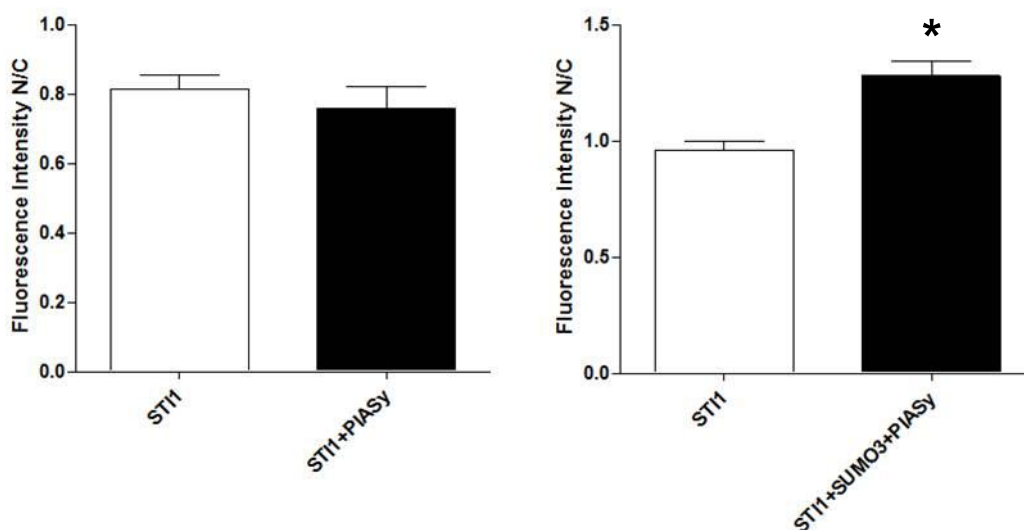


Figura 9: Avaliação da distribuição intracelular de STI1 na presença de PIASy.

Células PrP3F4 foram co-transfectadas com STI1-YFP e PIASy-myc (D) e STI1-YFP, PIAS1-myc e SUMO1-CFP (E) ou SUMO3-Flag (F). Após quarenta e oito horas as células transfectadas foram submetidas a imunomarcação utilizando-se os anticorpos anti-myc para detecção de PIASy (Sigma, 1:100) e anti-Flag para detecção de SUMO3 (Sigma, 1:200). O painel A representa a expressão independente das proteínas alvo. A co-transfecção de PIASy com SUMO1 (B) ou SUMO3 (C) foi utilizada como controle do experimento. PIASy só produziu alteração na distribuição de STI1 na presença de SUMO3 (F). A quantificação da fluorescência nuclear foi feita no programa Metamorph e os resultados normalizados pela expressão citoplasmática de cada célula. Os resultados mostram a média \pm SD de 4 experimentos independentes e foram comparados utilizando-se Test *t-student*. Foram utilizadas um mínimo de 40 células para quantificação. * representa diferença estatística, $p < 0.0007$. Barra: 20 μ m.

Diferente do observado para PIAS1, a expressão de PIASy por si só ou na presença de SUMO1 não levou ao aumento da localização de STI1 no núcleo (Figura 9D, E). Esses resultados sugerem especificidade de PIAS1 como E3 ligase para STI1. A co-expressão de PIASy e SUMO3 levou ao translocação de STI1 para o núcleo (Figura 9F). Porém, como SUMO3 por si só já altera a distribuição de STI1 é provável que esse efeito não tenha sido mediado por PIASy e sim por SUMO3.

É interessante notar que PIASy teve a sua distribuição alterada em células co-transfectadas com STI1 e SUMO. Comparado com seu padrão de distribuição sozinha ou na presença de SUMO1, quando STI1 foi super expressa PIASy formou vários grânulos que se distribuíram por todo núcleo, co-localizando com SUMO1. Tendo em vista que PIASy pode ser modificada por SUMO1 (Ihara et al., 2005), é possível que STI1 esteja participando desse processo.

4.5 STI1 e Pc2

Outra E3 ligase identificada no ensaio de duplo híbrido como ligante de STI1 é a Pc2. A proteína policomb 2 (Pc2) é parte de um complexo multimérico denominado corpos dos grupos policomb (corpos PcG), que são sítios de SUMOilação envolvidos na repressão da expressão de diversos genes (Wotton e Merril, 2007). Para avaliar se Pc2 e STI1 co-localizam em células PrP3F4, utilizamos novamente microscopia confocal. A localização de Pc2 é nuclear e bem distinta da localização de STI1. Por outro lado como as E3 ligases parecem recrutar SUMO e talvez STI1 para o núcleo, nós também testamos se Pc2, recruta STI1 para os corpos PcGs. Nesses experimentos células PrP3F4 foram co-transfectadas com STI1 e Pc2-Flag na ausência e presença de SUMO1. As células foram imunomarcadas com anticorpo anti-Flag e analisadas no microscópio confocal.

A co-expressão de Pc2 com SUMO1 alterou a localização subcelular de SUMO1, recrutando-o para grandes focos nucleares características dos corpos PcGs (Figura 10B). Este resultado já foi demonstrado por Kagey e colaboradores (2003) em um trabalho onde estes pesquisadores caracterizaram Pc2 como uma SUMO E3 ligase. A co-expressão de Pc2 com STI1 parece aumentar a quantidade de grânulos formados por Pc2, mas não altera o padrão de distribuição celular de STI1 (Figura 10C). Mesmo na presença de SUMO1, Pc2 não recruta STI1 para os corpos PcGs (Figura 10D), sugerindo que esta E3 ligase não deve estar envolvida na SUMOilação de STI1. Tendo em vista que Pc2 é modificada por SUMO1 (Kagey et al., 2003), seria interessante avaliar se STI1 está envolvida neste processo.

Não foi possível avaliar alterações na distribuição celular de STI1 na presença de Pc2 e SUMO3 porque infelizmente ambos os plasmídeos possuem o tag Flag.

4.6 FRACIONAMENTO SUBCELULAR

Os resultados apresentados até aqui sugerem que a SUMOilação de STI1 leva à alteração na sua distribuição intracelular, e também apontam PIAS1 como uma E3 ligase específica para STI1. Para confirmar o direcionamento de STI1 para o núcleo promovido pelos componentes da via de SUMOilação, nós realizamos um

fracionamento subcelular para isolarmos proteínas nucleares e citoplasmáticas e avaliamos a expressão de STI1 nestas frações.

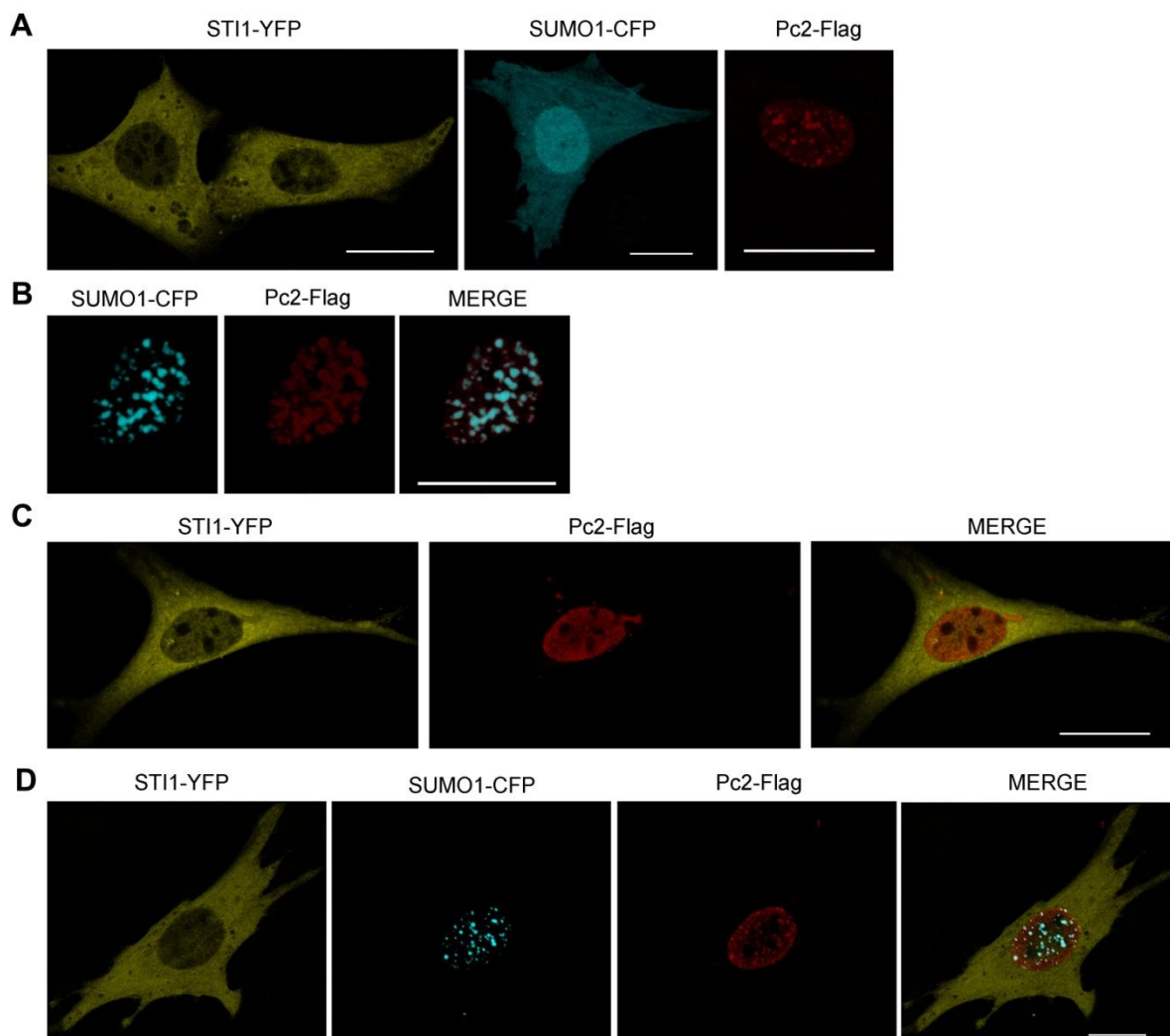


Figura 10: Avaliação da distribuição celular de STI1 na presença de Pc2.

Células PrP3F4 foram co-transfectadas com STI1-YFP, Pc2-flag e SUMO1-CFP. Após quarenta e oito horas as células transfectadas foram submetidas a imunomarcagem utilizando-se o anticorpo anti-flag para detecção de Pc2 (Sigma, 1:100). As imagens em (A) correspondem ao padrão de expressão das construções indicadas. A co-expressão de Pc2 com SUMO1 levou a formação de grandes estruturas em forma de anéis (B), enquanto a co-expressão de Pc2 com STI1 apenas aumentou a quantidade dos grânulos vistos nas células controle (C). Não observa-se alteração no padrão de distribuição celular de STI1 em células co-expressando Pc2 e SUMO1 (D). As imagens correspondem a fatias óticas representativas de seis experimentos independentes. Barra: 20 μ m.

Este fracionamento foi realizado utilizando-se um kit específico da Millipore e a pureza das frações quanto à presença de proteínas de outros compartimentos foi avaliada através de *Imunoblotting*.

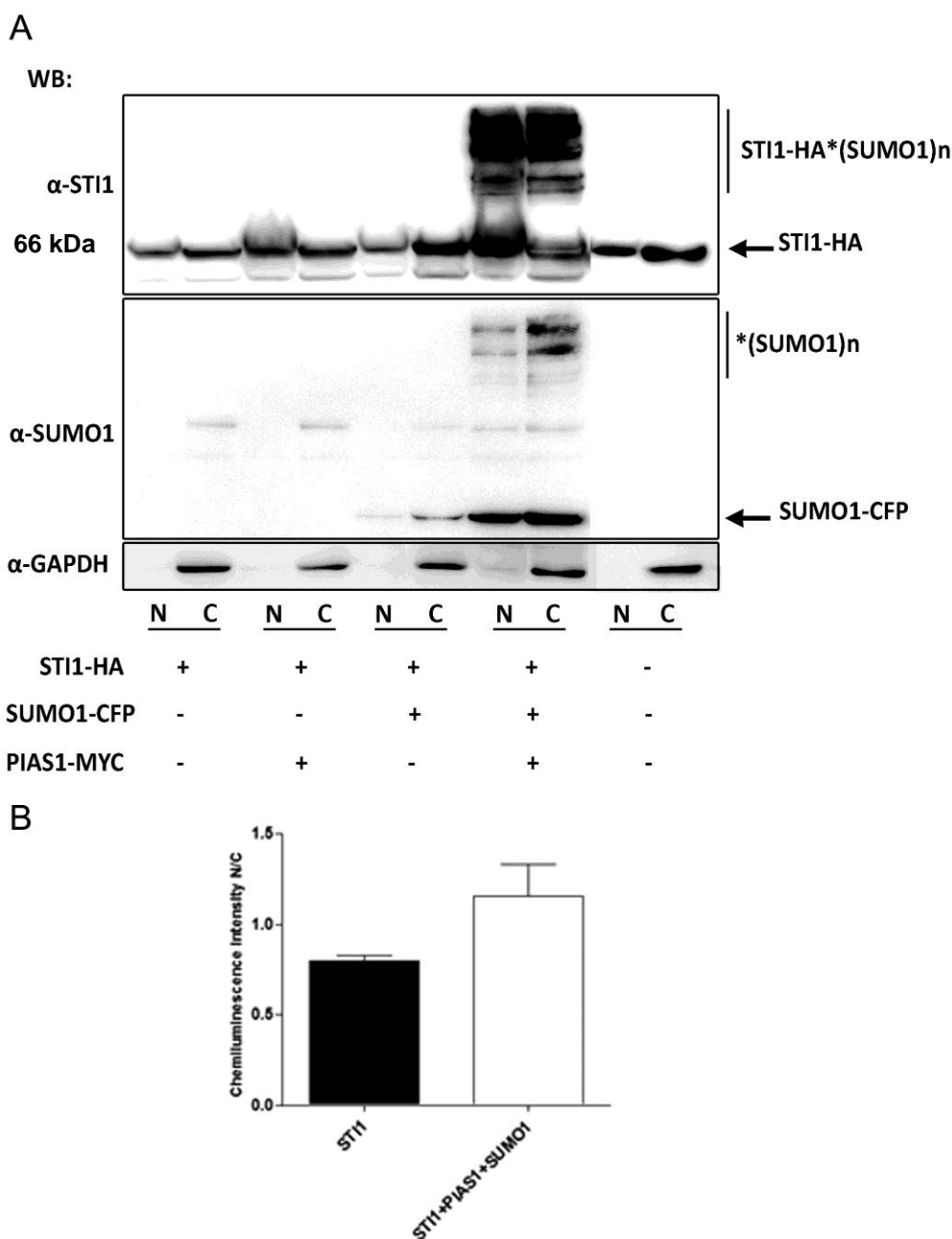


Figura 11: Avaliação da distribuição intracelular de STI1 por fracionamento celular na presença de SUMO1.

Células HEK 293 foram co-transfectadas com STI1-HA, SUMO1-CFP e PIAS1-Myc de acordo com o indicado no painel inferior da figura A. As células foram lisadas utilizando-se um kit de fracionamento celular (Millipore) e as frações nucleares e citosólicas foram submetidas a eletroforese e imunoblotting. A expressão das proteínas foi avaliada utilizando-se anti-STI1 (Instituto Ludwig, 1:5000), anti-SUMO1 (Zymed, 1:1000) e anti-GAPDH (Abcam, 1:5000). As bandas de alto peso molecular mostradas nos painéis 1 e 2 de **A** representam proteínas SUMOiladas. A co-expressão de PIAS1 e SUMO1 tende a induzir uma aumento na expressão nuclear de STI1. Os imunoblottings foram quantificados através do software FluoroChem (Alpha Innotech GE) e a expressão nuclear normalizada pela expressão citoplasmática. Os resultados mostram a média \pm SD de 4 experimentos independentes e foram comparados utilizando-se Test *t-student*. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os dados. N = fração nuclear, C = fração citosólica.

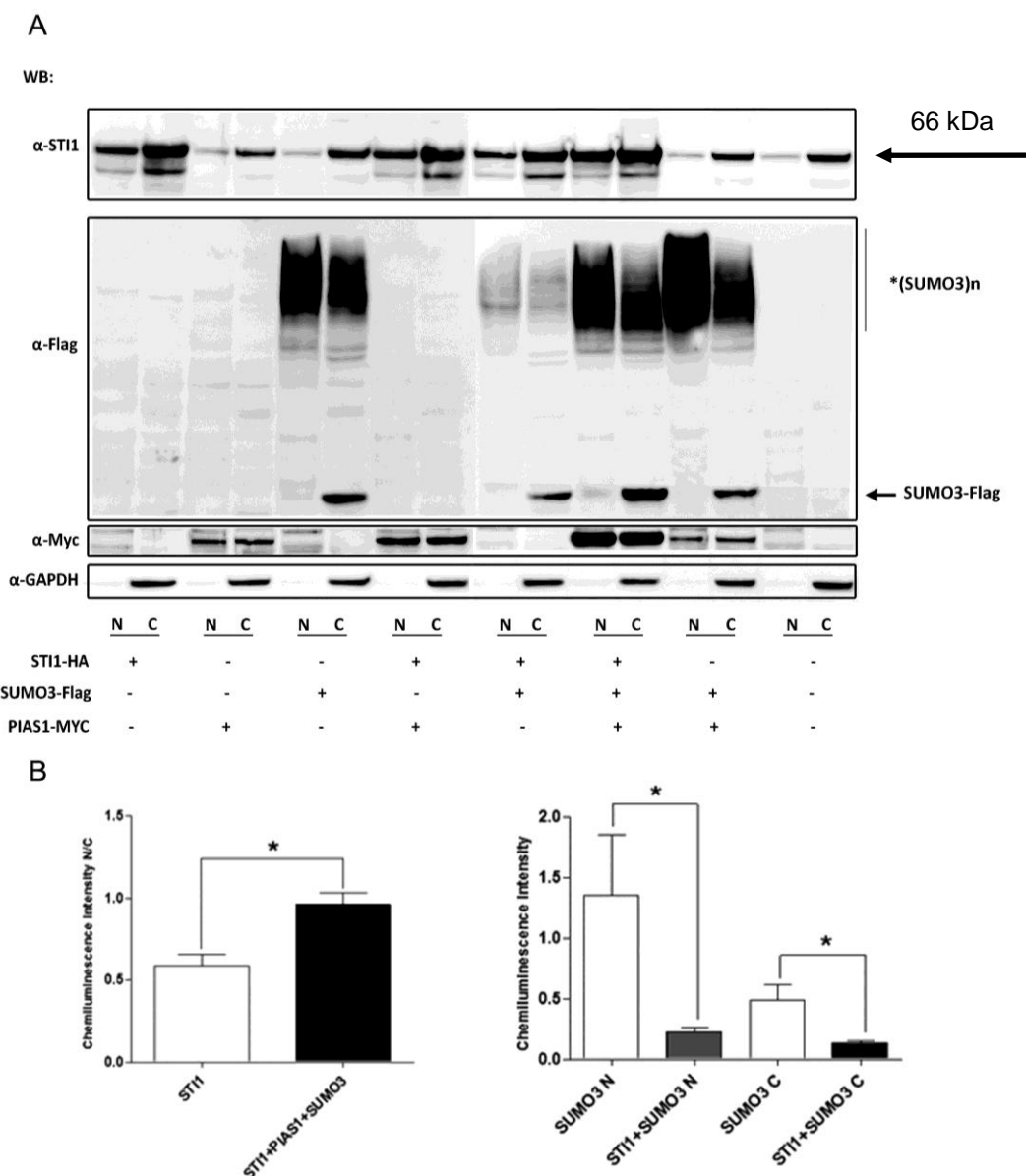


Figura 12: Avaliação da distribuição intracelular de STI1 por fracionamento celular na presença de SUMO3.

Células HEK foram co-transfectadas com STI1-HA, SUMO3-Flag e PIAS1-Myc de acordo com o indicado no painel inferior da figura A. As células foram lisadas utilizando-se um kit de fracionamento celular (Millipore) e as frações nucleares e citosólicas foram submetidas a eletroforese e imunoblotting. A expressão das proteínas foi avaliada utilizando-se anti-STI1 (Instituto Ludwig, 1:5000), anti-SUMO3 (Zymed, 1:1000), anti-Myc (Sigma, 1:1000) e anti-GAPDH (Abcam, 1:5000). As bandas de alto peso molecular mostradas no painel 2 de **A** representam proteínas SUMOiladas. A co-expressão de PIAS1 e SUMO3 induziram um aumento na expressão nuclear de STI1-HA. **B**, Os imunoblottings foram quantificados através do software FluoroChem (Alpha Innotech GE) e a expressão nuclear normalizada pela expressão citoplasmática. Os resultados mostram a média \pm SD de 4 experimentos independentes e foram comparados utilizando-se Test *t-student*. * representa diferença estatística, $p < 0.022$. O segundo gráfico representa a quantificação da expressão de SUMO3 no núcleo e no citosol na presença ou não de STI1. Os resultados mostram a média \pm SD de 4 experimentos independentes e foram comparados utilizando-se Mann Whitney Rank-Sum Test, $p < 0.029$ para os dois testes. N = fração nuclear, C = fração citosólica.

GAPDH foi utilizado como marcador citoplasmático. Nós tentamos utilizar histona como marcador nuclear, porém o anticorpo que tínhamos (anti-H3, Sigma, 1:5000) reconheceu uma pequena fração de histona no citoplasma. Isso pode ser devido à contaminação da fração citoplasmática com proteínas nucleares ou porque de fato algumas histonas podem ser encontradas no citosol (Barman et al., 2008). O uso de GAPDH entretanto foi suficiente para mostrar que as frações nucleares não foram contaminadas com frações citosólicas durante a extração. A expressão de STI1-HA mostra a presença de uma pequena fração nuclear independente da expressão dos componentes da via de SUMOilação. A co-expressão de STI1 com SUMO1 ou PIAS1 isoladamente não alterou sua distribuição intracelular, apesar de notarmos uma tendência ao aumento da localização nuclear de STI1 quando PIAS1 é expressa. Porém, como observado nos experimentos de microscopia confocal em células PrP3F4, a co-expressão de SUMO1 e PIAS1 levou à SUMOilação de STI1 que pode ser observada pela presença das bandas de alta massa molecular detectadas por *Immunoblotting*. Interessantemente, a STI1 SUMOilada é encontrada tanto no núcleo quanto no citosol. Quando comparamos a relação N/C (núcleo/citosol) da STI1 livre (banda de 66 kDa) com o respectivo controle sem a presença de SUMO e PIAS1, nós não observamos diferença estatisticamente significativa. Porém, na presença de SUMO1 e PIAS1 mas não nos controles, nós observamos as bandas de alta massa molecular nos *Immunoblottings* tanto no citosol quanto no núcleo. Portanto, podemos seguramente concluir que SUMO1 e PIAS1 alteram a distribuição intracelular de STI1.

Em relação a SUMO3, há vários pontos interessantes a serem ressaltados. Durante a realização deste experimento nós não fomos capazes de observar a presença das bandas de alto peso molecular, indicativas da SUMOilação de STI1. Isso nos levou a questionar se realmente STI1 era SUMOilada por SUMO3. Porém alguns meses depois, a estudante de doutorado do nosso laboratório, Iaci Soares, conseguiu detectar estas bandas utilizando duas abordagens: imuno-precipitação de STI1 na presença de SUMO3 e PIAS1 ou sonicação dos lisados durante a extração. Esses achados confirmam que STI1 é de fato SUMOilada por SUMO3 e sugerem que o não aparecimento das bandas SUMOiladas no fracionamento celular seja devido a limitação técnica. De qualquer maneira, foi ainda possível observar um

aumento significativo da expressão de STI1 no núcleo induzido por SUMO3 e PIAS1.

Outra interessante observação é a alteração da SUMOilação de proteínas totais por STI1. As bandas de alto peso molecular reveladas com anticorpo anti-SUMO3 correspondem à um aglomerado de diversas proteínas SUMOiladas. Quando comparamos estas bandas nas células transfectadas com STI1 e SUMO3 com seus controles expressando somente SUMO3 ou mesmo na presença de PIAS, nós observamos uma significativa diminuição da SUMOilação de proteínas totais induzida por STI1 (Figura 12A, segundo painel). Os resultados da quantificação mostram que a SUMOilação tanto das proteínas nucleares quanto das citoplasmáticas foram diminuídas por STI1.

4.7 INFLUÊNCIA DA SUMOILAÇÃO DE STI1 EM ASTRÓCITOS

Lima e colaboradores (Lima et al., 2007) mostraram que a STI1 é secretada por astrócitos, podendo atuar como fator neurotrófico para os neurônios adjacentes e como fator autócrino em astrócitos. Tendo em vista a importância dos astrócitos para proteção e sobrevivência neuronal e a necessidade de se esclarecer os fatores que regulam as funções intracelulares de STI1 nestas células, nós decidimos estudar a SUMOilação de STI1 neste modelo celular. Além disso, ao estudarmos a localização de STI1 em astrócitos nós poderíamos confirmar se os dados observados nas linhagens celulares seriam relevantes para células primárias.

Culturas primárias de astrócitos foram transfectadas com STI-YFP, PIAS1-Myc, SUMO1-CP e SUMO3-Flag individualmente ou em diversas combinações (Figura 13). O padrão de distribuição de STI1 nestas células se assemelha ao visto em células PrP3F4. PIAS1 por si só induziu um forte aumento da localização de STI1 no núcleo, assim como visto nas células PrP3F4 (Figura 8). STI1 quando expressa apenas com SUMO1 ou SUMO3, não sofreu alteração em sua distribuição intracelular. Porém, quando PIAS1 foi também co-expressa, observou-se um aumento pronunciado de STI1 no núcleo e sua co-localização com PIAS1. Por outro lado SUMO3 não alterou a localização de STI1 como observado anteriormente em células PrP3F4.

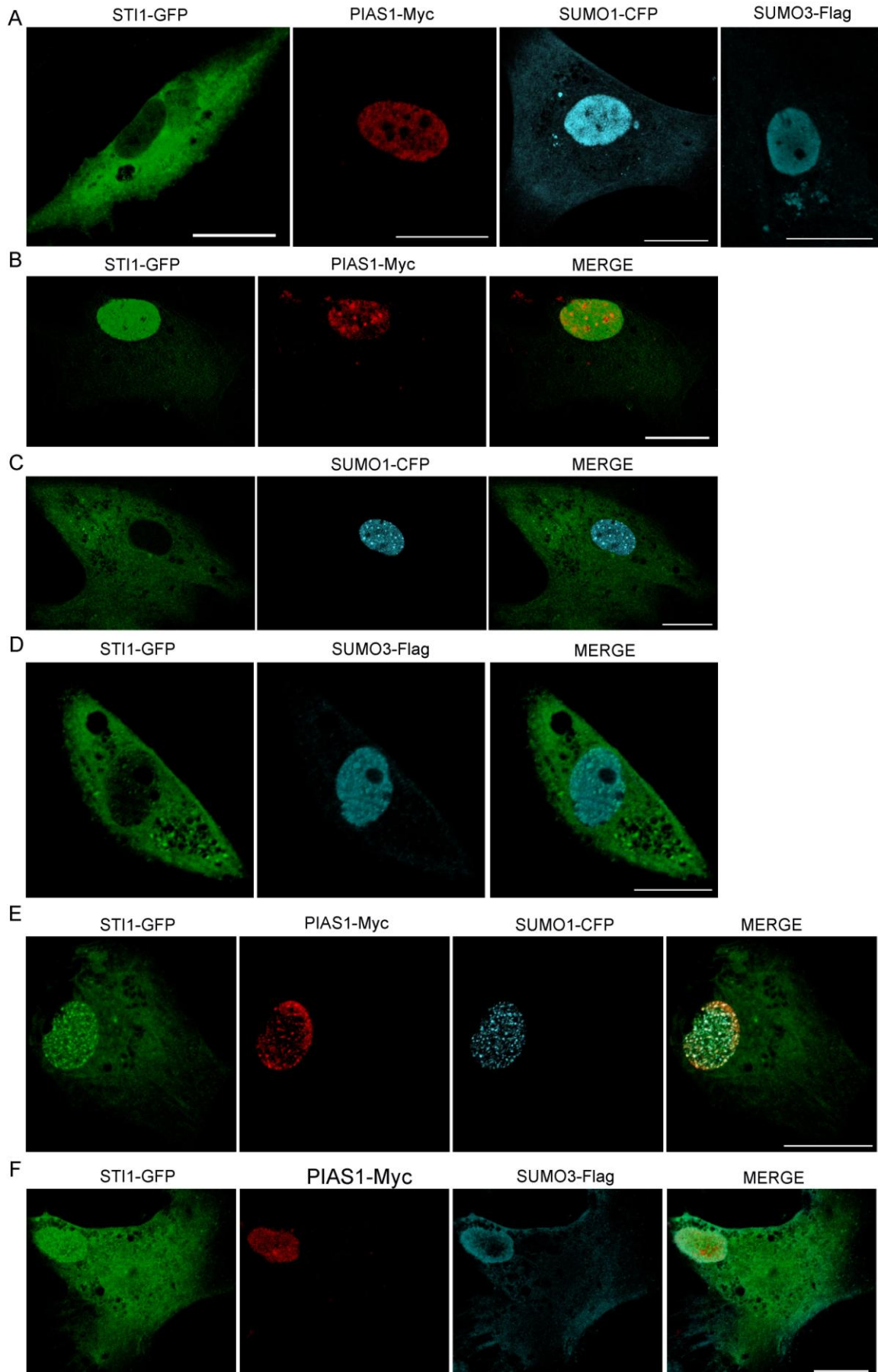


Figura 13: Distribuição intracelular de STI1-YFP em astrócitos na presença de componentes da via de SUMOilação.

Culturas primárias de astrócitos foram co-transfectadas com STI1-YFP, PIAS1-Myc, SUMO1-CFP e SUMO3-Flag. Após quarenta e oito horas de transfecção os astrócitos foram submetidos a imunomarcação utilizando-se os anticorpos anti-myc para detecção de PIAS1 (Sigma, 1:100) e anti-Flag para detecção de SUMO3 (Sigma, 1:100). O painel **A** representa a expressão independente das proteínas em estudo. Os painéis **B**, **C** e **E** mostram o padrão de distribuição de STI1-YFP na presença de PIAS1, SUMO1 e SUMO3 respectivamente. PIAS1 induziu um forte aumento da localização de STI1-YFP no núcleo (**B**). SUMO1 ou SUMO3 só alteraram a distribuição intracelular de STI1-YFP na presença de PIAS1 (**D**, **F**). As imagens correspondem a fatias óticas representativas de quatro experimentos independentes.

Estes resultados mostram que a expressão de PIAS1 também altera a distribuição de STI1 em astrócitos, e portanto pode ser um processo importante para regular as funções de STI1 nestas células. Para avaliarmos essa hipótese, primeiramente nós investigamos se STI1 endógena também é alterada por PIAS1 ou SUMOs. Os mesmos experimentos descritos acima foram realizados, porém sem a superexpressão de STI1. Novamente, nós observamos que SUMO1 e SUMO3 só foram capazes de alterar a distribuição intracelular de STI1 quando PIAS1 foi co-expressa (Figura 14); e que assim como visto para as células PrP3F4, a E2 ligase Ubc9 não induz translocação de STI1 para o núcleo (Figura 15). Observa-se que um leve aumento da expressão de STI1 no núcleo na presença de SUMO3 (Figura 14, D).

A expressão de PIAS1 mais uma vez foi suficiente para alterar a distribuição intracelular de STI1 (Figuras 14 e 16). É possível, que a interação de STI1 com PIAS seja o sinal para translocação nuclear, onde provavelmente STI1 é então SUMOilada. Essa questão será melhor esclarecida com a identificação dos sítios de SUMOilação de STI1 e a geração de mutante que não possa ser SUMOylado.

Lima e colaboradores mostraram que a proteína prion celular modula a organização de laminina que é secretada e depositada na matrix extracelular, bem como a secreção de outros fatores solúveis. Além disso, PrP^C é secretado junto com STI1 promovendo sobrevivência neuronal (Lima et al., 2007).

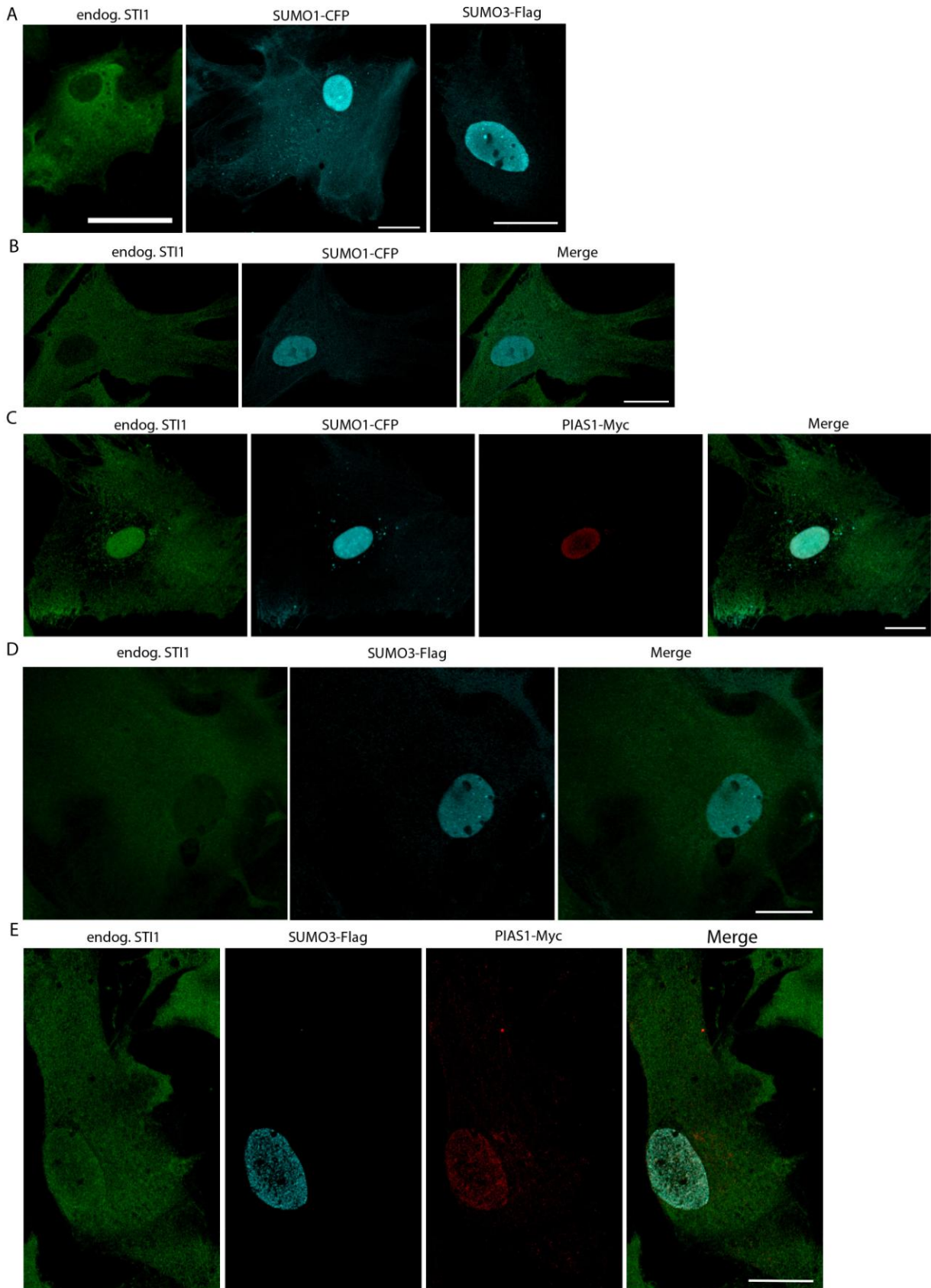


Figura 14: Distribuição intracelular de STI1 endógena em astrócitos na presença de componentes da via de SUMOilação.

Culturas primárias de astrócitos foram co-transfectadas com PIAS1-Myc, SUMO1-CFP e SUMO3-Flag. Após quarenta e oito horas de transfecção os astrócitos foram submetidos a imunomarcação utilizando-se os anticorpos anti-STI1 (Instituto Ludwig, 1:200), anti-myc para detecção de PIAS1 (Sigma, 1:100) e anti-Flag para detecção de SUMO3 (Sigma, 1:100). O painel **A** representa o padrão de distribuição das proteínas em estudo. Os painéis **B** e **D** mostram o padrão de distribuição de STI1 endógena na presença de SUMO1 e SUMO3 respectivamente. Ambas as proteínas SUMO só alteraram a distribuição intracelular de STI1 na presença de PIAS1 (**C**, **E**). As imagens correspondem a fatias óticas ou projeção da série Z (**C**) representativas de seis experimentos independentes. Barra: 20 μ m.

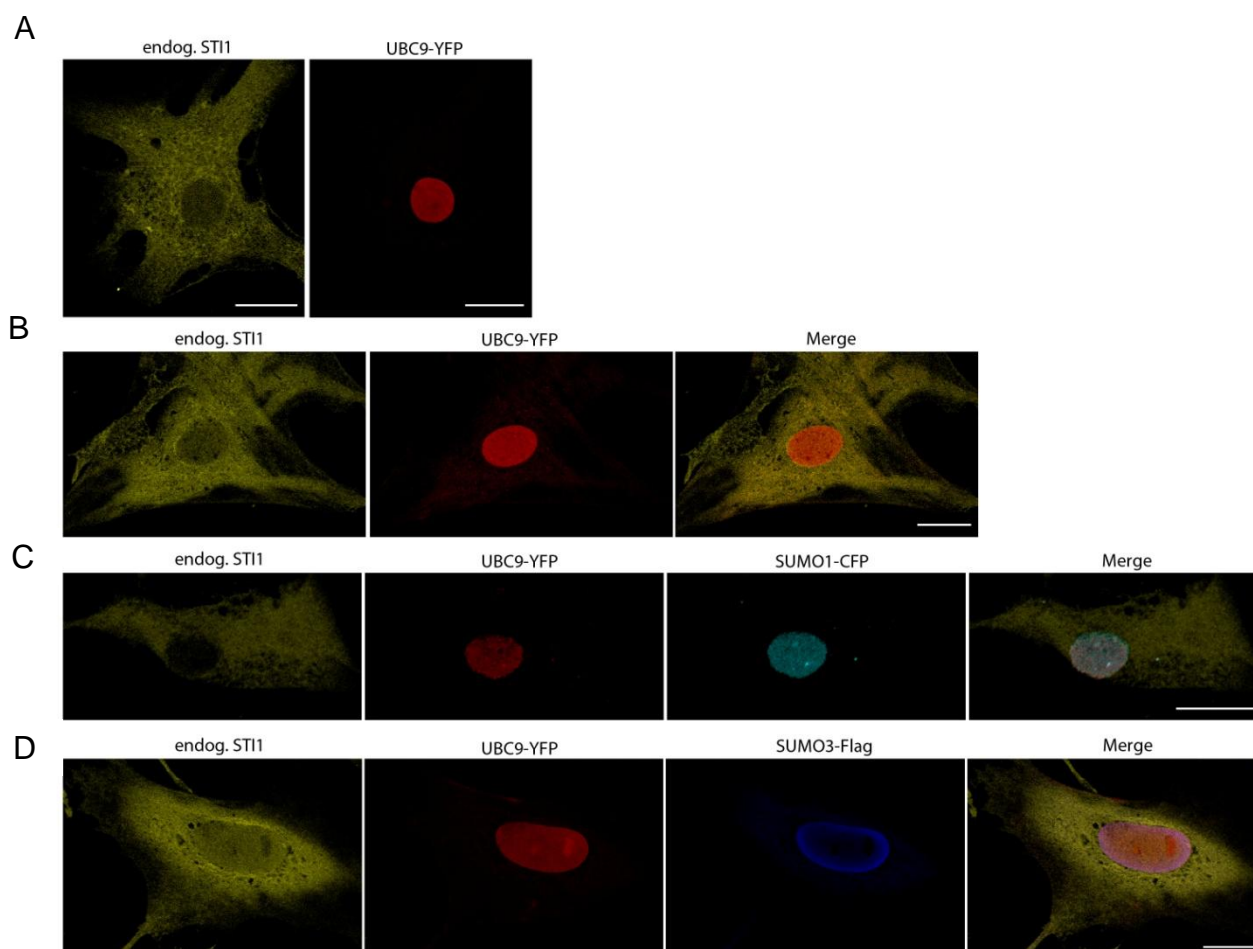


Figura 15: Ubc9 não altera a distribuição intracelular de STI1 endógena em astrócitos.

Culturas primárias de astrócitos foram co-transfectadas com Ubc9-YFP e SUMO1-CFP ou SUMO3-Flag. O painel **A** representa a expressão independente de STI1 e Ubc9. A expressão de Ubc9 não alterou a distribuição intracelular de STI1 (**B**), mesmo quando SUMO1 (**C**) ou SUMO3 (**D**) foram expressos. Note a forte co-localização entre Ubc9 e as proteínas SUMO (**C** e **D**). As imagens correspondem a fatias óticas representativas de 2 experimentos. Barra: 20 μ m.

Assim como para ST11, os mecanismos de secreção de PrP^C não são completamente esclarecidos, acreditando-se que ocorra através de exossomos (Faure et al., 2006; Wang et al., 2010b). A secreção de prion por neurônios corticais e astrócitos pode ser importante para a disseminação das doenças priônicas no cérebro, portanto é importante estudarmos como esse processo é regulado e quais são as proteínas envolvidas. Na busca por um possível mecanismo, nós avaliamos se as proteínas da via da SUMOilação alteram a distribuição intracelular de PrP^C endógeno em astrócitos (Figuras 16 e 17) .

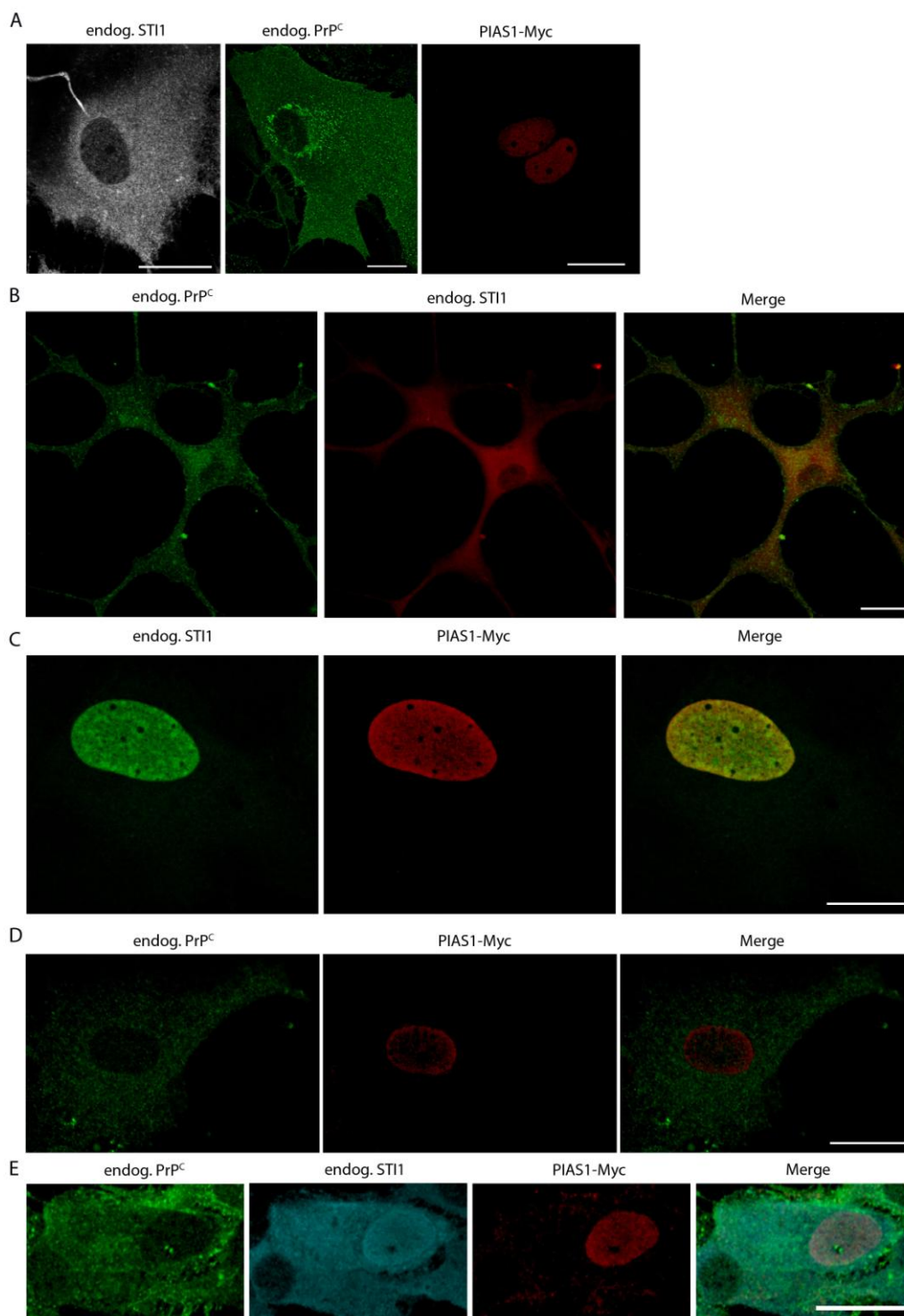


Figura 16: PIAS1 altera a distribuição intracelular de STI1 mas não de PrP^C.

Culturas primárias de astrócitos foram transfectadas com PIAS1-Myc e a distribuição intracelular de STI1 e PrP^C endógenos foi avaliada. Após quarenta e oito horas de transfecção os astrócitos foram submetidos a imunomarcação utilizando-se os anticorpos anti-STI1 (Instituto Ludwig, 1:200), anti-PrP8H4 (Abcam, 1:200) e anti-myc para detecção de PIAS1 (Sigma, 1:100). O painel **A** representa o padrão de distribuição das proteínas em estudo. PIAS1 induziu um aumento substancial da expressão de STI1 no núcleo (**C**, **E**) mas não alterou a distribuição de PrP^C (**D**). As imagens correspondem a fatias óticas ou projeção da série Z (**B**) representativas de seis experimentos independentes. Barra: 20 μm.

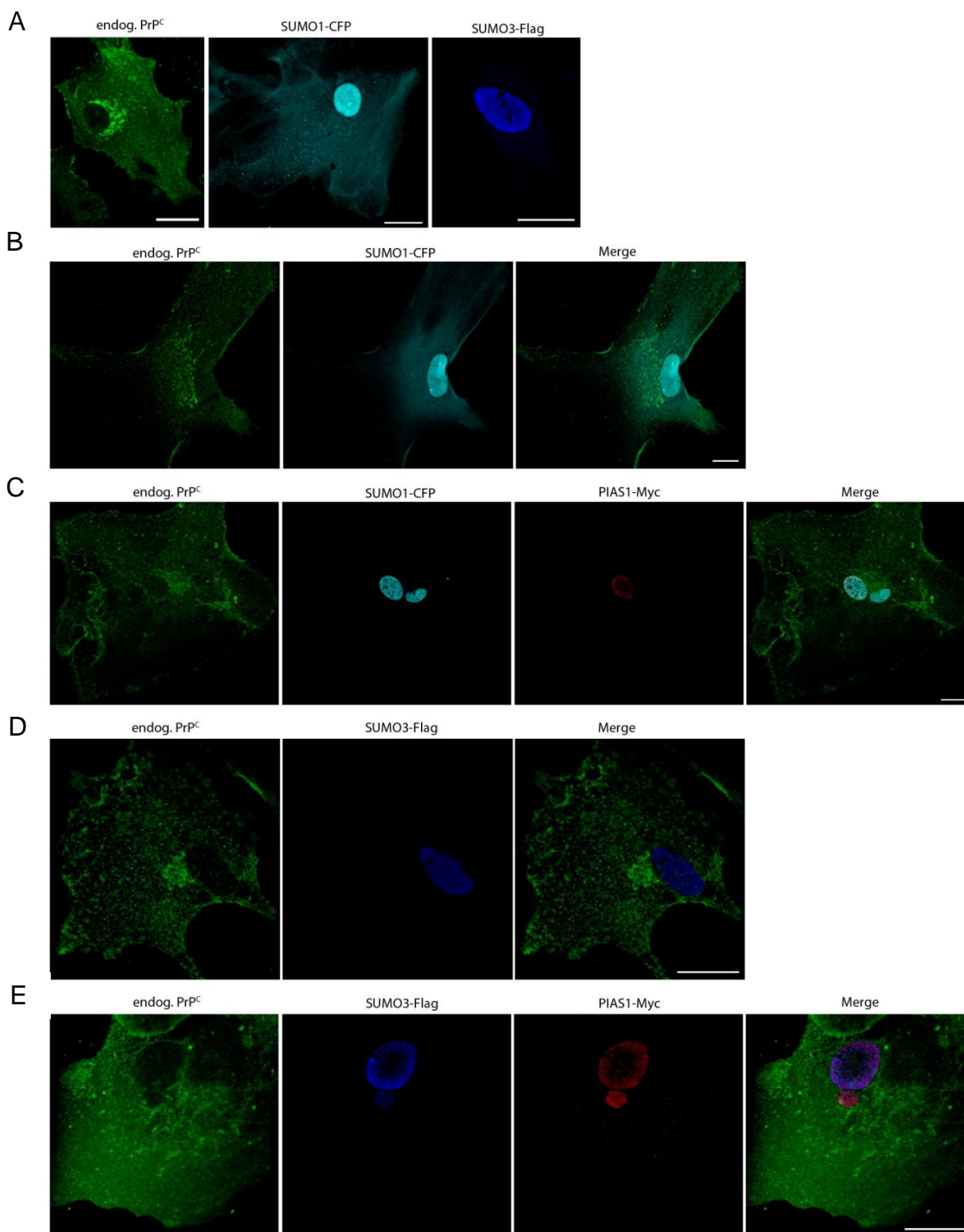


Figura 17: Proteínas da via de SUMOilação não alteram a distribuição intracelular de PrP^C.

Culturas primárias de astrócitos foram co-transfectadas com PIAS1-Myc, SUMO1-CFP e SUMO3-Flag. Após quarenta e oito horas de transfecção os astrócitos foram submetidos a imunomarcacão utilizando-se os anticorpos anti-PrP^C (Abcam, 1:200), para detecção de PrP^C endógeno. O painel **A** representa o padrão de distribuição das proteínas em estudo. SUMO1 e SUMO3 não alteram a distribuição de PrP^C (**B** e **D**) mesmo na presença de PIAS1 (**C**, **E**). As imagens correspondem a fatias óticas representativas de seis experimentos independentes. Barra: 20 μm.

Nenhuma das proteínas estudadas até aqui alterou a distribuição intracelular de PrP^C. Em astrócitos, PrP^C endógeno apresentou uma distribuição pontuada, difusa pelo citoplasma devido a permeabilização, sem marcação nuclear. Em algumas células foi possível ver a marcação de PrP^C na membrana e também na região peri-nuclear correspondente ao complexo de Golgi (Li et al., 2001). Essa distribuição não foi alterada na presença de SUMO1 ou SUMO3, ou mesmo quando PIAS1 foi co-expressa (Figuras 16 e 17) sugerindo que ou PrP^C não é SUMOylado ou requer uma E3 ligase diferente de PIAS1. Recentemente foi demonstrado que uma isoforma de PrP^C, ^{Cyt}PrP, é conjugada com SUMO1 no núcleo (Juanes et al., 2009). Esta isoforma corresponde à tradução do mRNA para PrP^C a partir de uma metionina *Downstream* ao código de iniciação normalmente utilizado. Não se sabe ainda qual a relevância fisiológica ou patológica desta isoforma, e da mesma forma pouco se sabe a respeito da sua SUMOilação.

4.8 STI1 E OS CORPOS PML

Nossos resultados até aqui mostraram um aumento da localização de STI1 no núcleo mediado por PIAS1. As proteínas PIAS se localizam em suborganelas nucleares denominadas *Speckles* e também se associam com a matrix nuclear. Estas E3 ligases podem direcionar proteínas alvo para sítios ativos de SUMOilação conhecidos como corpos PML, onde estas proteínas e muitas vezes as próprias PIAS serão modificadas (Yamamoto et al., 2003; Ihara et al., 2005). Os corpos PML estão envolvidos na regulação transcricional, reparo de DNA e estabilidade da cromatina (Heun, 2007; Bernardi and Pandolfi, 2007) e sua formação depende da SUMOilação da proteína PML. Os resultados das figuras anteriores mostraram que PIAS1 altera a distribuição de STI1, SUMO1 e de SUMO3, levando à formação de vários grânulos nucleares. É possível, que estes grânulos vistos apenas nas células co-transfectadas sejam corpos PML e que PIAS1 recrute STI1 para esta região a fim de ser SUMOilada. Para testar esta hipótese nós expressamos PML-YFP em astrócitos e avaliamos a co-localização de STI1 endógena com estas estruturas com ou sem a super expressão de proteínas da via de SUMOilação (Figura 18). PML-YFP co-localiza com uma pequena fração de STI1 que foi direcionada para o núcleo devido à superexpressão de PML.

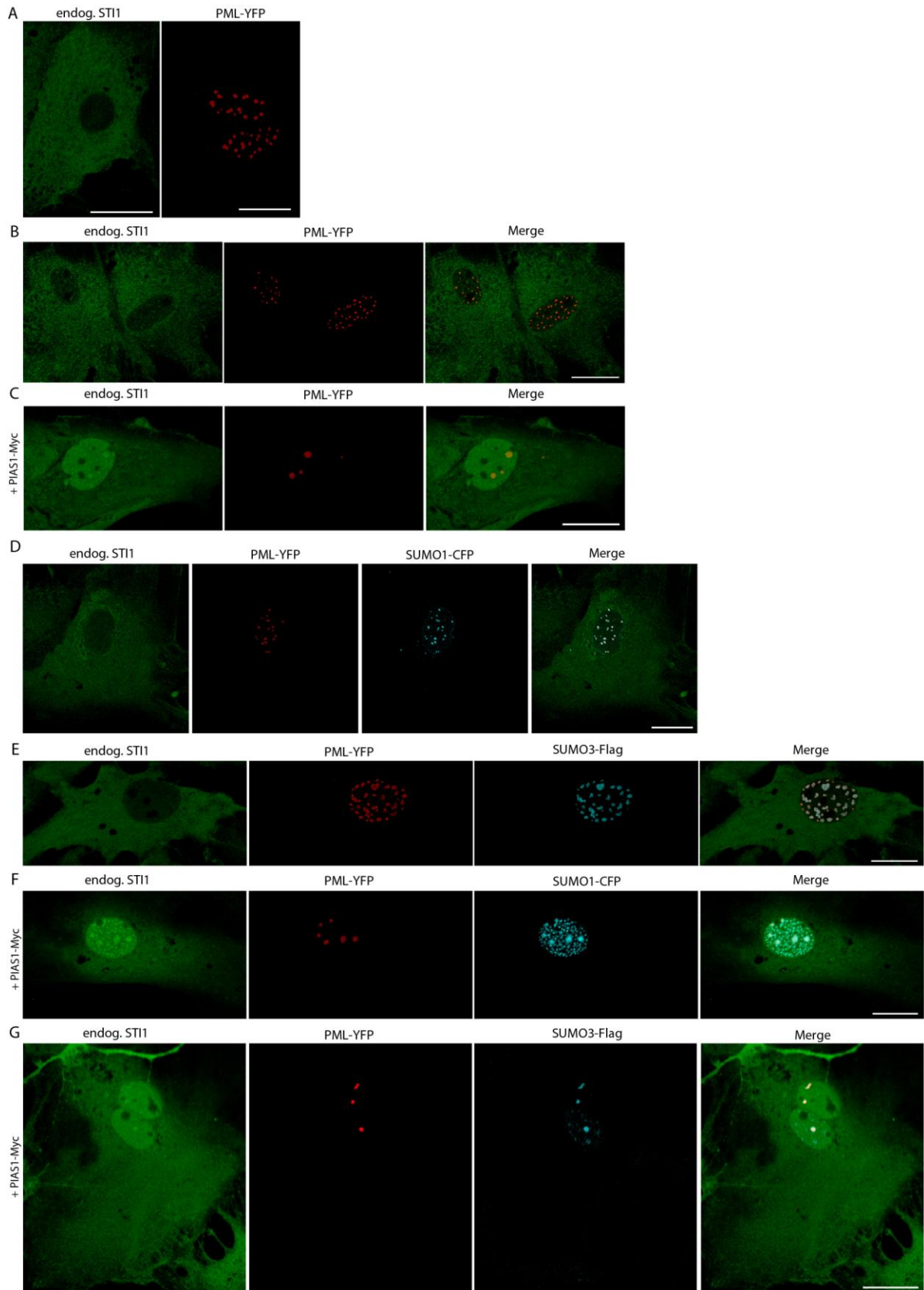


Figura 18: STI1 endógena é direcionada para os corpos PML.

Culturas primárias de astrócitos foram co-transfectadas com PML-YFP, PIAS1-Myc, SUMO1-CFP e SUMO3-Flag. Após quarenta e oito horas de transfecção os astrócitos foram submetidos a imunomarcção para detecção de STI1 endógena e SUMO3-Flag. PML-YFP se co-localiza com uma pequena fração de STI1 endógena (**B**). Esse efeito foi mais pronunciado na presença de PIAS1 (**C**). Tanto SUMO1 quanto SUMO3 não foram capazes de direcionar STI1 para os corpos PML na ausência de PIAS1 (**D, E**). Porém na presença de PIAS1, observa-se co-localização de STI1 com as proteínas SUMO nestas estruturas (**F, G**). As imagens correspondem a fatias óticas ou projeção da série Z (**G**) representativas de três experimentos independentes. Barra: 20 μm

A co-expressão de PIAS1 reduziu o número de grânulos de PML, levando a formação de aglomerados maiores que foram positivos para STI1. A co-expressão de PML-YFP com SUMO1 ou SUMO3 não alterou a distribuição de STI1, apesar do direcionamento das proteínas SUMO para as estruturas positivas para PML.

Na presença de PIAS1, STI1 foi direcionada para os corpos positivos para PML e SUMOs. A nossa hipótese é de que STI1 é direcionada para os corpos PML por PIAS1 para ser SUMOilada.

4.9 STI1 E CHOQUE TÉRMICO

Até aqui nós vimos a alteração na distribuição intracelular de STI1 como uma das consequências da expressão de PIAS, embora seja possível que a SUMOilação de STI1 também contribua para alteração de sua localização. Uma pergunta que nos interessou a responder foi se haveria alguma situação de estresse celular (situação que necessite de atividade de STI1) que pudesse alterar a localização de STI1 para o núcleo em astrócitos. Experimentos anteriores sugerem que o Choque Térmico aumenta a localização de STI1 no núcleo em linhagens celulares, mas não é claro se isso ocorre também em culturas primárias (Daniel et al., 2008).

Culturas de astrócitos, transfectadas ou não com STI-YFP e PIAS1-Myc, foram submetidas a choque térmico a 43°C durante 30 minutos. Após o Choque Térmico as células foram fixadas, imunomarcadas e analisadas por microscopia confocal. Nenhuma alteração foi observada na distribuição intracelular de STI1 após o Choque Térmico, mesmo quando PIAS1 foi super expressa (Figura 19). Nós também avaliamos os efeitos do choque térmico sobre STI1 na presença de

SUMO1 e SUMO3, porém novamente nenhuma alteração foi observada (Figura 20). Estes resultados sugerem que as funções de STI1 na recuperação celular logo após o Choque Térmico, não dependem da sua localização no núcleo.

Nós também avaliamos se o Choque Térmico teria algum efeito sobre a distribuição intracelular de PrP^C (Figura 21). Assim como STI1, nenhuma alteração foi observada em PrP^C após o choque térmico em astrócitos.

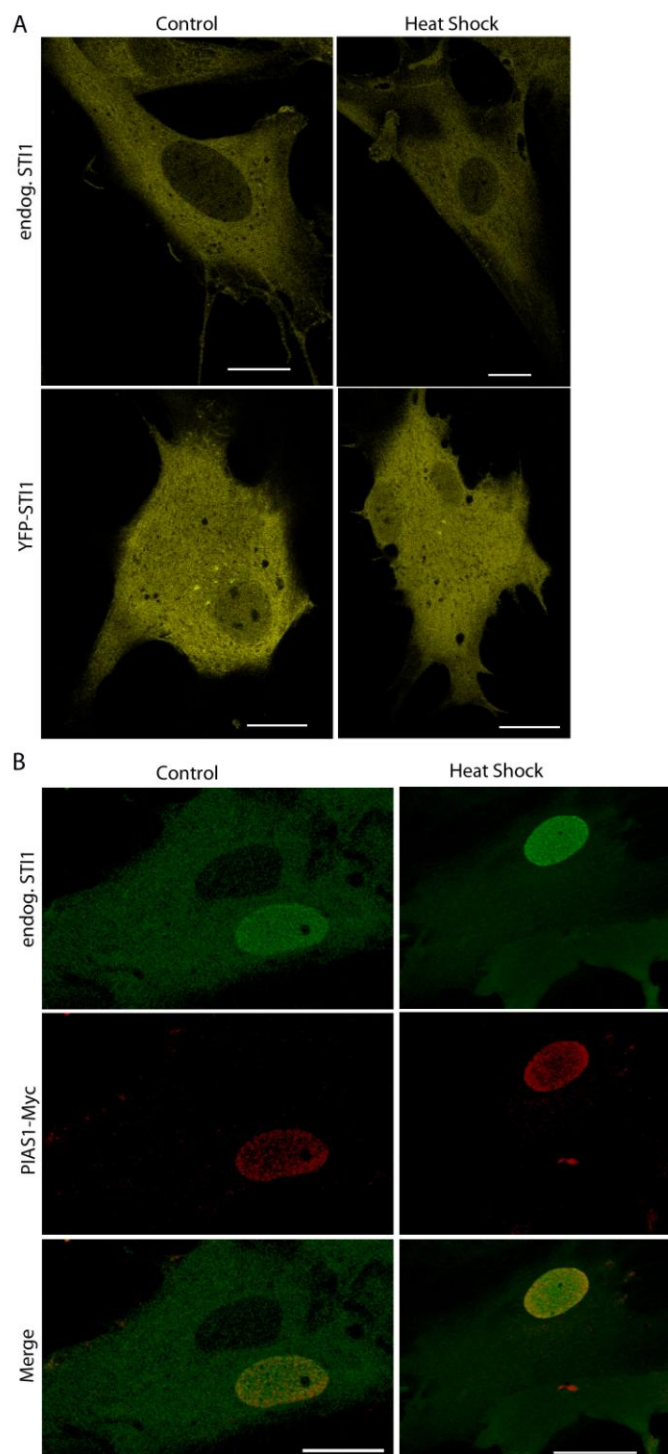


Figura 19: Choque Térmico não altera distribuição intracelular de ST11.

Culturas primárias de astrócitos foram transfectadas com ST11-YFP (A, segundo painel) ou PIAS1-Myc (B) e submetidas a ensaio de Choque Térmico. Quarenta e oito horas após a transfecção, os astrócitos foram incubados a 43°C por 30 minutos, fixados, submetidos a imunomarcção para PIAS1 e ST11 e analisados no microscópio confocal. A primeira coluna representa células controle incubadas a 37°C durante todo experimento e a segunda coluna representa células após o stresse térmico. Choque Térmico não alterou a distribuição de ST11-YFP ou de ST11 endógena (A), mesmo na presença de PIAS1 (B). As imagens correspondem a fatias óticas representativas de quatro experimentos independentes. Barra: 20 μm

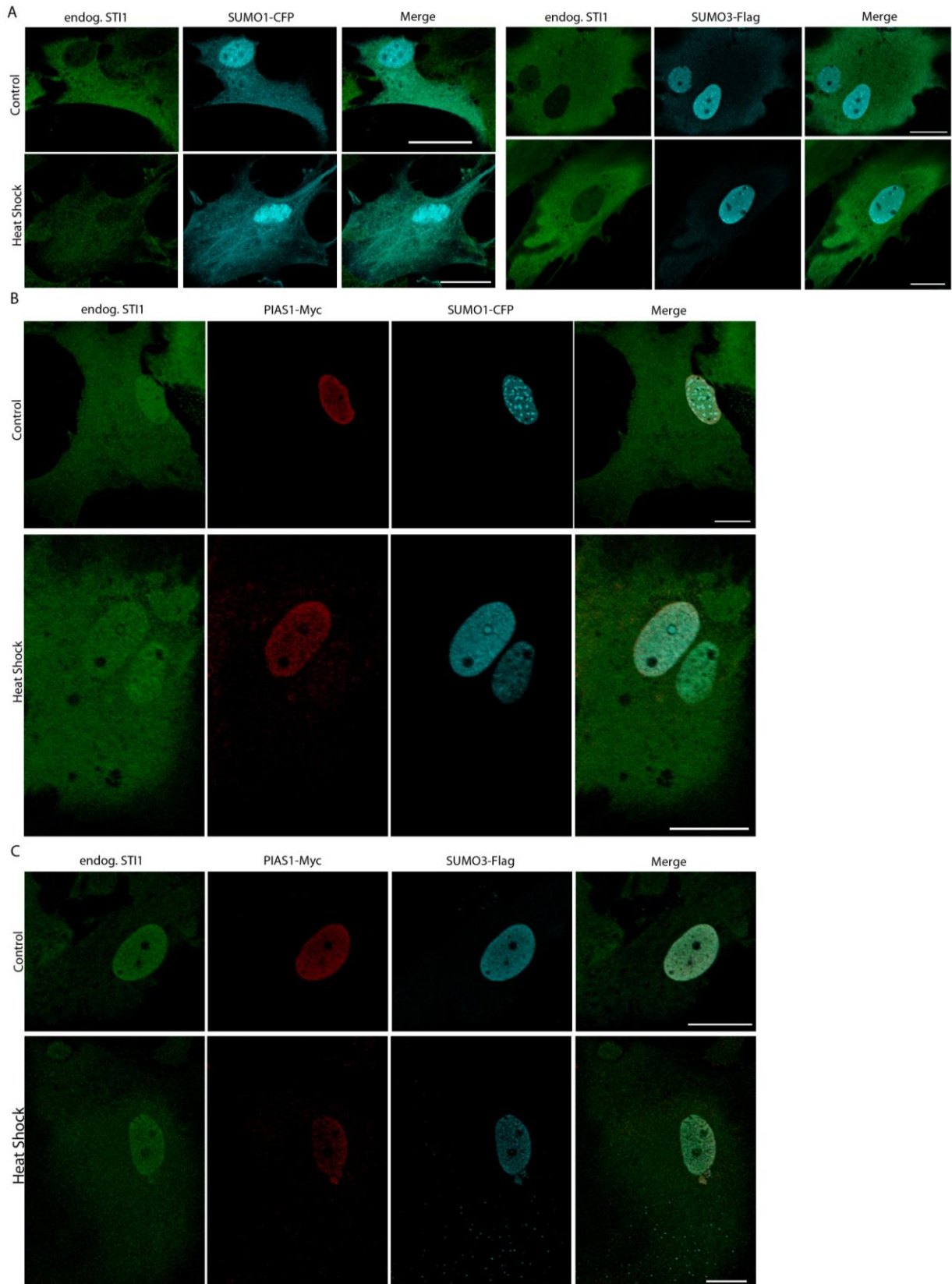


Figura 20: SUMO1 e SUMO3 não alteram a distribuição intracelular de STI1 após Choque Térmico.

Culturas primárias de astrócitos foram transfectadas com SUMO1-CFP, SUMO3-Flag e/ou PIAS1-Myc e submetidas a ensaio de Choque Térmico. Quarenta e oito horas após a transfecção, os astrócitos foram incubados a 43°C por 30 minutos, fixados, submetidos a imunomarcação para STI1, PIAS1 e SUMO3 e analisados no microscópio confocal. SUMO1 e SUMO3 não induziram alteração na distribuição intracelular de STI1 após Choque Térmico (**A** e **B**, respectivamente). Mesmo na presença de PIAS1 (**C** e **D**), não houve alteração em STI1 após o stresse térmico comparado com as células controle (primeira fileira de cada painel). As imagens correspondem a fatias óticas representativas de quatro experimentos independentes. Barra: 20 µm

4.10 STI1 E DANO AO DNA

Outra situação de estresse cuja SUMOilação tem sido implicada, é o dano ao DNA por quebra na fita dupla (DSB do inglês *Double-strand break*). Várias proteínas envolvidas no reparo ao DNA foram identificadas como alvo da via de SUMOilação (Morris, 2010), sugerindo a participação da SUMOilação nesta via. Além disso foi recentemente demonstrado que as proteínas PIAS1 e PIASy são recrutadas para os sítios de dano ao DNA participando ativamente do processo de reparo (Galanty et al., 2009). Diante dessas evidências, e do fato de PIAS1 e PIASy ligarem-se em STI1, nós decidimos avaliar se os DSBs induzem alteração na distribuição intracelular de STI1.

O dano ao DNA pode ser induzido por vários fatores exógenos. Neste trabalho nós utilizamos a irradiação ionizante por raios X para induzir os DSBs em astrócitos. O dano ao DNA foi avaliado através da imunomarcação para a histona H2AX, que constitui um dos primeiros sinais de reparo ao DNA e pode ser observada após 1 minuto do dano (Rogakou et al., 1998; Rogakou et al., 1999). Astrócitos transfectados com STI1-YFP foram submetidos a 50 kpv de irradiação por raios X por 10 minutos. Após a irradiação, as células foram imediatamente fixadas ou mantidas na incubadora por 30 minutos ou 1 hora antes de serem fixadas. Os resultados da figura 22 mostram que o dano ao DNA induziu o translocação de STI1 para o núcleo em todos os tempos analisados. Observa-se uma co-localização parcial de STI1 com os *Foci* somente após 30 minutos de irradiação. Estes resultados mostram a primeira situação de estresse nesse trabalho que induziu a

SUMOilação de ST11, e sugerem que ST11 possa estar envolvida na via de reparo ao DNA.

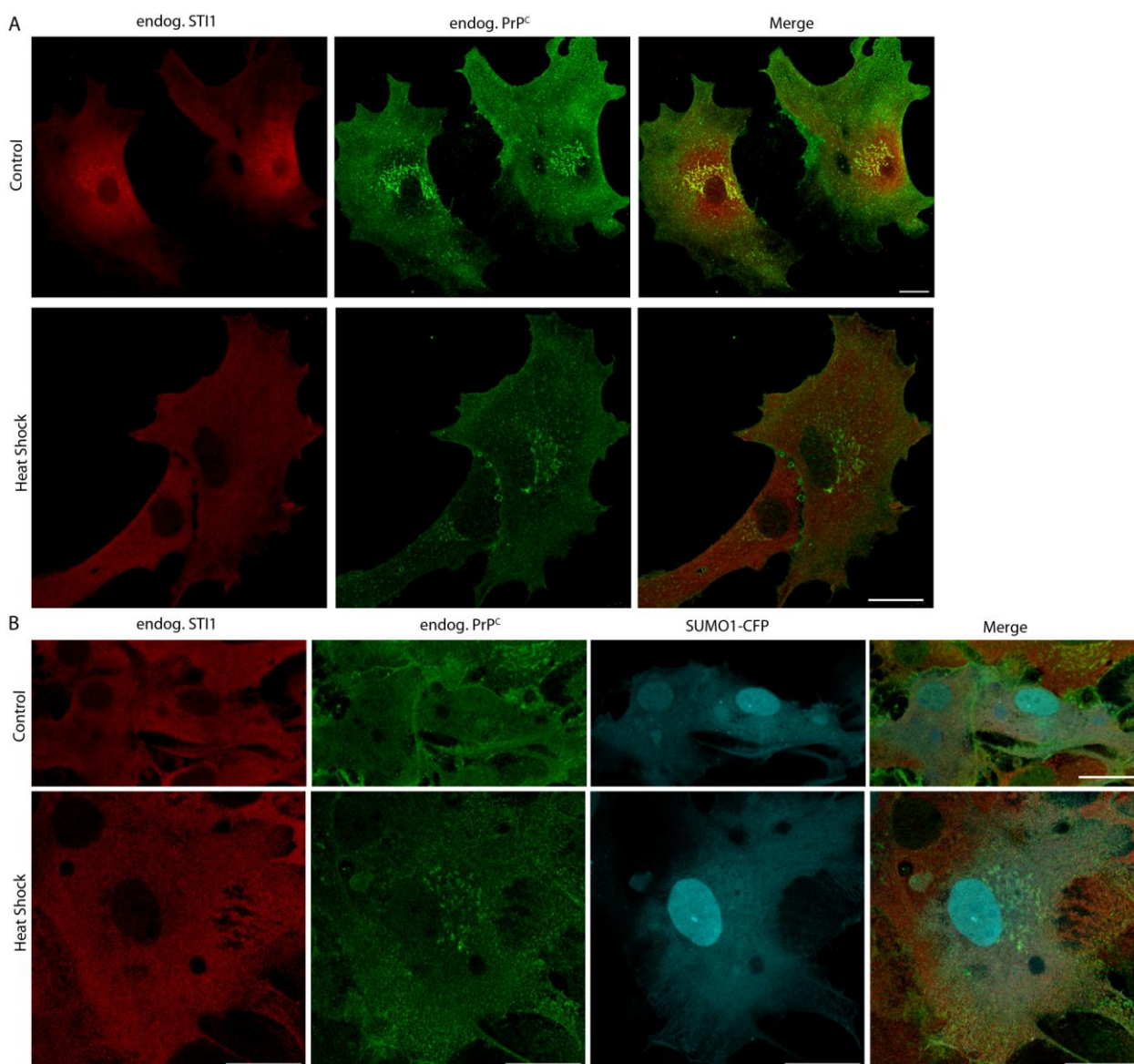


Figura 21: Choque Térmico não altera distribuição intracelular de PrP^C.

Culturas primárias de astrócitos foram submetidas a ensaio de Choque Térmico na presença ou ausência de SUMO1-CFP. Quarenta e oito horas após a transfecção, os astrócitos foram incubados a 43°C por 30 minutos, fixados, submetidos a imunomarcagem para PrP^C e ST11 e analisados no microscópio confocal. A imunomarcagem de ST11 após o stresse térmico foi utilizada como controle do experimento. Choque Térmico não alterou a distribuição de PrP^C (A), mesmo na presença de SUMO1 (B). As imagens correspondem a fatias óticas ou projeções da série Z (A, controle) representativas de quatro experimentos independentes. Barra: 20 μ m

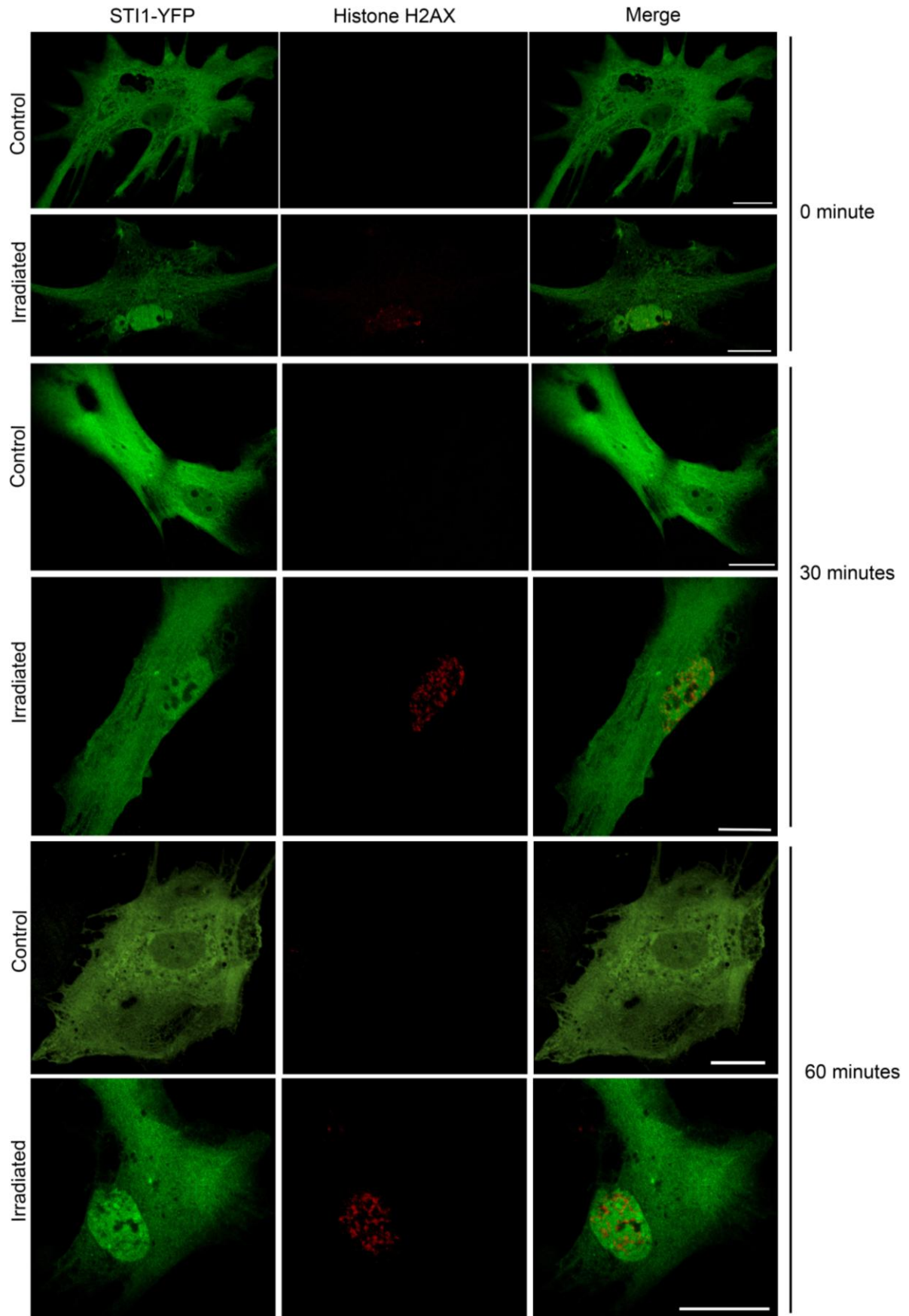


Figura 22: Dano no DNA induz translocação de ST11 para o núcleo.

Culturas primárias de astrócitos foram transfectadas com ST11-YFP e submetidas a 50 kVp de irradiação por raios-X durante 10 minutos. Os astrócitos foram fixados logo depois, 30 minutos ou 1 hora após a irradiação e submetidos a imunomarcação para detecção de histona H2A.X fosforilada. A primeira fileira de cada condição representa células controle e a segunda fileira representa células submetidas a irradiação. O dano ao DNA induziu a translocação de ST11 para o núcleo em todos os tempos analisados. Observa-se a detecção dos *Foci* mais pronunciada nas células submetidas a irradiação (segunda coluna). As imagens correspondem a fatias óticas representativas de cinco experimentos independentes. Barra: 20 μm

5 DISCUSSÃO

Chaperonas e co-chaperonas constituem um importante grupo de proteínas responsáveis pela promoção e manutenção da conformação nativa das proteínas celulares (Young et al., 2004). O papel de STI1 como uma co-chaperonina já foi estabelecido, mostrando que esta proteína é capaz de se ligar às chaperonas HSP70 e HSP90 mediando o enovelamento de peptídeos recém sintetizados (Pratt and Toft, 1997; Scheufler et al., 2000). Mas além da sua atuação como chaperonina, STI1 também desempenha outros papéis tanto no contexto intracelular quanto extracelular. Lima e colaboradores (2007) mostraram que STI1 é secretada por astrócitos atuando na sobrevivência e diferenciação neuronal. Estas funções são mediadas pela sua interação com PrP^C na superfície dos neurônios (Zanata et al., 2002; Lopes et al., 2005), e indica que no contexto extracelular STI1 atue como um importante fator neurotrófico secretado por glia. Da mesma forma, STI1 participa da maturação e desenvolvimento de astrócitos através da sua interação com PrP^C na membrana (Arantes et al., 2009). Esses resultados implicam em uma atuação parácrina e autócrina de STI, e são portanto, efeitos regulados pela sua secreção.

A STI1 bem como PrP^C, é expressa desde o início do desenvolvimento do SNC em um padrão que mais uma vez suporta seu envolvimento na diferenciação e sobrevivência neuronal (Hajj et al., 2009). De fato STI1 é essencial para a sobrevivência de embriões (Beraldo et al. dados ainda não publicados).

Para iniciarmos o estudo das possíveis ações de STI1 tanto intracelulares como extracelulares, nós procuramos entender primeiro com quais moléculas STI1 se associa. O ensaio de duplo híbrido de Soares e colaboradores (manuscrito em preparação) revelou que a STI1 interage com proteínas de diversas classes, incluindo várias do grupo das proteínas de Choque Térmico. Interessantemente, várias proteínas de uma mesma via bioquímica foram identificadas como ligantes de STI1, o que nos levou a estudar mais detalhadamente a via de SUMOilação. A SUMOilação constitui uma via de modificação pós-traducional que altera a localização intracelular das proteínas-alvo, suas interações com outras proteínas e estabilidade (Gueiss-Friendlander e Melchior, 2007). Os nossos ensaios de Co-Imunoprecipitação confirmaram a interação de STI1 com os componentes desta via: a E2 ligase Ubc9 e as E3 ligases PIAS1, PIASy e Pc2. A confirmação da interação

de STI1 com a maquinaria da via de SUMOilação sugere que esta proteína possa ser SUMOilada. De fato, Soares e colaboradores (manuscrito em preparação) mostraram que STI1 é SUMOilada por SUMO1 e SUMO2/3 (Anexos 1 e 2).

Os nossos resultados mostram que as proteínas da via da SUMOilação são expressas nas mesmas regiões no cérebro que STI1. Estes resultados não inviabilizam a hipótese de que estas proteínas se associam *in vivo*. Esta associação certamente está relacionada com novas funções de STI1 além do seu papel como co-chaperonina. A nossa hipótese é de que a interação de STI1 com estas proteínas constitui um mecanismo regulatório das funções intracelulares de STI1. É possível que a SUMOilação de STI1 também influencie sua secreção. O que nós propomos é que a SUMOilação de STI1 a deixa menos disponível para ser secretada, mas essa hipótese ainda terá que ser avaliada.

O primeiro passo para entendermos as consequências da SUMOilação de STI1 foi avaliarmos a co-localização de STI1 com as proteínas da via de SUMOilação. Nossos resultados de microscopia mostraram que com exceção de SUMO1, SUMO3 e Ubc9, todas as outras proteínas estudadas (PIAS1, PIASy, Pc2, PML) apresentaram localização exclusivamente nuclear. E mesmo as proteínas SUMO e Ubc9 apresentaram uma distribuição predominantemente nuclear, com fraca distribuição citoplasmática. Ao contrário, STI1 possui distribuição predominantemente citoplasmática com uma pequena fração localizando-se no núcleo. Na presença de PIAS1, nós observamos um forte translocação de STI1 para o núcleo e co-localização entre estas proteínas. O mesmo efeito foi visto na presença de SUMO3 em células PrP3F4, porém de forma não tão pronunciada. Portanto, na ausência PIAS1, STI1 apresenta pouca ou nenhuma co-localização com as proteínas da via de SUMOilação.

Sabe-se que a SUMOilação de proteínas está envolvida, entre outras atividades, no transporte de proteínas núcleo-citoplasma. Dessa forma, nós também avaliamos a distribuição intracelular de STI1 na presença de seus ligantes. Os nossos resultados mostraram que SUMO1, Ubc9, PIASy e Pc2 não alteraram a distribuição intracelular de STI1-YFP quando expressos sozinhos em células PrP3F4 (nosso modelo neuronal) ou em astrócitos. A expressão de SUMO3 induziu um aumento de STI1-YFP no núcleo em células PrP3F4, o que no entanto não ocorreu em astrócitos. Esses resultados indicam uma certa preferência de STI1 a

ser modificada por SUMO3 e não por SUMO1 na ausência de E3 ligases. SUMO1 e SUMO2/3 apresentam apenas 50% de homologia, e já foi demonstrado que vários substratos exibem preferências quanto à conjugação por um ou outro (Vertegaal et al., 2006). Estes estudos que identificaram grupos de proteínas alvo que são especificamente conjugadas por SUMO1, SUMO2 ou SUMO3 têm sugerido que os diferentes SUMOs podem estar envolvidos em diferentes funções. De fato, SUMO2/3 mas não SUMO1 está envolvido na conjugação de proteínas em resposta ao estresse (Vertegaal et al., 2006).

A interação de STI1 com PIAS1 foi fundamental para alteração da distribuição celular de STI1. A expressão de PIAS1 sozinha induziu um pronunciado aumento da localização nuclear de STI1-YFP em células PrP3F4 e STI1 endógena em astrócitos. A co-expressão de PIAS1 com SUMO1, o qual não modifica STI1 quando expresso sozinho, também induziu o aumento de STI1 no núcleo. O mesmo aumento foi visto na co-expressão de PIAS1 com SUMO3. A nossa hipótese inicial era de que a SUMOilação de STI1 seria o evento responsável pela sua translocação para o núcleo. Porém recentemente dados do nosso laboratório mostraram que o mutante de STI1 para os possíveis sítios de SUMOilação também foi direcionado para o núcleo na presença de PIAS1 (dados não mostrados). Esses resultados indicam que a interação de STI1 com PIAS1 é o evento chave para alteração na distribuição intracelular de STI1. De fato, foi demonstrado neste trabalho que essa alteração induzida por PIAS1 em células PrP3F4 e astrócitos não depende da superexpressão de SUMO1 ou SUMO3.

Uma das atividades das proteínas PIAS é sequestrar as proteínas alvo e as proteínas SUMO para os sítios ativos de SUMOilação (Ihara et al., 2005). A grande maioria dos ligantes de PIAS são fatores de transcrição que se localizam no núcleo, assim como as próprias proteínas PIAS. Dessa forma, um dos nossos primeiros questionamentos foi como PIAS1 consegue alterar a distribuição intracelular de STI1 que é predominantemente citoplasmática? Estudos em leveduras mostraram que a E3 ligase homóloga a PIAS, proteína Siz1, é transportada para o citoplasma de forma dependente do ciclo celular e da sua fosforilação (Takahashi et al., 2008). Outros estudos em células de mamíferos mostram a SUMOilação mediada por PIAS de proteínas citoplasmáticas (Wible et al., 1998; Martin et al., 2007a). Estes dados sugerem que em algum momento do ciclo celular as proteínas PIAS se encontram

com seus alvos citoplasmáticos, mediando seu transporte para o núcleo. Ou este transporte ocorre indiretamente, através da alteração de um outro efetor por PIAS que seria translocado para o citoplasma para modificar STI1, como mostrado para a Cinase IKK ϵ (Renner et al., 2010). Além disso, os nossos resultados dos experimentos de fracionamento subcelular mostraram que quando super expressa, PIAS1 se distribui também no citoplasma.

Interessantemente, o transporte nuclear do fator FIP200 (uma cinase envolvida na adesão celular) mediado por PIASy não está relacionado com SUMOilação (Martin et al., 2008). Estes e outros dados mostram que o transporte nuclear mediado por PIAS não depende da sua atividade como E3 ligase, mas somente da sua interação com a proteína alvo. Daniel e colaboradores mostraram que Hop (homóloga de STI1 em humanos) é transportada para o núcleo independente do seu peptídeo sinal de localização nuclear em células BHK-21 (do inglês *Baby Hamster Kidney cells*) ou fibroblastos de camundongo NIH 3T3 (Daniel et al., 2008). Esse transporte foi dependente da fosforilação de Hop pela caseína cinase II (CKII) e foi induzido em resposta ao estresse térmico, o que não observamos em astrócitos. Interessantemente, PIAS1 também é fosforilada por CKII. Esse processo é fundamental para a ligação de SUMO1 e SUMO2 à PIAS1 (Stehmeier and Muller, 2009). Além da fosforilação, o transporte núcleo-citoplasma de STI1 parece depender do ciclo celular e das cinases do ciclo celular (Longshaw et al., 2004). Tendo em vista que o transporte citoplasmático de PIAS também é dependente do ciclo celular (pelo menos em leveduras), é possível especular que: PIAS1 poderia induzir a fosforilação de STI1 que resulta na sua translocação para o núcleo. Uma vez no núcleo, STI1 é direcionada por PIAS1 para os sítios ativos de SUMOilação, onde STI1 será SUMOilada e exercerá suas funções. Esse processo é dependente do ciclo celular e pode ser estimulado por situações de stresse. Apesar dessa nova hipótese, nós não descartamos a possibilidade de que a SUMOilação também seja um estímulo para transporte nuclear de STI1 ou para a inibição da saída de STI1 do núcleo, visto que a super expressão de apenas SUMO3 foi capaz de induzir sua mudança de localização, pelo menos em células PrP3F4. O que nós propomos é que este não seja o mecanismo principal.

Interessantemente nós vimos que as outras E3 ligases PIASy e Pc2 não alteram a distribuição intracelular de STI1 mesmo quando expressas com SUMO1.

PIASy é preferencialmente modificada por SUMO1 e está envolvida na conjugação de várias proteínas por esta isoforma (Ihara et al., 2005); mas este não parece ser o caso de STI1. Foi observado um aumento de STI1 no núcleo em células PrP3F4 expressando PIASy e SUMO3, porém como SUMO3 sozinho já induz esse aumento não se pode afirmar que esse efeito foi também mediado por PIASy. Em relação a Pc2, a sua localização nos corpos PcGs e baixa motilidade restringem muito o número de seus substratos. Interessantemente, um dos substratos de Pc2, a cinase HIPK2, foi identificada no ensaio de duplo híbrido como um ligante de STI1. HIPK2 induz a fosforilação de Pc2 que por sua vez induz a SUMOilação de HIPK2 aumentando sua atividade repressora (Roscic et al., 2006). É possível que STI1 atue mediando a interação de Pc2 com HIPK2, ao invés de ser uma alvo direto para SUMOilação por Pc2.

Ainda explorando os nossos dados de distribuição celular, nós fizemos duas observações interessantes. Primeiro, apesar de SUMO1 não induzir o transporte nuclear de STI1 quando expresso sozinho, STI1 parece alterar a distribuição intracelular de SUMO1. Os resultados em células PrP3F4 e em astrócitos mostram que na presença de STI1-YFP, SUMO1 concentra-se no núcleo. A segunda observação, que pode estar relacionada com a primeira, é que na presença de SUMO1, PIASy não é alterada. Porém, quando STI1 é superexpressa, PIASy forma numerosos grânulos e passa a se co-localizar com SUMO1 enquanto STI1 continua inalterada. Essas observações sugerem que STI1 de alguma maneira modifica as atividades de SUMO1. Em relação a SUMO3, os nossos experimentos de fracionamento subcelular mostraram que quando STI1 foi co-expressa somente com SUMO3, STI1 induz uma redução da SUMOilação de proteínas totais. Novamente sugerindo que STI1 pode modificar as atividades de SUMO. Nós ainda não temos a explicação para estas observações; novos estudos serão necessários não somente para determinar o papel da SUMOilação nas funções de STI1, mas também para determinar o papel de STI1 na via de SUMOilação.

No ensaio de duplo híbrido foi utilizada a porção N-terminal de STI1 porque esta região engloba o domínio de ligação a PrP^C. Dessa forma, os ligantes identificados para STI1 podem estar relacionados com a proteína prion celular. Neste trabalho nós exploramos a via de SUMOilação como um importante regulador das funções de STI1, e nós decidimos também avaliar as consequências sobre

PrP^C. Os nossos resultados mostraram que a distribuição celular de PrP^C não é alterada por nenhuma das proteínas da via de SUMOilação usadas aqui. Já foi demonstrado que PrP^C é modificado por ubiquitinação, sendo direcionado para degradação mediada por proteasomas (Yedidia et al., 2001). Mas pouco se sabe sobre a SUMOilação de PrP^C. Juanes e colaboradores descreveram uma nova isoforma de PrP^C que foi encontrada em frações nucleares, conjugada com SUMO1 (Juanes et al., 2009). Ainda não se sabe qual a importância dessa nova isoforma e quais as implicações da sua SUMOilação. Novos estudos deverão ser realizados para avaliar se a via de SUMOilação está envolvida na regulação das funções de PrP^C.

Os nossos resultados apontam PIAS1 como uma E3 ligase específica para SUMOilação de STI1. Soares e colaboradores em seus experimentos de co-precipitação de STI1 na presença de SUMO e E3 ligases mostraram que PIAS1 foi a única ligase que aumentou a SUMOilação de STI1 (Anexo 3), confirmando nossa hipótese de que esta é a E3 específica para STI1. Sabe-se, que uma das funções de PIAS como E3 é direcionar as proteínas alvo e as proteínas SUMO para os sítios ativos de SUMOilação. Um dos sítios mais bem estabelecidos são os corpos PML, que estão envolvidos na regulação de diversas funções nucleares. Já foi demonstrado que as proteínas PIAS se co-localizam transitoriamente com os corpos PML durante o processo de translocação dos substratos para estas estruturas (Ihara et al., 2005; Matsuura et al., 2005). Os nossos resultados mostraram que PIAS1 direciona parte da STI1 endógena para os corpos PML. Esse efeito também não foi dependente da expressão de SUMO1 ou SUMO3 mas interessante, observou-se a co-localização de STI1 com SUMO1 e SUMO3 nos corpos PML. Esses resultados sugerem que PIAS1 induz o direcionamento de STI1 para os corpos PML, onde esta proteína pode ser SUMOilada. As proteínas modificadas neste sítio, estão envolvidas na regulação da transcrição, na resposta ao dano ao DNA, na regulação da apoptose e do envelhecimento celular (Bernardi and Pandolfi, 2007). Tendo em vista o direcionamento de STI1 para estes sítios, é possível que STI1 esteja envolvida em uma dessas funções.

Após descobrirmos que STI1 é SUMOilada e direcionada para os corpos PML, nós começamos a investigar em quais situações esse processo acontece e porquê. Dados na literatura mostram que a SUMOilação de várias proteínas acontece em resposta a algum tipo de estresse celular. Nós então decidimos

começar pelo estresse térmico. A SUMOilação por SUMO2/3 foi demonstrada ser fundamental para a sobrevivência celular após o Choque Térmico (Golebiowski et al., 2009). Tendo em vista a alteração da distribuição celular de STI1 por SUMO3, nós esperávamos que o Choque Térmico fosse um dos estímulos para induzir sua SUMOilação. Porém, nossos resultados mostraram que o choque térmico não induziu qualquer alteração na distribuição intracelular de STI1. Mesmo na presença das proteínas PIAS1 e SUMO (1 ou 3), não houve maiores alterações em STI1 além daquelas vistas nos controles. Além disso, Soares e colaboradores (manuscrito em preparação) mostraram que não houve alteração na SUMOilação de STI1 após o Choque Térmico. Estes resultados contradizem os dados publicados por Daniel e colaboradores (2008) que mostram a translocação de Hop-GFP para o núcleo induzido por Choque Térmico. Nós seguimos exatamente o protocolo deste artigo, porém usando astrócitos ao invés de células BHK-21 ou fibroblastos de camundongo NIH 3T3. Esta diferença no tipo de célula utilizado pode ser a razão da discrepância dos resultados. Além disso, na maior parte dos nossos experimentos de Choque Térmico nós avaliamos a STI1 endógena, enquanto os autores utilizaram uma construção que codifica para Hop humana acoplada a GFP. De acordo com os nossos experimentos, podemos concluir que a SUMOilação de STI1 não está envolvida no reparo celular após Choque Térmico em astrócitos de camundongos. Esse resultado não implica que STI1 não atue no Choque Térmico; como uma co-chaperonina, STI1 exerce um importante papel no estresse térmico através da sua ligação às proteínas HSP70 e HSP90. Os nossos resultados apenas sugerem que as funções nucleares de STI1 não estão relacionadas com esse tipo de estresse.

Uma outra situação de estresse em que a via de SUMOilação está envolvida é o dano ao DNA ou estresse genotóxico. A quebra na fita dupla do DNA (DSB) constitui uma das formas mais graves de dano ao DNA (Cann and Hicks, 2007). Durante esse processo, os sítios de DSB são reconhecidos por um complexo de proteínas que recruta a cinase ATM, que por sua vez fosforila a histona H2AX formando os chamados *Foci*. A histona fosforilada recruta numerosos outros fatores para os *Foci*, que atuarão na via de reparo ao DNA (Jeggo and Lavin, 2009). Esse recrutamento é dependente da ubiquitinação e da SUMOilação das diversas proteínas envolvidas.

Galanty e colaboradores mostraram que PIAS1 e PIASy atuam na via de reparo do DNA coordenando a SUMOilação, recrutamento e ubiquitinação de vários efetores (Galanty et al., 2009). Interessantemente, os autores mostraram que no processo de reparo, as funções como E3 ligase de PIASy estão mais associadas a SUMO1, podendo também atuar com SUMO2/3; enquanto as funções de PIAS1 estão exclusivamente associadas com SUMO2/3. No nosso trabalho nós vimos que STI1 não é modificada por PIASy ou por SUMO1, mesmo quando essas duas proteínas foram co-expressas. Porém, nós vimos um significativo aumento de STI1 no núcleo provocado por PIAS1 e SUMO3. Outra observação interessante é o direcionamento de STI1, mediado por PIAS1, para os corpos PML. Na presença de DSB, os corpos PML aumentam de número e tamanho, e atuam como sensores do dano ao DNA. Várias proteínas envolvidas na via de reparo ao DNA são modificadas nos corpos PML durante esse processo, de forma que estas estruturas regulam a SUMOilação e também fosforilação dos efetores (revisto por Bernardi and Pandolfi, 2007; Renner et al., 2010). O direcionamento de STI1 para os corpos PML, e sua interação específica com PIAS1 e SUMO3 sugerem o possível envolvimento de STI1 no reparo ao DNA.

Utilizando irradiação por raios X nós mostramos que STI1-YFP é translocada para o núcleo em resposta ao dano ao DNA. Este resultado fortalece a nossa hipótese de que a STI1 pode desempenhar um papel na via de reparo ao DNA. Além disso, os resultados do ensaio em duplo híbrido mostraram que STI1 interage com HIPK2, uma importante cinase envolvida nesta via. A lesão no DNA induz a SUMOilação de HIPK2 por Pc2 (outro ligante de STI1) que é fundamental para sua atuação na repressão da transcrição. Todas estas evidências deverão ser mais exploradas para confirmarmos a participação de STI1 no reparo ao DNA e também para entendermos como esse processo acontece; se é realmente dependente da SUMOilação de STI1 ou apenas do seu transporte para o núcleo.

Nós ainda não sabemos qual a implicação da SUMOilação de STI1 sobre sua secreção. A nossa hipótese inicial era de que uma vez SUMOilada, a STI1 fosse direcionada para o núcleo e portanto fosse menos disponível para ser secretada. Porém, os resultados do nosso laboratório mostram que a STI1 não depende da SUMOilação para ser translocada para o núcleo. Soares e colaboradores mostraram através de *Immunoblotting* que a irradiação ionizante diminui a SUMOilação de STI1

(Anexo 4). Dessa forma, o dano ao DNA que induz alteração na distribuição intracelular de STI1 parece não estar associado com sua SUMOilação. Novos estudos deverão ser realizados para elucidarmos essa questão.

Apesar de ainda não sabermos se a SUMOilação participa da secreção de STI1, neste trabalho nós apontamos novas funções intracelulares de STI1. Além de co-chaperonina, esta proteína parece também atuar na via de reparo do DNA. A sua SUMOilação provavelmente é parte deste processo. Além disso, como STI1 altera a distribuição intracelular de algumas proteínas da via de SUMOilação, é possível também que ela de alguma maneira contribua para este processo.

A interação proteína-proteína parece ser fundamental na regulação da distribuição intracelular de STI1: a super expressão de PIAS1 induz o seu transporte para o núcleo, já a sua interação com HSP90 parece reter STI1 no citoplasma (Daniel et al., 2008). Portanto, o estudo as interações de STI1 ainda nos levará aos mecanismos que regulam sua secreção.

No próximo capítulo o enfoque será no tráfego da proteína prion celular e sinalização mediada pela interação com seus ligantes. A interação de PrP^C com STI1, bem como com outros ligantes também serão considerados neste capítulo.

6 INTRODUÇÃO

6.1 PRIONS

Prion – partícula infecciosa proteínácea – é o principal agente etiológico de um grupo de doenças neurodegenerativas fatais conhecidas como Doenças Priônicas (Prusiner, 1998; Prusiner, 1982). Também chamadas de Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (TSE), as Doenças Priônicas incluem o Scrapie, em ovelhas, a encefalopatia espongiforme bovina, ou mal da vaca louca em gado, o kuru, a Insônia Familiar Fatal (IFF), a síndrome de Gerstmann-Straussler (GSS) e a doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD) em humanos, entre outras (Gajdusek, 1996; Prusiner, 1996). Estas desordens neurodegenerativas podem ser de origem hereditária, infecciosa ou esporádica (Wadsworth et al., 2003), mas todas elas têm em comum o acúmulo de uma proteína prion que é resistente ao tratamento com proteases, denominada PrP^{RES} ou PrP^{Sc}.

Após o isolamento de PrP^{Sc}, foi demonstrado que tanto tecidos infectados quanto sadios apresentavam o mesmo nível de mRNA para proteína prion, sugerindo a existência de uma proteína prion endógena (revisto por Prusiner, 1998). Em 1985 essa hipótese foi provada quando Chesebro, Oesch e colaboradores clonaram o gene codificador da proteína prion endógena, chamada então de proteína prion celular (PrP^C) para ser diferenciada daquela causadora das encefalopatias. E em 1986, Basler e colaboradores mostraram que tanto PrP^{Sc} quanto PrP^C são codificadas pelo mesmo gene (Basler et al., 1986). Estudos estruturais revelaram tratar-se de duas isoformas diferentes da mesma proteína; PrP^{Sc} é um anômalo conformacional de PrP^C, possuindo alterações na estrutura terciária que levam a predominância de folhas- β -pregueadas ao invés de α -hélices (Baldwin et al., 1994).

A produção de PrP^{Sc} infeccioso in vitro (Castilla et al., 2005) e também a recente geração de uma isoforma protease resistente - a partir de PrP^C recombinante - que carrega todas as características de PrP^{Sc} incluindo a indução e propagação de doenças (Wang et al., 2010a), têm reforçado a hipótese inicialmente proposta por Prusiner de que a transmissão das doenças priônicas se dá pela alteração conformacional de PrP^C.

Em relação ao processo patológico, atualmente duas hipóteses têm sido propostas: a primeira delas propõe que após a conversão de PrP^C em PrP^{Sc} ocorra um ganho de função da isoforma alterada, tornando-a tóxica para o organismo; a segunda propõe que a perda de função de PrP^C leve à patogênese (revisto por Linden et al., 2008).

Os primeiros camundongos *Knock-outs* para a proteína prion celular apresentaram desenvolvimento e comportamento normais, sem qualquer defeito aparente no sistema imunológico (Bueler et al., 1992; Manson et al., 1994). Estes resultados a princípio forneceram argumentos contra a hipótese da perda de função de PrP^C como mecanismo base para patogênese das doenças priônicas. Porém, estudos mais aprofundados mostraram que estes animais apresentam alterações em alguns processos biológicos (Collinge et al., 1994; Maglio et al., 2004; Prestori et al., 2008), argumentando então a favor de importantes funções de PrP^C. Além disso, os níveis de PrP^{Sc} não possuem uma correlação direta com os sintomas clínicos (Bueler et al., 1992; Manson et al., 1994; Fischer et al., 1996; Hill et al., 2000), e PrP^{Sc} por si só não é tóxico para as células nervosas que não apresentam PrP^C (Brandner et al., 1996); de fato camundongos *Knock-outs* para PrP^C são resistentes à infecção por prion (Bueler et al., 1992; Manson et al., 1994). A depleção de PrP^C neuronal endógeno de camundongos infectados por prion levou à reversão da espongiose e previniu perda neuronal e progressão clínica da doença (Mallucci et al., 2003). Todos estes resultados apontam PrP^C como fator chave para patogênese, portanto novos estudos têm sido direcionados para o entendimento do papel desta proteína no SNC e conseqüentemente na patologia das doenças priônicas.

6.2 PROTEÍNA PRION CELULAR (PrP^C)

A proteína prion celular é uma glicoproteína ligada à membrana plasmática por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Stahl et al., 1987), expressa em neurônios, células neuroendócrinas e do sistema imune, entre outras. Sua expressão parece ser regulada ao longo do desenvolvimento, sendo notavelmente detectada durante a sinaptogênese (Sales et al., 2002).

Estruturalmente, PrP^C possui uma região N-terminal flexível, de aproximadamente 100 aa (23-124), organizada aleatoriamente; uma região C-terminal globular, de aproximadamente 100 aa (127-231), consistindo em 3 α -hélices altamente conservadas e 2 folhas- β (revisto por Linden et al., 2008); um domínio central que contém duas sequências de resíduos positivamente carregados – CC1 (23-27) e CC2 (95-110), e uma região hidrofóbica (111-134) (Prusiner, 1998; Aguzzi et al., 2008). A figura 23 mostra em detalhes os principais domínios de PrP^C.

O domínio N-terminal de PrP^C contém um peptídeo sinal, uma região formada por 4 repetições de uma sequência de 8 peptídeos (59-90) que se ligam a íons cobre (Stockel et al., 1998) e uma região polibásica formada por 4 resíduos (KKRP amino ácidos 23-26). A ligação de íons cobre à região dos octapeptídeos induz a translocação de PrP^C dos lípide *Rafts* para regiões da membrana solúveis a detergente e conseqüentemente leva à sua endocitose. Essa endocitose mediada pelos íons cobre acontece através de vesículas cobertas por clatrina e é também dependente da região polibásica de PrP^C (Taylor et al., 2005). Mutações ou deleções nas regiões dos octapeptídeos ou CC1 não levam ao desenvolvimento de doenças priônicas. Entretanto, a expressão de uma proteína prion mutada que apresenta a inserção de adicionais octapeptídeos em sua sequência, leva ao desenvolvimento de sintomas que se assemelham às doenças priônicas. Da mesma forma, deleções em CC2 e no centro hidrofóbico de PrP^C induzem aos mesmos sintomas, sugerindo que estas regiões sejam importante para o processo patológico (revisto por Aguzzi et al., 2008).

O domínio C-terminal de PrP^C possui um peptídeo sinal para a adição de uma âncora de glicosil-fosfatidilinositol (GPI), que é responsável pela inserção da proteína na membrana e direcionamento para o espaço extracelular (revisto por Harris, 1999). Esse domínio sofre várias modificações pós-traducionais e auxilia na maturação de PrP^C induzindo, juntamente com o peptídeo sinal N-terminal, o seu direcionamento para o retículo endoplasmático (Heske et al., 2004). Várias mutações na região C-terminal de PrP^C foram associadas com doenças priônicas hereditária (Muramoto et al., 1997; revisto por Aguzzi et al., 2008). Em relação à âncora de GPI, Priola e colaboradores (2009) mostraram que esta âncora não é necessária para formação de prion anormal nas células,

mas é fundamental para a persistência e transmissão célula-célula da infecção por prion (Priola and McNally, 2009;Chesebro et al., 2005). Recentemente, foi demonstrado que camundongos homozigotos expressando PrP^C sem a âncora de GPI, infectados por PrP^{Sc}, desenvolveram uma doença fatal com sintomas clínicos peculiares (Chesebro et al., 2010). Estes animais apresentaram alta infectividade, densos depósitos de PrP^{Sc} e ausência de espongiose, sugerindo que a âncora de GPI pode desempenhar um importante papel na patogênese das doenças associadas a prion (Chesebro et al., 2010). Em conjunto estes resultados mais uma vez exemplificam a importância do conhecimento dos domínios de PrP^C, bem como os ligantes deste domínios, para o esclarecimento da patogênese das doenças priônicas.

Em relação às modificações pós-traducionais, o precursor de PrP^C é direcionado para o retículo endoplasmático onde ocorre a clivagem do peptídeo sinal e a adição da âncora de GPI na extremidade C-terminal (Turk et al., 1988;Stahl and Prusiner, 1991;Rudd et al., 2001). A proteína é então direcionada para o Golgi onde sofre glicosilação dos resíduos de asparagina 180 e 196, bem como adição de ácido siálico nas cadeias oligossacarídicas e formação de uma única ponte dissulfeto entre os aminoácidos 178 e 213, gerando a proteína madura com conformação adequada que será direcionada para a membrana plasmática (Haraguchi et al., 1989;Stahl and Prusiner, 1991). A massa molecular de PrP^C pode variar de 18 a 33 Kda de acordo com o seu nível de glicosilação, ou seja, de-, mono- ou diglicosilada (revisto por Brown, 2001).

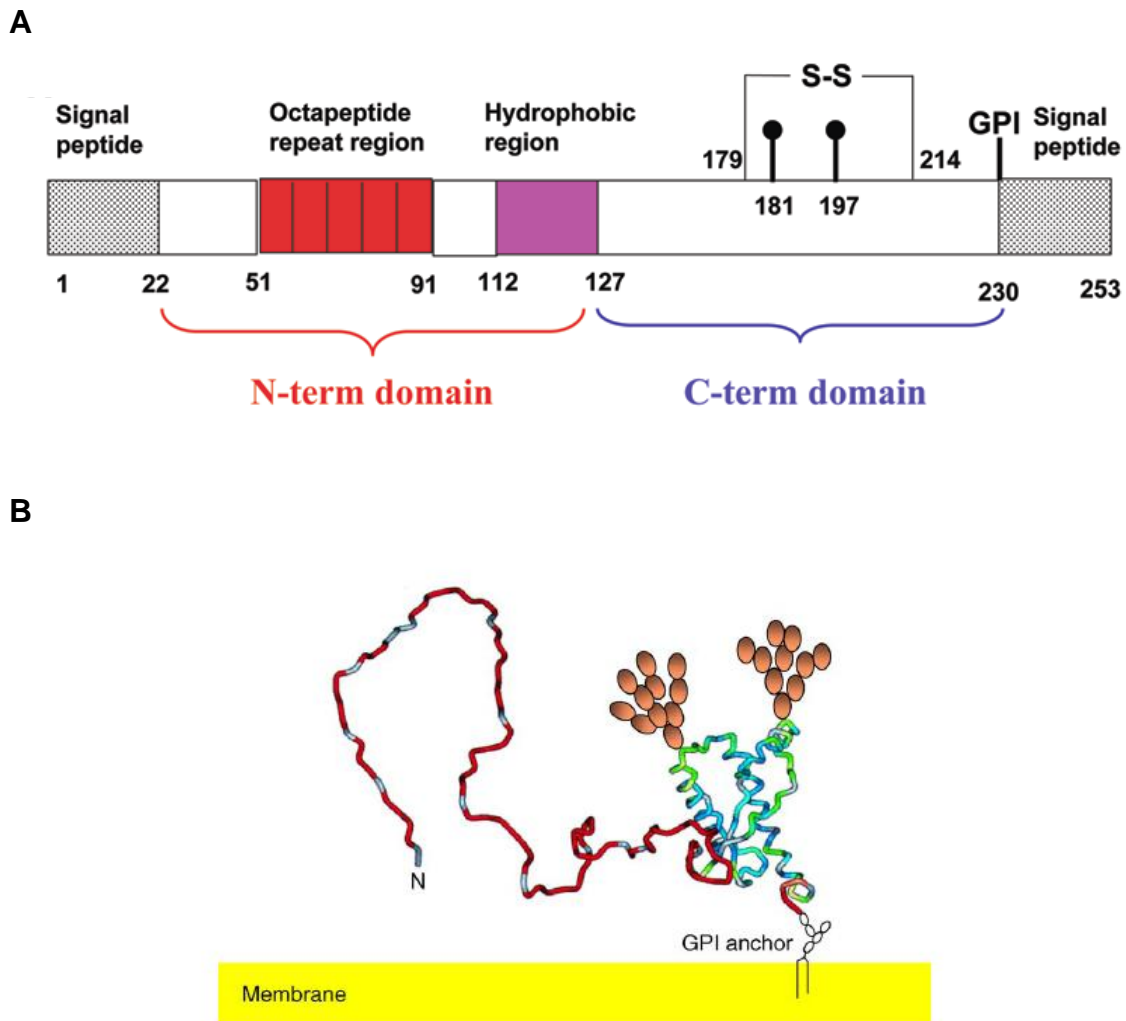


Figura 23: Estrutura primária da proteína PrP^c.

A: A numeração dos resíduos está de acordo com a sequência de PrP^c de humanos. A proteína apresenta um peptídeo sinal para direcionar a entrada no retículo endoplasmático e um sinal para ligação de GPI. PrP^c pode ser glicosilada tanto na asparagina 181 como na 197. A proteína possui ainda um segmento bastante hidrofóbico (aas 112-127) e uma ponte dissulfeto. As quatro seqüências repetitivas (51-91) podem ligar íons cobre e seu número é dependente da espécie considerada (adaptado de Pastore e Zagari.,2007). **B: Localização de PrP^c na membrana celular.** PrP^c é incorporado no lado externo da membrana plasmática através de sua âncora de GPI. A proteína madura possui um domínio C-terminal enovelado em α -hélices e folha- β anti-paralela (representadas em azul e verde respectivamente); o domínio N-terminal é desordenado, compreendendo quase metade da cadeia polipeptídica (representado em vermelho e cinza). As esferas alaranjadas representam os oligossacarídeos adicionados nos dois sítios de asparagina (adaptado de Pinheiro, 2006).

6.3 FUNÇÕES DA PROTEÍNA PRION CELULAR

A alta homologia e conservação de PrP^C entre as espécies sugerem um papel fisiológico importante para esta proteína, e apesar da sua função não ser completamente esclarecida, alguns aspectos da atividade normal de PrP^C já são conhecidos. A figura 24 mostra um esquema resumido dos processos fisiológicos nos quais PrP^C parece estar envolvido.

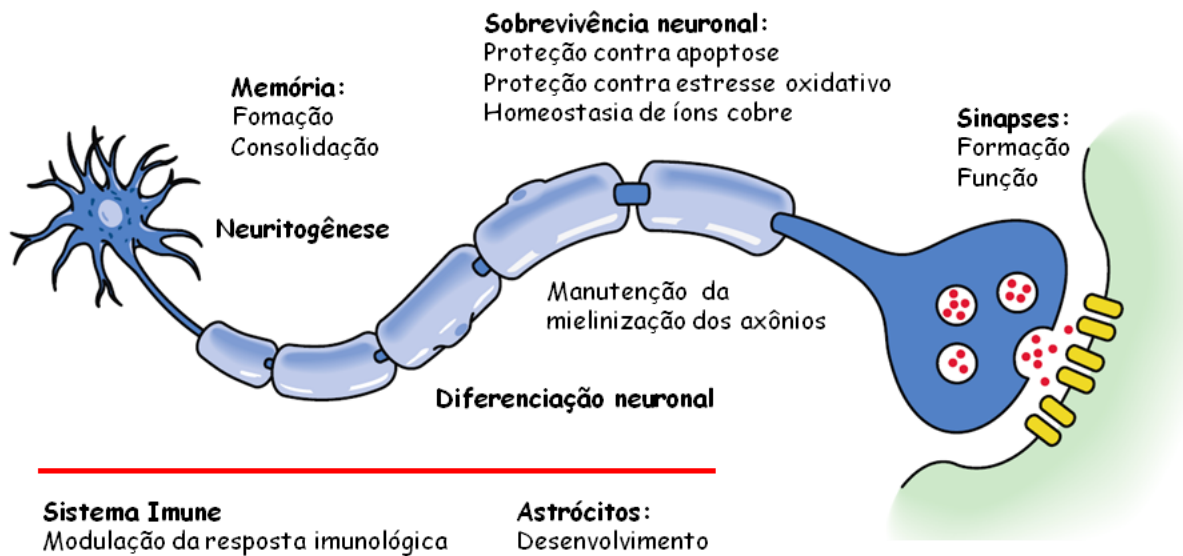


Figura 24: Processos fisiológicos mediados por PrP^C.

A proteína prion celular tem sido descrita como mediadora de vários processos fisiológicos como os descritos acima. A maior parte de suas funções parece se concentrar em neurônios, mas recentes trabalhos mostram sua atuação em diferentes tipos celulares. Adaptado de Aguzzi et al., 2008. Para melhor revisão sobre as funções fisiológicas de PrP^C ver Linden et al., 2008 e Martins et al., 2009.

O desenvolvimento de camundongos transgênicos carregando formas truncadas ou mutadas de PrP^C tem sido usado como uma ferramenta para tentar elucidar o papel desta proteína *in vivo*. Os primeiros camundongos *Knock-outs* para PrP^C (Zurich e Edinburgh) não apresentaram alterações no desenvolvimento, levando a hipótese de que esta proteína seria desnecessária (Bueler et al., 1992; Manson et al., 1994). Entretanto, estudos mais aprofundados mostraram que estes animais apresentam alterações em alguns processos biológicos como neurotransmissão, plasticidade sináptica, ritmo

cicardiano, resposta imune e memória (Collinge et al., 1994;Maglio et al., 2004;Prestori et al., 2008;Coitinho et al., 2003;de Almeida et al., 2005). Além disso, os animais apresentaram maior sensibilidade a várias condições de estresse e um limiar mais baixo para morte neuronal (revisto por Martins et al., 2009). Portanto, apesar de toda especulação existente sobre mecanismos compensatórios para a ausência de PrP^C, estes mecanismos devem ser insuficientes dadas as alterações descritas nos camundongos *Knock outs*.

Como descrito no tópico anterior, mutações em sítios específicos nas regiões N e C-terminal de PrP^C levam ao desenvolvimento de sintomas que se assemelham muito com aqueles observados nas doenças priônicas (Aguzzi et al., 2008). Não se sabe quais os mecanismos envolvidos nos efeitos patológicos causados pelas formas truncadas ou mutadas de PrP^C. Uma análise nas mutações que ocorrem nas doenças priônicas de origem genética e também nos modelos de formas truncadas/mutadas que já foram utilizados revela que muitas dessas alterações ocorrem em sítios de ligação para os ligantes de PrP^C (revisto por Collinge and Palmer, 1994;Wadsworth et al., 2003;Martins et al., 2009). Portanto, uma importante hipótese seria de que as deleções em vários domínios de PrP^C levaria à perda da sua interação com ligantes envolvidos nas suas funções celulares, levando ao desenvolvimento de doenças. É possível também que as próprias formas truncadas para PrP^C compitam pela ligação a seus ligantes, prejudicando assim a sinalização mediada pelos mesmos (Shmerling et al., 1998;Baumann et al., 2007;Li et al., 2007a).

Essa hipótese tem sido reforçada por uma grande quantidade de trabalhos mostrando a interação de PrP^C com ligantes envolvidos em importantes funções no organismo (revisto por Linden et al., 2008) (figura 25). PrP^C é capaz de se ligar a componentes da matriz extracelular (ECM) como laminina (Graner et al., 2000a;Graner et al., 2000b), vitronectina (Hajj et al., 2007), a glicosaminoglicanos como heparina e heparan sulfato (Warner et al., 2002) e a receptores de ECM como 37LRP/67LR (precursor do receptor de laminina de 37kDa/ receptor de laminina de 67kDa) (Rieger et al., 1997). A interação de PrP^C com laminina no hipocampo está associada com neuritogênese (Graner et al., 2000a) e consolidação da memória (Coitinho et al., 2006). Outra interação importante é a ligação de PrP^C com vitronectina, que foi descrita ser

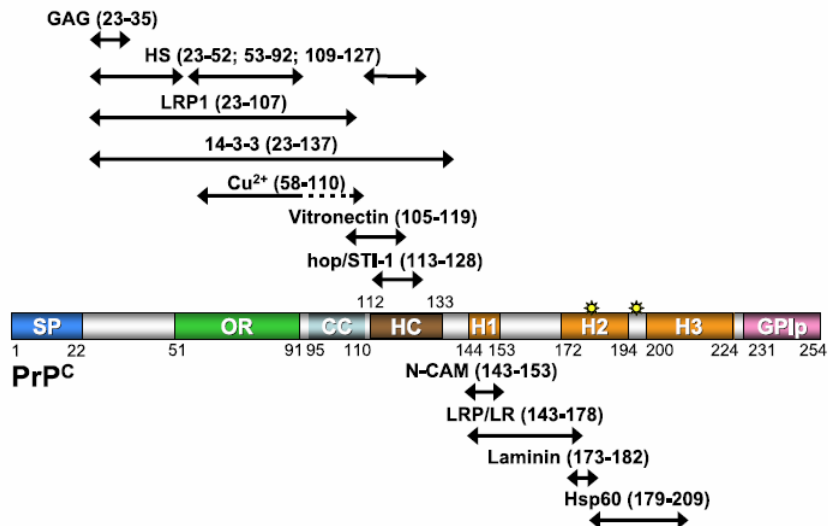
importante para o crescimento de axônios no gânglio da raiz dorsal de camundongos (Hajj et al., 2007).

Várias proteínas transmembrana com atividades neurotróficas possuem suas funções moduladas pela interação com PrP^C. Entre elas pode-se citar a molécula de adesão celular neuronal NCAM, cuja interação com PrP^C induz neuritogênese através da ativação de p59fyn Cinase (Santucci et al., 2005); integrinas (Hajj et al., 2007); receptores acoplados à proteína G (Mouillet-Richard et al., 2000) e canais iônicos de membrana (Khosravani et al., 2008b; Harris et al., 1991; Martins et al., 2009; Beraldo et al., 2010 manuscrito em preparação A).

Estas e muitas outras proteínas já foram descritas como ligantes de PrP^C, sugerindo o modelo em que PrP^C atue como uma plataforma dinâmica na superfície celular, reunindo várias proteínas e dessa forma integrando a sinalização mediada por estes complexos (Linden et al., 2008; Martins et al., 2009). A figura 25A mostra os principais ligantes de PrP^C bem como os respectivos sítios de ligação enquanto a figura 25B exemplifica as atividades neurotróficas de PrP^C através da sua associação com seus ligantes.

A STI1 talvez seja o ligante de PrP^C mais extensivamente estudado até agora. STI1 e mais dois outros importantes ligantes de PrP^C, LRP1 e oligômeros A β -amilóides, foram alvos deste trabalho e portanto serão descritos com mais detalhes nos tópicos subsequentes.

A



B

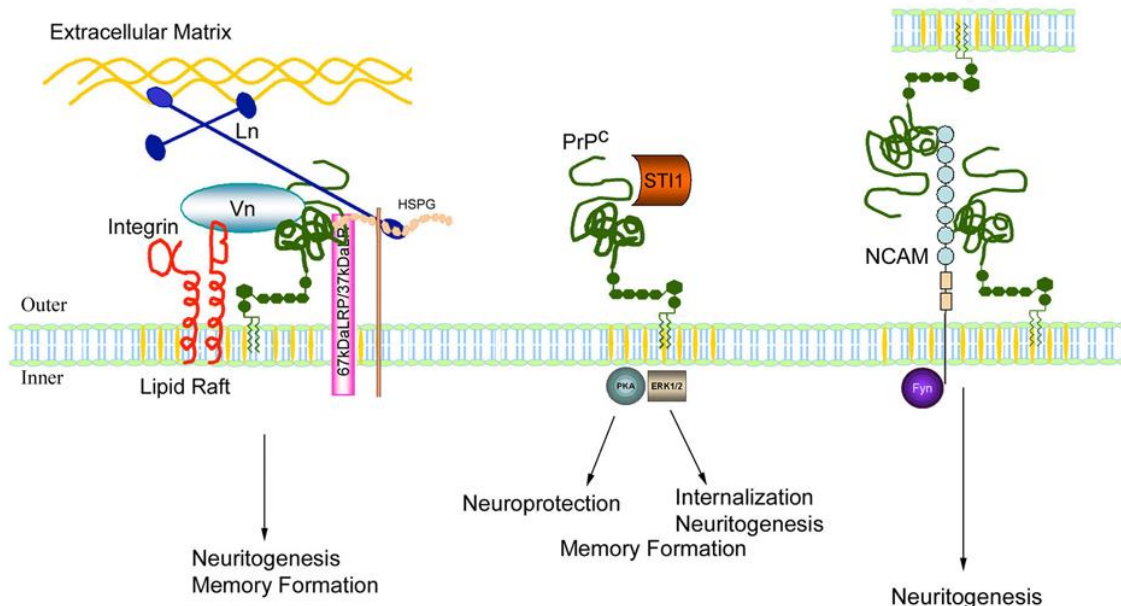


Figura 25: Ligantes da proteína prion celular.

A: A sequência traduzida de PrP^c de camundongo está representada no centro da figura. Abaixo e acima de PrP^c estão representados alguns de seus principais ligantes descritos e os respectivos domínios de ligação em PrP^c. **SP:** peptídeo sinal; **OR:** domínio de octapeptídeos repetidos; **CC:** agrupamento de cargas; **HC:** centro hidrofóbico; **H1, H2 e H3:** domínios α -hélice; **GPIp:** peptídeo de sinalização para âncora de **GPI**; as estrelas amarelas representam os resíduos de glicosilação; **GAG:** glicosaminoglicanos; **HS:** heparan sulfato; **LRP1:** proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade; **LRP:** proteína precursora do receptor de laminina; **LR:** receptor de laminina (adaptado de Linden et al., 2008). **B –** Modelo de orquestramento das atividades neurotróficas mediadas pela interação de PrP^c com seus ligantes no sistema nervoso central. **Vn:** vitronectina; **Ln:** Laminina; **HSPG:** proteoglicanos heparan sulfato; stress inducible protein-1 (adaptado de Martins et al., 2009).

6.4 STI1 COMO LIGANTE DE PrP^C

No capítulo 1 deste trabalho, a STI1 foi descrita como uma co-chaperonina que entre outras funções, atua no enovelamento de peptídeos recém-sintetizados. Nesse capítulo, será dado enfoque nas atividades de STI1 como um ligante de PrP^C, cuja interação está associada com importantes processos biológicos no sistema nervoso central.

Em 1997, Martins e colaboradores propuseram um receptor para PrP^C com base na teoria de hidropaticidade complementar (Martins et al., 1997). Esta teoria propõe que peptídeos codificados por fitas complementares do DNA são capazes de interagir entre si. Este grupo sintetizou um peptídeo que era complementar à região do DNA que codifica para os resíduos 114-129 da proteína prion de humanos. Esta região foi escolhida como molde porque foi demonstrado que o peptídeo codificado por ela era capaz de induzir morte neuronal. O peptídeo complementar foi utilizado para imunizar camundongos e os resultados do *Immunoblotting* mostraram que os anticorpos resultantes foram capazes de reconhecer uma proteína de 66 KDa em extratos de cérebro de camundongos. Este peptídeo foi capaz de se ligar à PrP^C *in vitro* e bloquear os efeitos neurotóxicos mediados pelo peptídeo 106-126 da proteína prion de humanos (considerado como peptídeo neurotóxico por dados anteriores) (Martins et al., 1997).

Chiarini e colaboradores analisaram o efeito da interação entre PrP^C e seu peptídeo complementar sobre a apoptose em explantes de retina (Chiarini et al., 2002). Os autores mostraram que esta interação previne a morte celular induzida por anisomicina nestes explantes, e que estes sinais neuroprotetores ocorrem por ativação de vias dependentes de cAMP/PKA. Anticorpos produzidos contra este peptídeo reconheceram uma proteína endógena que através de eletroforese em gel bidimensional e espectrometria de massas foi identificada como sendo a STI1. Neste trabalho foi sugerido que PrP^C e STI1 interagem fortemente *in vivo*, e demonstrou-se que esta interação induz sinais neuroprotetores em retina (Zanata et al., 2002).

Na busca pela relevância fisiológica desta interação Lopes e colaboradores mostraram que a interação de PrP^C e STI1 promove neuritogênese e

neuroproteção em culturas de hipocampo, por vias distintas de sinalização (Lopes et al., 2005). A neuritogenese induzida por esta interação é mediada pela via das MAP cinases (MAPK) enquanto a neuroproteção foi mediada pela via da Proteína Cinase A (PKA). Sakudo e colaboradores também confirmaram o envolvimento da interação STI1-PrP^C na modulação da sobrevivência neuronal, através da ativação da Superóxido dismutase dependente desta interação (Sakudo et al., 2005). Desde então, as consequências fisiológicas decorrentes da interação STI1-PrP^C tem sido extensivamente estudadas e como resultado de todos estes anos de estudo algumas funções já foram estabelecidas. Coitinho e colaboradores (2006) mostraram que a interação STI1-PrP^C aumenta a formação da memória de curto-termo e a consolidação da memória de longo-termo no hipocampo de ratos. Lima e colaboradores mostraram que a interação STI1-PrP^C (com STI1 expressa em astrócitos e PrP^C expresso em neurônios) induz diferenciação neuronal (Lima et al., 2007). Neste mesmo trabalho os autores mostraram que STI1 é secretada por astrócitos induzindo sobrevivência neuronal novamente através de sua interação com PrP^C (Lima et al., 2007). Ainda sobre astrócitos, foi demonstrado que a interação STI1-PrP^C regula o desenvolvimento destas células (Arantes et al., 2009). Em conjunto, estes resultados apontam STI1 como um fator neurotrófico, atuando na manutenção, sobrevivência e diferenciação neuronal através da sua interação com PrP^C. Tendo em vista que PrP^C é uma proteína ancorada à membrana celular e STI1 é predominantemente citoplasmática, essas atividades neurotróficas só são possíveis porque STI1 é secretada para o espaço extracelular podendo então interagir com PrP^C na membrana. Isso sugere que STI1 é uma proteína de vida dupla mediando funções intra e extracelulares.

Os mecanismos pelos quais STI1-PrP^C exercem suas atividades ainda não estão esclarecidos. Um trabalho recente mostrou que esta interação induz aumento na síntese de proteínas neuronais através das vias de sinalização PI3K-Akt-mTOR (do inglês *Phosphoinositide 3-kinase – Akt - mammalian target of rapamycin complex-1*) e ERK1/2 (Roffe et al., 2010). A síntese protéica foi importante para as atividades neurotróficas mediadas pela interação STI1-PrP^C, e foi parcialmente inibida pela infecção com PrP^{Sc}. Estes resultados constituem um passo importante na elucidação dos mecanismos envolvidos

nas atividades mediadas por STI1-PrP^C. Um melhor entendimento destes processos, incluindo caracterização das vias *Downstream* STI1-PrP^C, identificação dos mediadores transmembrana que conectam STI1-PrP^C com a sinalização intracelular, regulação da secreção de STI1 e tráfego-localização intracelular de STI1 e PrP^C, certamente contribuirão para o entendimento das funções fisiológicas da proteína prion celular e da patogênese das doenças priônicas.

6.5 PROTEÍNA RELACIONADA AO RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE

A proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade ou LRP1, inicialmente identificada por sua alta homologia estrutural com o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL), é um receptor multifuncional que possui vários ligantes distintos (Herz et al., 1988). Trata-se de uma glicoproteína de membrana, expressa em vários tipos celulares, entre eles neurônios, onde exerce um papel fundamental na captação de colesterol e ácidos graxos provenientes da glia adjacente (Bu et al., 1994a; Bu et al., 1994b). Mais de 30 ligantes já foram descritos para LRP1, incluindo a apolipoproteína E (ApoE), proteína precursora amilóide (APP) e α_2 -macroglobulina (Taylor and Hooper, 2007b). Um outro ligante interessante descrito é o receptor urokinase de plasminogênio ativado (uPAR) - cuja internalização depende de sua ligação a LRP1 (Horn et al., 1998).

Assim como PrP^C, uPAR é uma proteína ancorada por GPI localizada nos lípide *Rafts* (Stahl and Mueller, 1995). Tendo em vista o envolvimento de LRP1 no tráfego de este receptor, Taylor e Hooper decidiram investigar a participação de LRP1 na endocitose de PrP^C (Taylor and Hooper, 2007a). Estes autores mostraram que LRP1 participa da endocitose de PrP^C mediada por íons cobre em células neuronais. No mesmo ano, um outro grupo de pesquisa confirmou a participação de LRP1 na endocitose de PrP^C em células neuronais, e também mostrou que LRP1 se liga à PrP^C em compartimentos biosintéticos, como o retículo endoplasmático, mediando o tráfego de PrP^C até a superfície neuronal (Parkyn et al., 2008). Estes resultados sugerem que LRP1 possa ser a ponte entre PrP^C e as vias de sinalização intracelulares.

Além do seu envolvimento na endocitose de diversos ligantes, LRP1 também parece contribuir para eventos de sinalização que medeiam proliferação, migração e diferenciação celular (Caceres et al., 2010). Muratoglu e colaboradores mostraram que o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) se associa com LRP1 em compartimentos endossomais, formando um complexo de sinalização que ativa a fosforilação de ERK1/2 (Muratoglu et al., 2010). Este e outros trabalhos suportam o envolvimento de LRP1 na ativação da via de MAP Kinase (Bonacci et al., 2007;Caceres et al., 2010). Como dito anteriormente, a interação ST11-PrP^C promove diferenciação neuronal através da ativação de MAPK, porém não se sabe qual o mediador transmembrana responsável por conectar este estímulo que ocorre na superfície celular, com as vias de sinalização intracelular. Tendo em vista os dados apresentados acima mostrando ativação de ERK por LRP1, e seu envolvimento na endocitose de PrP^C, a nossa hipótese é de que este receptor seja um dos mediadores transmembrana envolvido em alguma das sinalizações dependentes de ST11-PrP^C.

6.6 PEPTÍDEOS A β -AMILÓIDES, DOENÇAS PRIÔNICAS E DOENÇA DE ALZHEIMER

Uma das principais características observadas na doença de Alzheimer (DA) é a presença de placas insolúveis no cérebro dos paciente, formadas pelo depósito de diferentes formas da proteína A β -amilóide. As proteínas β -amilóides podem existir como monômeros e oligômeros solúveis, fibrilas intermediárias a agregados fibrilares insolúveis (Klein, 2002a;Klein, 2002b). Por muito tempo acreditou-se que o depósito das formas fibrilares de A β era o principal responsável pela neurodegeneração e pelo dano cognitivo associado a esta doença (Lorenzo and Yankner, 1996). Porém a quantidade de formas solúveis de A β no cérebro se correlaciona muito melhor com a extensão da perda sináptica, severidade do prejuízo cognitivo e grau de demência (Terry, 1996;Lue et al., 1999;McLean et al., 1999;Wang et al., 1999;Lemere et al., 2002). Os processos celulares envolvidos na plasticidade sináptica são extremamente vulneráveis às formas solúveis de A β . o acúmulo destas formas leva à disfunção sináptica, o que em parte explica o déficit cognitivo observado

na DA (Rebola et al., 2010). Concentrações nanomolares de oligômeros A β mas não de monômeros, inibem significativamente a potenciação a longo termo, LTP (modelo clássico de plasticidade sináptica, que está associado com aprendizado e memória) (Walsh et al., 2002). Os mecanismos envolvidos ainda não são completamente esclarecidos, mas a elucidação das proteínas envolvidas nesse processo certamente constitui um importante alvo para o desenvolvimento de drogas para esta doença.

Vários estudos têm mostrado a participação da transmissão glutamatérgica e colinérgica nos efeitos mediados pelos Oligômeros A β . Estes oligômeros aumentam a excito-toxicidade mediada pelos receptores NMDA e mGluR (revisado por Ondrejcek et al., 2010; Renner et al., 2010b) e também se ligam aos receptores nicotínicos $\alpha 7$ mediando os efeitos inibitórios sobre LTP (Wang et al., 2000a; Wang et al., 2000b; Wang et al., 2009). Recentemente, a proteína prion celular foi identificada como um novo ligante de A β (Lauren et al., 2009; Chen et al., 2010; Balducci et al., 2010). Foi demonstrado que os A β -oligômeros se ligam à PrP^C com alta afinidade, levando aos mesmos prejuízos na plasticidade sináptica observados em modelos animais da Doença de Alzheimer (Lauren et al., 2009). O desenvolvimento de uma linhagem de camundongos modelo para AD e ao mesmo tempo *Knock outs* para PrP^C também mostrou a participação da proteína prion celular no déficit cognitivo induzido por A β (Gimbel et al., 2010). Esse trabalho sugeriu um forte link entre a interação A β -PrP^C e a subsequente perda de marcadores sinápticos, degeneração de axônios serotoninérgicos, sobrevivência e prejuízo na memória.

Apesar destes trabalhos apontarem PrP^C como mediador dos efeitos neurotóxicos induzidos por A β , novos trabalhos têm argumentado contra esta hipótese. Balducci e colaboradores mostraram que camundongos expressando PrPC ou *Knock-outs* para esta proteína foram igualmente susceptíveis ao dano sináptico induzido por A β (Balducci et al., 2010). Da mesma forma, Callela e colaboradores mostraram que a super expressão ou a deleção de PrP^C não afeta o dano na plasticidade sináptica visto em camundongos transgênicos modelos de AD (Callela et al., 2010). Portanto, ainda permanece a questão se PrP^C está envolvido nos efeitos neurotóxicos induzidos por A β . Apesar do

conflito de resultados, todos os grupos confirmaram que A β se liga à PrP^C com alta afinidade (Lauren et al., 2009; Balducci et al., 2010; Calella et al., 2010), sugerindo que estas proteínas estão envolvidas em algum processo comum no SNC.

Parkin e colaboradores mostraram que a superexpressão de PrP^C leva à inibição do processamento de APP (proteína precursora dos peptídeos A β -amilóides) pela β -secretase, diminuindo a formação dos peptídeos A β (Parkin ET AL., 2007). Estes resultados sugerem que PrP^C possa atuar *Upstream* à produção dos oligômeros A β e à toxicidade intracelular, mas não se sabe ainda quem são os outros mediadores deste processo. Sabe-se, que PrP^C induz sobrevivência neuronal, formação e consolidação da memória através de sua interação com STI1 (Lopes et al., 2005; Coitinho et al., 2006; Lima et al., 2007). Sabe-se também que PrP^C induz neuroproteção através de sua interação com receptores NMDA (Khosravani et al., 2008a; Khosravani et al., 2008b). Estes e outros exemplos de sinais protetores mediados pela interação da proteína prion celular com seus diversos ligantes suscitam a hipótese de que a perda destas interações pela ligação de A β a PrP^C leve a disfunção no SNC.

Além disso, uma outra importante observação é de que os oligômeros A β se ligam nos segmentos ~95-110 e 23-27 na sequência da proteína prion celular (Lauren et al., 2009; Chen et al., 2010). Estes resíduos estão presentes em domínios na região N-terminal de PrP^C que são fundamentais para sua endocitose. Tendo em vista a importância da endocitose para sinalização mediada por PrP^C, é fundamental a avaliação do efeito dos oligômeros sobre seu tráfego.

6.7 TRÁFEGO E SINALIZAÇÃO

A endocitose é caracterizada pela internalização de moléculas da superfície celular para dentro de compartimentos intracelulares (revisado por Le and Wrana, 2005). É um importante mecanismo envolvido na manutenção da homeostasia celular. Além da captação de nutrientes e comunicação celular, um papel bem estabelecido da endocitose é a internalização de receptores de superfície (Gonzalez-Gaitan and Stenmark, 2003). Esse processo é crucial

para a regulação da sinalização, do turnover do receptor e da magnitude, duração e natureza dos eventos de sinalização. O fato de que o bloqueio da endocitose atenua significativamente a sinalização dependente de EGF (fator de crescimento epidermal) é um dos exemplos do requerimento da endocitose para transdução de sinal (revisto por Gonzalez-Gaitan, 2003). A regulação da sinalização pela endocitose apresenta várias vantagens: 1) O tráfego endocítico pode dar acesso a complexos de sinalização que estão em compartimentos intracelulares; 2) permite a escolha de vias alternativas de sinalização a partir do mesmo receptor, a primeira ocorrendo na membrana e a segunda ocorrendo nos endosomas; 3) determina a cinética da sinalização que leva a efeitos diferentes e 4) fornece um mecanismo pelo qual a sinalização gerada no terminal pré-sináptico alcança o corpo celular do neurônio (revisto por González-Gaitán., 2003). Dessa forma, conclui-se que o tráfego endocítico de muitas proteínas está intimamente relacionado com a sinalização mediada pelas mesmas.

Em relação a PrP^C, sua endocitose tem sido alvo de intensos estudos pois acredita-se que seu tráfego intracelular seja essencial no processo patológico de conversão para a isoforma alterada. Américo e colaboradores e Caetano e colaboradores mostraram que a ativação de ERK1/2 induzida pela interação STI1-PrP^C é dependente da endocitose de PrP^C, sugerindo um importante papel da endocitose na sinalização mediada por este complexo (Americo et al., 2007;Caetano et al., 2008). Um melhor entendimento do tráfego de PrP^C e STI1 trará muitas informações a respeito da biologia destas proteínas, e pode também auxiliar na compreensão dos mecanismos patológicos nos quais elas estão envolvidas. Os dados sobre o tráfego de PrP^C serão apresentados adiante. Os próximos tópicos têm o objetivo de revisar os mecanismos fisiológicos que regem a endocitose de proteínas.

6.8 INTERNALIZAÇÃO DE PROTEÍNAS

O tráfego vesicular pode ser realizados por vários processos; as duas principais vias são a clássica, que é a via endocítica dependente de clatrina, e

a não-clássica, que corresponde às vias independentes de clatrina, mas dependentes de lípide *Rafts* (Nichols, 2002; Le and Wrana, 2005).

A via clássica, responsável pela internalização de nutrientes, patógenos, antígenos, fatores de crescimento e receptores é a via endocítica mais bem caracterizada. De modo geral, os receptores e outras proteínas de membrana que seletivamente se acumulam nas invaginações revestidas possuem motivos protéicos específicos em seus domínios citoplasmáticos que são reconhecidos pela maquinaria de endocitose via clatrina (revisto por Trowbridge et al., 1993). Dessa forma, através de interações proteína-proteína, esses motivos recrutam as proteínas adaptadoras - AP2, AP180 e epsinas - que reconhecem e se ligam ao complexo a ser endocitado. Essa ligação recruta as cadeias de clatrina que estão no citosol para a região do complexo, formando então as vesículas cobertas por clatrina (CCVs), que são destacadas da membrana plasmática por um processo dependente da GTPase Dinamina (Gaidarov et al., 1999; Farsad et al., 2001; Schmidt, 2002; Mousavi et al., 2004; Edeling et al., 2006). Os fosfolípidos também são muito importantes na endocitose via clatrina. Já foi demonstrado que o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P₂) e o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PtdIns(3,4,5)P₃) estão envolvidos na endocitose constitutiva e estimulada desta via (revisto por Le and Wrana, 2005). Além disso, muitas das proteínas adaptadoras interagem com estes lípidos, como a Epsina e Dab2, dessa forma, cinases lipídicas e fosfatases também têm um importante papel na formação de vesículas (revisto por Le and Wrana, 2004; revisto por Mousavi et al., 2004).

Dentro das conhecidas rotas endocíticas independente de clatrina temos a fagocitose, a captação mediada por caveolae, a macropinocitose e a captação constitutiva não-clatrina. Especula-se que estes mecanismos não utilizam interações proteína-proteína para concentrar receptores ou revestir vesículas; basicamente eles exploram diferenças na composição de lípidos e proteínas de membrana (revisto por Nichols and Lippincott-Schwartz, 2001).

A fagocitose é um processo no qual grandes partículas (> 0.5 μm) são internalizadas pelas células. A captação é tipicamente disparada pela ligação destas partículas a receptores de superfície celular capazes de transduzir um estímulo fagocítico. Este estímulo resulta na polimerização localizada de actina e subsequente extensão de pseudópodes que englobam a partícula ligada

formando um fagossoma citoplasmático. Em mamíferos, esta via atua como uma primeira linha de defesa contra microorganismos, e também no processamento e apresentação de antígenos derivados de bactérias para linfócitos T, sendo portanto um importante componente da resposta imune humoral (revisito por Mellman, 1996;Nichols and Lippincott-Schwartz, 2001).

A macropinocitose envolve a internalização de extensas áreas da membrana plasmática junto com significantes quantidades de fluidos. Este tipo de captação parece refletir uma captura passiva de fluidos extracelulares, e ocorre quando ondulações da membrana plasmática (*Ruffling*) se fundem novamente com a mesma para gerar vesículas largas ($> 1 \mu\text{m}$) e irregulares denominadas macropinosomos. Estas ondulações da membrana são formadas por um extensivo rearranjo de actina, sendo independentes da atividade de dinamina, e são enriquecidas de lípide *Rafts* específicos e fosfoinosítídeos (Mellman, 1996;Kirkham and Parton, 2005). Além disso, estes prolongamentos são regulados pela GTPase ARF6, que induz uma produção localizada de fosfatidilinositol bifosfato ($\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$) por ativação da fosfatidilinositol 4-fosfato 5-cinase na membrana plasmática. Estes mediadores então exercem um papel regulatório na macropinocitose (revisito por Nichols e Lippincott-Schwartz, 2001). Por ser um processo inespecífico, esta via é utilizada por alguns vírus para entrarem dentro das células (revisito por Pelkmans and Helenius, 2003).

Ainda dentro do grupo das vias independentes de clatrina existem as vias sensíveis à depleção de colesterol, ou vias dependentes de lípide *Rafts* (Parton and Richards, 2003). Propostos há mais de quinze anos atrás, os lípide *Rafts* foram originalmente definidos como sendo frações da membrana insolúveis em detergente Triton X-100 a 4°C (Brown and Rose, 1992;Simons and Toomre, 2000;Simons and Ikonen, 1997). Atualmente, sabe-se que estas estruturas formam microdomínios altamente dinâmicos na membrana plasmática, enriquecidos de colesterol e esfingolípidos, e estão envolvidos no tráfego e sinalização de diversas moléculas (Simons and Toomre, 2000;Simons and Ikonen, 1997). A presença de receptores ionotrópicos, cinases da família Src e proteínas ancoradas por GPI nestes domínios, apontam os lípide *Rafts* como plataformas de sinalização (Simons and Toomre, 2000;Allen et al., 2007). O principal mecanismo de endocitose nestes domínios ocorre através dos

caveolae, que são estruturas em forma de garrafa, enriquecidas de lípide *Rafts*, de pH neutro, constituídas principalmente pela proteína caveolina1 (Pelkmans and Helenius, 2003;Pelkmans et al., 2001). Bioquimicamente estes domínios são caracterizados pelo acúmulo da proteína caveolina, que faz parte de uma família de proteínas de ligação ao colesterol (Mellman, 1996; Nichols e Lippincott-Schwartz, 2001). A expressão de caveolinas em células pode ser correlacionada com o aparecimento de caveolae, o que mostra a importância destas proteínas na formação e manutenção dos mesmos (Fra et al., 1995). A endocitose via caveolae compartilha algumas características com a via dependente de clatrina, como o processo de fissão, mas diferente da associação dinâmica de clatrina com a membrana plasmática, os caveolae formam associações estáveis e de lenta motilidade (Pelkmans and Helenius, 2003;Kirkham and Parton, 2005). Apesar de também ser um processo dependente de dinamina, os endosomas formados pelos caveolae são distintos daqueles encontrados na via clássica, e parecem direcionar o material endocitado para o Golgi (Nichols, 2002). Esta via está envolvida na entrada de vírus não envelopados como o vírus SV40, e na endocitose de moléculas como a cólera toxina, o ácido fólico, o fator de motilidade autócrino, entre outras (Pelkmans et al., 2001;Rajendran and Simons, 2005).

Além dos caveolae existem outros mecanismos “não-clássicos”, dependentes de lípide *Rafts* mas que são independentes de dinamina. Estes mecanismos ainda são pouco esclarecidos, mas parece ser uma via constitutiva envolvida no direcionamento de marcadores de lípide *Rafts* e lípidos da membrana plasmática para o aparato de Golgi (revisto por Nichols e Lippincott-Schwartz, 2001). Já foi demonstrado que proteínas como o receptor β de interleucina-2, a subunidade B da cólera toxina (CTxB) e proteínas ancoradas por GPI utilizam esta via endocítica (revisto por Le Roy e Wrana, 2005).

Outra proteína, integrante dos lípide *Rafts*, que foi descrita como determinante de uma nova via endocítica independente de clatrina, é a flotilina (Glebov et al., 2006). Trabalhos do grupo do Dr. Nichols mostraram que a flotilina 1 e 2 parece definir uma via endocítica distinta de clatrina, caveolae e independente de dinamina 2 (Glebov et al., 2006;Frick et al., 2007).

6.9 TRÁFEGO DE PROTEÍNAS APÓS ENDOCITOSE

Uma vez endocitadas, as moléculas de superfície são direcionadas para organelas específicas. As principais organelas endocíticas são os endosomas de distribuição, os endosomas de reciclagem, os endosomas tardios e os lisosomas. Estas estruturas são extremamente dinâmicas de modo que é praticamente impossível identificá-las com base na sua morfologia ou posição no citoplasma (Mellman, 1996). Dessa forma a identificação destas estruturas é feita através de marcadores específicos, que normalmente são moléculas envolvidas nas funções desta organelas ou moléculas carreadas por elas.

Um importante grupo de marcadores são as proteínas Rab. Estas proteínas são GTPases envolvidas na biogênese, fusão e maturação endosomal, e regulam o transporte vesicular na endocitose e exocitose (Schimmoller et al., 1998). Mais de 60 tipos de Rab já foram identificadas em células humanas revisto por (Pfeffer and Aivazian, 2004); cada uma delas pode estar associada à membrana de compartimentos distintos, o que permite a identificação destas organelas (Pfeffer, 2001).

Os endosomas primários (endosomas de distribuição e de reciclagem) são responsáveis pela separação física das moléculas e correta distribuição das mesmas para outras organelas. Eles representam um sítio comum a várias vias endocíticas, sendo as primeiras organelas a receberem a carga internalizada (revisto por Mellman, 1996). Os endosomas de distribuição (ED) são estruturas túbulo-vesiculares localizadas periféricamente, com pH luminal levemente ácido (~ 6.0) (Johnson et al., 1993). Como consequência de seu baixo pH luminal muitos ligantes são liberados de seus receptores nesta organela, e este constitui o primeiro passo do evento de distribuição, que constitui no envio das proteínas para seu próximo destino intracelular (Mukherjee et al., 1997). Os receptores e as porções da membrana juntamente com suas proteínas que foram endocitados são direcionados para a região tubular destes endosomas, enquanto os ligantes permanecem na região vesicular (revisto por Maxfield and McGraw, 2004). É importante ressaltar que esta distribuição é feita com base na geometria destas organelas e não depende de interações proteína-proteína (revisto por Maxfield and McGraw, 2004). Estes endosomas se translocam ao longo dos microtúbulos e durante este percurso eles direcionam seu conteúdo

tubular para os endosomas de reciclagem e seu conteúdo vesicular para os endosomas tardios (Maxfield e McGraw, 2004). O principal marcador destes endosomas é a proteína Rab5, que juntamente com a proteína EEA1 (do inglês *Early Endosomal Antigen 1*) auxiliam na fusão de vesículas endocíticas primárias (derivadas de vesículas cobertas) com endosomas de distribuição pré-existentes. Rab4 é um outro marcador que controla o fluxo de proteínas que saem dos endosomas de distribuição diretamente para a membrana plasmática. Esta Rab também regula a reciclagem de moléculas originadas dos endosomas de reciclagem (revisto por Somsel and Wandinger-Ness, 2000).

Os endosomas de reciclagem (ER) são constituídos por várias organelas tubulares de aproximadamente 60 nm de diâmetro que estão associadas com microtúbulos (Maxfiel e MacGraw, 2004). A distribuição destes compartimentos varia de acordo o tipo celular, mas já foi demonstrado que parte destas estruturas estão próximas à membrana plasmática, e parte é translocada ao longo dos microtúbulos para regiões perinucleares (revisto por Mellman, 1996). Estes endosomas podem direcionar as moléculas recebidas para vários destinos diferentes, mas a maior partes delas retorna para a membrana plasmática. Um importante destino é o direcionamento de algumas proteínas como o TGN38 para a rede trans-Golgi (Maxfiel e MacGraw, 2004). Os ERs também participam da reciclagem de lípidos de volta à membrana plasmática, auxiliando assim na manutenção da mesma. O principal marcador desta população de endosomas é proteína Rab11. Esta proteína se acumula nos ERs e parece ter um papel na homeostase dos mesmos, além de controlar a saída de vesículas para a membrana plasmática e também o tráfego de vesículas originadas no Golgi com passagem por estes endosomas (revisto por Somsel and Wandinger-Ness, 2000).

Os endosomas tardios (ET) são mais comumente formados a partir do amadurecimento dos endosomas de distribuição. Este amadurecimento é caracterizado pela diminuição do pH luminal e o bloqueio da fusão dos EDs com vesículas recém endocitadas (Maxfiel e MacGraw, 2004). Dessa forma, os ETs são normalmente formados 4-30 minutos após a captação endocítica em células de mamíferos (Piper and Luzio, 2001). Vistos através de microscopia eletrônica, os ETs são mais esféricos que os EDs e se localizam na região perinuclear, sendo concentrados próximos ao centro de organização dos

microtúbulos (Piper and Luzio, 2001). Além disso, eles são diferenciados dos endosomas primários por seu pH luminal mais baixo, pela diferente constituição protéica e associação com outras proteínas Rab (revisito por Somsel and Wandinger-Ness, 2000). Estas organelas recebem proteínas da TGN, que normalmente são enzimas constituintes do compartimento lisosomal. Como os ETs sofrem fusão heterotípica com lisosomas, eles entregam eficientemente estas enzimas e também a carga destinada à degradação para estas organelas (Luzio et al., 2000; Mullins and Bonifacino, 2001).

Uma característica importante dos endosomas tardios é a presença de membranas internas (Kobayashi et al., 1998; Piper and Luzio, 2001). Por esta razão, estas organelas também são referidas como corpos multivesiculares (MVBs). É sugerido que o acúmulo de membranas internas se inicia nos endosomas primários, e continua ao longo do processo de maturação (Piper and Luzio, 2001). Como descrito anteriormente, a maior parte dos ETs ou MVBs se fundem com lisosomas pré-existentes para degradar seus conteúdos. Porém os MVBs podem se fundir com a membrana plasmática, liberando vesículas para o meio extracelular. Estas vesículas foram denominadas como exosomas, e sua secreção foi observada inicialmente em reticulócitos, células apresentadoras de antígenos, células do epitélio intestinal e tumorais (Fevrier and Raposo, 2004; Thery et al., 2002). Fauré e colaboradores mostraram que exosomas são liberados por neurônios e células gliais, propondo que estas estruturas possam exercer um papel regulatório nas sinapses e atuar na comunicação celular (Faure et al., 2006). Um interessante trabalho mostrou que células gliais são capazes de secretar PrP^C e PrP^{Sc} em associação com exosomas, e que os exosomas contendo PrP^{Sc} são infecciosos (Fevrier et al., 2004).

Em relação aos marcadores dos ETs, algumas proteínas Rab como a Rab9 e Rab7 são extremamente importantes para estas organelas, porém elas também são comuns a outras estruturas. A Rab9 está presente nos endosomas tardios e também na TGN, sendo responsável pelo transporte de vesículas dos ETs para o Golgi (Bucci et al., 2000). A Rab7 controla a agregação e fusão de endosomas tardios e lisosomas, sendo essencial para manutenção e biogênese do compartimento lisosomal (Bucci et al., 2000). Além destas, outras proteínas como LAMPs e LGPs, são marcadores comuns a ETs e

lisosomas; sendo somente o receptor de manose-6-fosfato (MPR) independente de cátion específico dos endosomas tardios (revisto por Mellman, 1996). Dessa forma, os lisosomas podem ser distinguidos pela ausência de MPR independente de cátion e por sua densidade mais alta em gradiente de percol. Eles constituem o sítio final de acumulação de moléculas internalizadas destinadas à degradação, e possuem várias enzimas, sobretudo hidrolases ácidas, que requerem um baixo pH luminal (revisto por Mellman, 1996).

Além destas, outras organelas foram identificadas recentemente, juntamente com as novas vias endocíticas as quais estão relacionadas (Pelkmans et al., 2001; Nichols, 2002; Glebov et al., 2006; Lakadamyali et al., 2006). Portanto, apesar de algumas organelas clássicas serem comuns a diferentes vias, o destino final das moléculas internalizadas dependerá da via endocítica utilizada pelas mesmas.

De modo geral as proteínas internalizadas via clatrina, como transferrina e seu receptor, são primeiramente direcionadas para endosomas de distribuição. Proteínas de membrana e os receptores presentes nestas organelas são redirecionados para membrana plasmática de forma direta ou passando primeiro pelos endosomas de reciclagem. Os ligantes do conteúdo vesicular são direcionados para endosomas tardios e daí para o Golgi ou para lisosomas onde serão degradados (revisto por Maxfield e McGraw, 2004) (Figura 26)

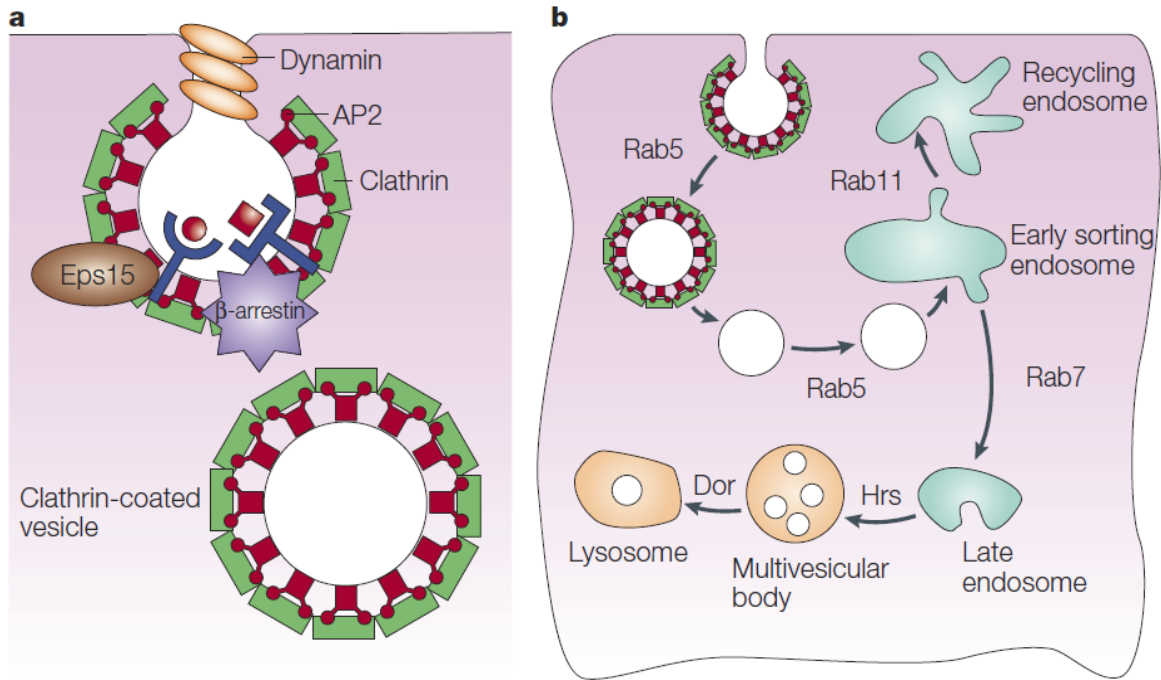


Figura 26: Endocitose pela via clássica.

A- A endocitose por esta via se inicia com o recrutamento das proteínas adaptadoras AP2, Eps15, β -arrestina e AP180 (não representado), que reconhecem seqüências específicas na carga a ser endocitada. As cadeias de clatrina reconhecem as proteínas adaptadoras formando uma cobertura em torno da invaginação na membrana. Essa *Pit* será destacada da membrana através da atividade de GTPases como dinamina formando as vesículas cobertas por clatrina. **B** – Uma vez no citoplasma as vesículas perdem a cobertura de clatrina e seu conteúdo é direcionado para endossomos de distribuição (Early sorting endosome) que pode direcionar as proteínas para os endossomos de reciclagem (Recycling endosome) em um processo dependente de Rab11, ou para os endossomos tardios (late endosome) de modo dependente de Rab7. A partir dos endossomos tardios, as proteínas vão para os corpos multivesiculares (Multivesicular body), para o Golgi (não representado) ou para os lisossomos (Lysosome) onde serão degradadas (adaptado de González-Gaitán., 2003).

Já as proteínas ou lípidos internalizados por vias independentes de clatrina, mas dependentes de lípidos *Rafts*, podem ser direcionados para organelas comuns da via clássica, como endossomos primários ou de reciclagem, e/ou para organelas específicas (Pol et al., 2000; Pelkmans et al., 2004) (Fig. 27).

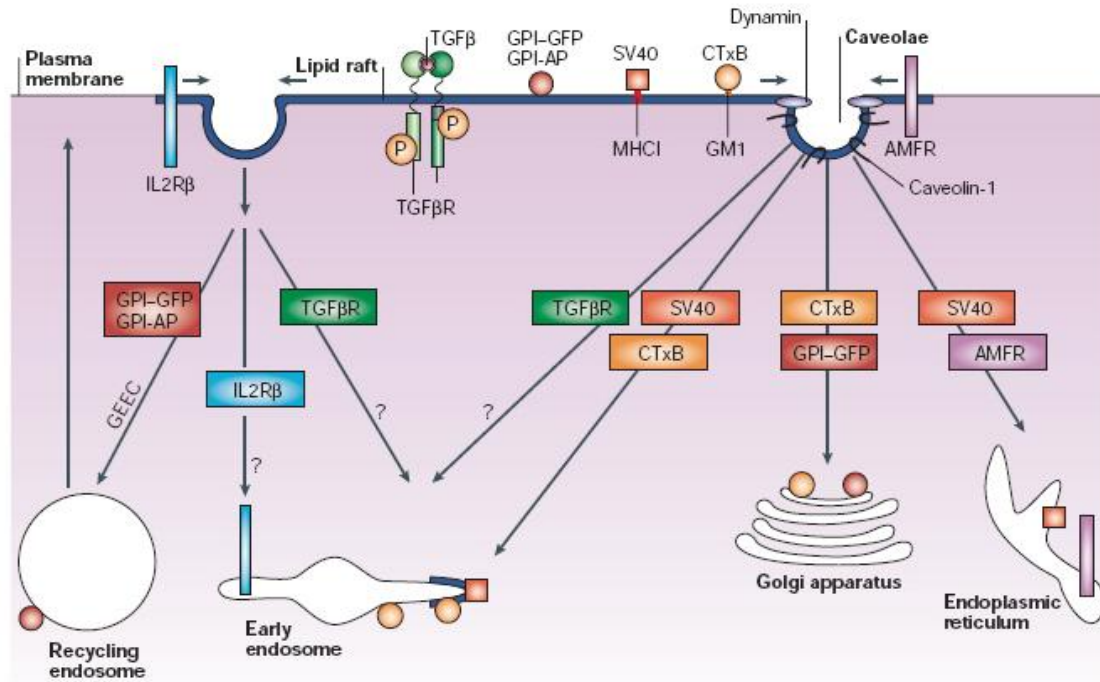


Figura 27: Vias de endocitose independentes de clatrina.

Moléculas de superfície como Simian virus 40 (SV40), subunidade B da cólera toxina (CTxB), proteína verde fluorescente ancorada por GPI (GPI-GFP), proteínas ancoradas por GPI (GPI-Aps), TGFβR (transforming growth factor β receptor), receptor-β de interleucina-2 (IL2βR) e o receptor do fator de motilidade autócrina (AMFR) são internalizadas através de vias endocíticas dependentes de caveolae e/ou lípido Rafts. Os alvos intracelulares destas moléculas estão indicados pelas setas. Os pontos de interrogação foram utilizados para os casos em que o compartimento intracelular alvo não foi completamente caracterizado. GEEC = compartimento endosomal primário enriquecidos com proteínas ancoradas por GPI; MHC I = complexo principal de histocompatibilidade de classe I; P = fosfato (adaptado de Le Roy e Wrana, 2005).

No caso de moléculas internalizadas via caveolae, algumas delas como o vírus SV40, podem ser entregues para caveossomos, e então direcionadas para o retículo endoplasmático (revisto por Rajendran and Simons, 2005). Outras, como a CTxB, são endocitadas por estruturas positivas para caveolina1 e direcionadas para o complexo de Golgi (Nichols, 2002). E outras, como o TGFβR, vão para as organelas da via clássica a partir dos caveolae. Nas vias dependentes de rafts mas independentes de dinamina, proteínas como as ancoradas por GPI, podem ser entregues para os GEECs (compartimento endosomal primário enriquecidos com proteínas ancoradas por GPI) que são compartimentos endossomais formados a partir da endocitose por pinocitose,

independente da atividade de dinamina (Sabharanjak et al., 2002). Uma vez nos GEECs as proteínas podem então ser direcionadas para os endosomas de reciclagem e conseqüentemente para a membrana plasmática. Esta via acumula também marcadores da fase fluida como o Dextran e o receptor de folato (revisto por Rajendran and Simons, 2005).

Na fagocitose, o conteúdo da maior parte dos fagossomos se funde com endossomos e/ou lisossomos. E na macropinocitose, o conteúdo dos macropinosomos são entregues para lisossomos ou são reciclados (revisto por Mellman, 1996).

Todos estes exemplos ilustram a complexidade das vias endocíticas, que ainda estão longe de serem completamente entendidas. Mas tendo em vista a relevância fisiológica e patológica da endocitose, grandes esforços estão sendo aplicados para o melhor entendimento deste processo. A endocitose reflete o comportamento celular frente ao meio externo, e a compreensão deste processo implica em uma melhor compreensão da comunicação celular.

6.10 INTERNALIZAÇÃO E TRÁFEGO DE PrP^C E PrP^{Sc}

A internalização de PrP^C pode ser induzida por cobre sugerindo que a endocitose de PrP^C seja fisiologicamente importante para a homeostase deste íon (Pauly and Harris, 1998). De fato, uma forma mutante de PrP^C, incapaz de sofrer endocitose mediada por cobre, está associada com um tipo de doença priônica familiar (Perera and Hooper, 2001). Trabalhos mostrando que alterações ou bloqueio no tráfego de PrP^C atrasam ou previnem o início da doença fortemente apontam a endocitose como um mecanismo fundamental tanto para homeostasia, quanto para propagação da patologia (Gilch et al., 2001; Marella et al., 2002; Morris et al., 2006; Filesi et al., 2007; Jen et al., 2010).

Foi demonstrado que em células neuronais, PrP^C deixa os lípide *Rafts*, move-se até os domínios não rafts onde é internalizada por vesículas cobertas por clatrina (Sunyach et al., 2003) e direcionada para endossomos primários (Magalhaes et al., 2002). Este e vários outros estudos fortemente indicam a via clássica como uma das principais vias de internalização de PrP^C. Sunyach e Taylor, em trabalhos independentes, mostraram que o domínio polibásico na

região N-terminal de PrP^C é fundamental para sua endocitose mediada por clatrina (Sunyach et al., 2003; Taylor et al., 2005). Interessantemente, foi visto que a deleção de aminoácidos desta região N-terminal leva à perda do efeito neuroprotetor mediado por PrP^C, sugerindo que a endocitose da proteína prion celular seja importante para sua atividade neuroprotetora (Drisaldi et al., 2004).

Tendo em vista a falta de domínios transmembrana que possam interagir com proteínas adaptadoras de clatrina, a maior parte das proteínas ancoradas por GPI seguem vias de internalização próprias, que são dependentes de lípide *Rafts* (Lakhan et al., 2009). Dada a localização de PrP^C em lípide *Rafts*, estas vias também têm sido propostas mediar a endocitose de PrP^C, porém estes dados ainda são muito controversos. Foi demonstrado que PrP^C é encontrado em domínios do tipo caveolae em células N2a, embora a expressão de caveolina nestas células seja controversa (Harmey et al., 1995). Em células CHO (do inglês *Chinese hamster ovary cells*) que expressam caveolina, também foi demonstrado que PrP^C é internalizado através de uma via endocítica dependente de caveolae, e se colocaliza com marcadores de endosomas tardios e lisosomas (Peters et al., 2003). Apesar destes dados sugerirem os caveolae como uma via constitutiva para a endocitose de PrP^C, eles são questionáveis. Já foi demonstrado que proteínas ancoradas por GPI, que não são constitutivamente encontradas em caveolae, podem ser deslocadas para estes domínios na presença de fixadores (Mayor and Riezman, 2004). Além disso, a maior parte dos estudos mostrando que PrP^C é internalizado via caveolae foram realizados em células N2a, onde alguns pesquisadores argumentam não conseguirem detectar a presença destas estruturas (Shyng et al., 1994; Marella et al., 2002). Kang e colaboradores mostraram que a internalização de PrP^C nestas células está associada com vias independentes de clatrina mas dependentes de Arf6 (Kang et al., 2009). Neste trabalho os autores mostraram que drogas que rompem os lípide *Rafts* bloqueiam a endocitose de PrP^C, mais uma vez apontando estas vias como parte do mecanismo de internalização de PrP^C em células N2a. Portanto, novos estudos deverão ser desenvolvidos para esclarecer melhor o envolvimento das vias dependentes de lípide *Rafts* na endocitose de PrP^C, e avaliar sua relevância fisiológica sobretudo em células gliais, que expressam estes domínios.

Outra importante descoberta que reforça a participação da via clássica na endocitose de PrP^C, é o envolvimento do receptor LRP1 na sua internalização. LRP1 participa da endocitose de PrP^C mediada por íons cobre em células neuronais e se liga à esta proteína em compartimentos biosintéticos mediando seu tráfego até a superfície neuronal (Taylor and Hooper, 2007b; Parkyn et al., 2008). Dessa forma, apesar de ser uma proteína ancorada por GPI, PrP^C possui uma 'ponte' que o liga à maquinaria endocítica via clatrina.

Uma vez endocitado, PrP^C segue a rota da via clássica, sendo encontrado em endossomas primários, de reciclagem, endossomas tardios e lisosoma. PrP^C também pode ser direcionado para os corpos multivesiculares onde é secretado como exossomas (Fevrier et al., 2004; Fevrier et al., 2005; Faure et al., 2006).

Em relação à PrP^{Sc}, estudos em células de neuroblastoma infectados com scrapie mostraram que esta proteína é encontrada na superfície celular ou em endossomas, podendo ser sequestrada por lisosomas (Caughey et al., 1991; Caughey and Raymond, 1991; McKinley et al., 1991; Borchelt et al., 1992). Outros estudos mostraram que PrP^{Sc} é localizada em estruturas do tipo caveolae, em endossomas tardios e lisosomas, no retículo endoplasmático e no núcleo (Caughey et al., 1991; Harris, 1999; revisto por Pimpinelli et al., 2005).

Magalhães e colaboradores, utilizando PrP^{Sc} marcado com corante fluorescente, mostraram que os agregados infecciosos foram internalizados por células SN56 e neurônios em cultura primária (Magalhaes et al., 2005). Estes agregados internalizados foram direcionados para endossomas tardios e lisosomas, sendo transportados ao longo dos neuritos. A ausência de PrP^{Sc} em endossomas primários associada à alta co-localização com marcadores de endocitose de fase fluida, sugeriram que a internalização desta proteína infecciosa ocorra por um mecanismo inespecífico como a macropinocitose (Magalhaes et al., 2005).

Pimpinelli e colaboradores também mostraram que PrP^{Sc} segue uma rota endocítica diferente de PrP^C (Pimpinelli et al., 2005). Neste trabalho os autores mostraram que em células neuronais GT1-7 PrP^{Sc} é encontrado em vesículas positivas para Flotilina 1, e não passa por endossomas primários. Algumas destas vesículas também foram positivas para o marcador de endossomas tardios/lisosomas LAMP-1, sugerindo que estes compartimentos estejam diretamente envolvidos com o tráfego de PrP^{Sc} (Pimpinelli et al., 2005).

Várias especulações têm sido feitas a respeito dos locais envolvidos na conversão de PrP^C a PrP^{Sc}. A caracterização da exata localização intracelular de PrP^{Sc}, PrP^C bem como de seus ligantes, é importante para a identificação de compartimentos intracelulares e moléculas envolvidos na formação de prion.

A endocitose de ST11, sua relação com o tráfego de PrP^C e seu efeito na sinalização serão apresentados neste trabalho.

Neste ítem, só foram descritos os procedimentos que não foram detalhados no capítulo I deste trabalho, nem nos artigos do ítem resultados.

7 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 CONSTRUÇÕES

A His6-STI foi produzida no Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer por Marilene H. Lopes e Vilma R. Martins. O vetor de expressão utilizado foi o pTrc-A His (Invitrogen). A proteína recombinante foi purificada em coluna de Ni-NTA-agarose, coletada em tampão TBS 1X (50 mM de Tris pH 7,5; 150 mM de NaCl) e guardada a -20 °C.

As demais construções usadas no projeto nos foram gentilmente cedidas por outros grupos, e estão listadas na tabela 5.

Tabela 5: Construções utilizadas nos experimentos de tráfego e sinalização

| Construção | Responsável |
|-----------------------|---|
| His6-STI1 | Marilene Lopes e Vilma Martins (Instituto Ludwig) |
| PrP ^C -GFP | Kill Lee (Lee et al, 2001; Journal of Neurochemistry) |
| Rab7Q67L-GFP | Dr. Stephen S. G. Ferguson (J.P. Robarts Research Institute and Department of Physiology, University of Western Ontario) |
| Rab5-GFP | Marc G. Caron (Department of Cell Biology, Duke University and Howard Hughes Medical Institute) |
| Clathrin-GFP | James Keen (Thomas Jefferson University) |
| Flotillin1-GFP | Dr. Benjamin J. Nichols (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK) |
| Caveolin1-GFP | Dr. Benjamin J. Nichols MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK) |
| AP180-C MYC | Dr. Benjamin J. Nichols MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK) |
| Dynamin WT | Marc G. Caron (Department of Cell Biology, Duke University and Howard Hughes Medical Institute) |
| Dynamin K44A | Marc G. Caron (Department of Cell Biology, Duke University and Howard Hughes Medical Institute) |
| PrPc3F4 WT | Roger Morris (MRC Laboratory of Molecular Biology, Wolfson Centro de Doenças Relacionadas a Idade, Guy's Hospital Campus, King's College, London) |
| PrPc3F4 NGAG | Roger Morris (MRC Laboratory of Molecular Biology, Wolfson Centro de Doenças Relacionadas a Idade, Guy's Hospital Campus, King's College, London) |

7.2 DESENVOLVIMENTO DAS LINHAGENS ESTAVELMENTE TRANSFECTADAS

A partir da linhagem *Knock out* para a proteína prion, células CF-10, foram desenvolvidas duas linhagens celulares estavelmente transfectadas: a linhagem PrP3F4 estavelmente transfectada com a proteína prion e a linhagem N-PrP3F4 estavelmente transfectada com um mutante da proteína prion cuja internalização pela via clássica é prejudicada. Os vetores originais nos foram gentilmente cedidos por Roger Morris e trata-se das seguintes construções: a primeira corresponde a sequência da proteína prion de camundongo com a inserção do epitopo 3F4 de Hamster e a segunda corresponde à mesma sequência porém com a inserção de uma mutação na região N-terminal que bloqueia a endocitose de PrP^C pela via clássica (de ²³KKRPKP²⁸ para ²³KQHPSP²⁸). A subclonagem foi feita utilizando-se as enzimas de restrição BamHI e HindIII. A digestão foi feita durante 5 minutos a 37°C utilizando-se as enzimas do kit *Fast Digest* (Fermentas). Após a digestão as construções foram purificadas a partir de um gel de agarose 1% utilizando-se um kit de purificação de DNA da Qiagen. O vetor pcDNA3.1 higromicina resistente também foi digerido e purificado usando as mesmas condições dos insertos. A ligação foi feita a temperatura ambiente *Overnight*. Utilizou-se 7 vezes mais inserto do que vetor durante a ligação. Após a ligação o DNA foi precipitado usando Isopropanol (SIGMA) e ressuspensionado em água. Utilizou-se 5µl da ressuspensão para transformar bactérias eletrocompetentes DH5α. As bactérias transformadas foram então plaqueadas em placas contendo ampicilina. Fez-se mini-prep de várias colônias e em seguida análise de restrição utilizando-se as mesmas enzimas usadas durante a subclonagem: BamHI e HindIII. Todas as colônias analisadas liberaram um fragmento de 786 pb correspondentes à ORF das construções. As construções foram sequenciadas.

Antes da transfecção das células com os novos plasmídeos, determinou-se a dose letal de higromicina nestas células para ser usada como referência durante o processo seleção. Células CF-10 foram plaqueadas em placas de

35mm e tratadas com diferentes doses de Higromicina B (Invitrogen – solução estoque 50mg/ml): de 50 a 600µg/ml. Células não tratadas foram usadas como controle. O tratamento foi realizado por duas semanas e determinou-se 400µg/ml como a dose ideal para seleção das células estavelmente transfectadas. Células CF-10 foram transfectadas com 2µg por placa de cada uma das novas construções utilizando-se Effectene. Quarenta e oito horas após a transfecção iniciou-se o tratamento com 400µg/ml de Higromicina B. Após duas semanas de seleção as células sobreviventes formaram pequenas colônias nas placas. Algumas dessas colônias foram transferidas para um tubo de 1.5 ml, homogeneizadas e re-plaqueadas em placas de 100mm. As células sobreviventes foram submetidas a separação por Citometria de Fluxo de acordo com o protocolo descrito abaixo. Foram realizados duas seleções por Citometria de Fluxo: um logo após as 5 semanas de tratamento com Higromicina e outro após 3 meses de uso destas células para garantir uma boa expressão das construções.

7.3 PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS PARA SELEÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO

Após cerca de 5 semanas de tratamento com Higromicina B as células foram liberadas das garrafas utilizando-se PBS/EDTA e centrifugadas a 1000g por 5 minutos. As células foram ressuspensas em meio completo e deixadas na estufa a 37°C por 30 minutos para recuperação da membrana celular. Tomou-se uma alíquota da suspensão de células para realização da contagem. Após os 30 minutos de incubação as células foram ressuspensas em uma solução estéril de PBS, 0.5% BSA e 0.05% de azido de sódio em um volume necessário para se obter uma concentração de 20-25x10⁶ células/ml. Essa nova suspensão foi incubada com o anticorpo anti-PrP^C M241 (produzido no laboratório da Dra. Vilma Martins) por 1 hora a 4°C. Após a incubação as células foram lavadas duas vezes com PBS estéril e centrifugadas a 1000g por 5 minutos a 4°C. Procedeu-se a incubação com anticorpo secundário marcado com corante fluorescente (Invitrogen) diluído em uma solução estéril de PBS, 0.5% BSA e 0.05% de azido de sódio. A incubação foi feita por 1 hora a 4°C.

As células foram lavadas uma vez com PBS estéril, filtradas e levadas para a análise. A análise foi feita em um laboratório especializado em citometria de fluxo utilizando-se o equipamento FACScalibur da BD (Becton Dickinson). Utilizou-se CF-10 não transfectadas e células marcadas apenas com anticorpo secundário como controles. As células apresentando maior marcação de PrP^C na membrana foram selecionadas e mantidas em cultura com Higromicina B.

7.4 PREPARO DA STI1

Como citado anteriormente a STI1 recombinante produzida no Instituto Ludwig de Pesquisa nos foi fornecida em TBS 1X. Para que esta proteína pudesse ser eficientemente marcada foi necessário trocar este tampão, uma vez que tampões contendo aminas primárias livres interferem na reação de complexação com o corante fluorescente. Esta troca foi feita aplicando-se 1.0 ml da STI1 em uma coluna contendo uma resina de exclusão por tamanho, Bio-Rad BioGel P-30, e eluindo-se com tampão PBS 1X (58 mM de Na₂HPO₄, 17 mM de NaH₂PO₄ e 68 mM de NaCl). Foram coletadas cerca de 15 frações de 500 µl, sendo as duas primeiras descartadas (referentes ao tampão TBS). As demais frações foram mantidas no gelo e a concentração de STI1 presente em cada uma delas foi determinada em duplicata pelo método de Bradford, utilizando uma curva padrão de albumina bovina e 3,0 µl de cada amostra. Juntou-se aquelas frações com maior concentração de STI1 e em seguida marcou-se com o corante fluorescente.

7.5 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS E *WESTERN BLOTTING*

Proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poli-acrilamida 10-12% utilizando-se Tris-Glicina como tampão de corrida (Tris 0.25M, glicina 1.9M, SDS 1%). Também foram utilizados géis de gradiente 4-20% pré-prontos das marcas Invitrogen e Lonza. Para estes géis utilizou-se MOPS como tampão de corrida (MOPS 50mM, Tris 30.3mM, SDS 0.1%, EDTA 1.0mM). Para a maioria dos experimentos utilizou-se tampão de amostra 6X ou 2X com agente redutor para carregar as amostras no gel. Após a eletroforese as proteínas foram transferidas do gel para membranas de nitrocelulose ou PVDF

(ambas da Amersham). Em seguida as membranas foram bloqueadas com leite desnatado diluído em TBS 1% Tween (TBS T) por 1 hora à temperatura ambiente. Para alguns anticorpos específicos, como GAPDH, as membranas foram bloqueadas em 1% albumina bovina (SIGMA) diluído em TBS 1% Tween por 1 hora à temperatura ambiente. Após o bloqueio as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos primários over night a 4°C. No dia seguinte as membranas foram lavadas 3X (10 minutos cada lavagem) com TBS T e incubadas com os respectivos anticorpos secundários por 1 hora a temperatura ambiente. Após a incubação, as membranas foram lavadas novamente 3X (10 minutos cada lavagem) com TBS T, incubadas com ECL (Amersham) por 5 minutos e reveladas no aparelho de detecção de quimioluminescência AlphaInnotech da GE, utilizando-se o software FlourChem Q.

Os anticorpos e as respectivas diluições utilizadas estão listados na Tabela 6.

Tabela 6: Anticorpos utilizados

| Anticorpo | Fabricante | Diluição para Imunofluorescência | Diluição para Western Blotting |
|--------------------------------------|-------------------|---|---------------------------------------|
| camundongo anti-PrP ^C | ILPC | 1:200 | 1:1000 |
| camundongo anti-PrP ^C 3F4 | Covance | 1:100 | 1:1000 |
| camundongo anti-PrP ^C 8H4 | ABCAM | 1:200 | - |
| coelho anti-FLAG | SIGMA | 1:200 | 1:1000 |
| coelho anti-ERK1/2 | Cell Signaling | - | 1:1000 |
| Coelho anti-fosfo ERK1/2 | Cell Signaling | - | 1:1000 |
| cabra anti-LRP1 N-terminal | Santa Cruz | 1:50 | 1:500 |
| Anti-coelho peroxidase | BioRad | - | 1:10 000 |
| Anti-camundongo peroxidase | SIGMA | - | 1:10 000 |
| Anti-coelho AF633 | INVITROGEN | 1:800 | - |
| Anti-camundongo AF488 | INVITROGEN | 1:800 | - |

ILPC = Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer; AF = Alexa Fluor

7.6 ANÁLISE DA ENDOCITOSE DE STI1 NA PRESENÇA DE AP180-C

Células SN56 foram plaqueadas em lamínulas de 40mm próprias para serem montadas na câmara de perfusão. Estas células foram co-transfectadas GFP-PrP^C e AP180-C numa proporção de 1:4 μ g de DNA, respectivamente. Uma vez que AP180-C não possui epitopo fluorescente, em alguns experimentos de endocitose de STI1 as células foram co-transfectadas com AP180-C e GFP para identificação das células transfectadas. Quarenta e oito horas após a transfecção as células foram lavadas com tampão KRH e perfundidas com 1 μ M de STI1 AF568. Adquiriu-se imagens a cada 1 minuto durante 50 minutos. As células foram mantidas a 37°C durante todo o experimento.

7.7 ANÁLISE DA ENDOCITOSE DE STI1 NA PRESENÇA DE METIL- β -CICLODEXTRINA

Células PrP3F4 foram tratadas com diferentes concentrações de metil- β -ciclodextrina, preparada em tampão KRH, por 30 minutos a 37°C. Após o tratamento as células foram incubadas com Transferrina Alexa Fluor 488 (40 μ g/ml , Molecular Probes), Cólera Toxina Alexa Fluor 594 (5 μ g/ml, Molecular Probes) ou STI1 Alexa Fluor 488 (1 μ M , juntamente com Cólera Toxina) por 10 minutos a 37°C em KRH. Como controle utilizou-se células pré-tratadas com KRH por 30 minutos a 37°C e marcadas com os marcadores fluorescentes. As células foram rapidamente analisadas no microscópio confocal.

7.8 ANÁLISE DA INTERAÇÃO DE AP180-C E MARCADORES DE LÍPIDE *RAFTS*

Células SN56 foram transfectadas com os marcadores de lípide *Rafts* flotilina1 e caveolina1-GFP ou co-transfectadas com estes marcadores mais AP180-C na proporção de 1:4 μ g de DNA respectivamente. As células foram diferenciadas por 2 dias e analisadas por microscopia confocal.

7.9 ENSAIO DE ATIVAÇÃO DE MAP KINASE

7.9.1 DINAMINA WT, DINAMINA K44A E AP180-C

Células PrP3F4 foram plaqueadas em placas de 60 mm e transfectadas com 3 μg de Dinamina WT, Dinamina K44A ou AP180-C utilizando-se lipofectamina (Invitrogen). Um dia após a transfecção as células foram lavadas com HBSS (Gibco) e deixadas em meio sem soro por 48 horas. Após este período de carenciação as células foram lavadas com tampão KRH e tratadas com 1 μM de STI1 por 1 minuto. Utilizou-se como controle positivo de ativação de ERK1/2 células tratadas com 20% de soro fetal bovino por 1 minuto. As placas foram colocadas no gelo e lavadas 2X com PBS gelado. As células foram lisadas com tampão de lise (RIPA buffer: NaCl 150mM, NP-40 ou Triton X-100 1%, Deoxycolato de sódio 0,5% , SDS 0,1% , Tris 50mM pH = 8, acrescido de inibidor de proteases 1:100 e inibidores de fosfatases NaF 10 mM e Na_3VO_4 500 μM) por 1 hora sob agitação constante a 4°C. Os lisados foram centrifugados a 14000g por 15 minutos a 4°C e os sobrenadantes transferidos para novos tubos. Dosou-se as proteínas totais pelo método de Bradford e submeteu-se 60 μg a eletroforese e *Western Blotting* para detecção de ERK1/2 ativada e ERK1/2 total. Utilizou-se como controles destes experimentos células CF-10 não expressando PrP^C tratadas com STI1.

7.9.2 RAP

Para avaliação do efeito de RAP na ativação de ERK1/2 induzida pela interação STI1-PrP^C utilizou-se o mesmo protocolo descrito no ítem acima porém com o seguinte pré-tratamento. Após o período sem soro, as células PrP3F4 foram lavadas com tampão KRH e tratadas com 1 μM de RAP (Calbiochem) por 40 minutos a 37°C. As placas foram colocadas no gelo e lavadas 2X com PBS gelado. A partir daqui seguiu-se o protocolo descrito acima.

7.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR LRP1

Células CF-10 e PrP3F4 foram lisadas utilizando-se tampão de lise RIPA buffer (acrescido de inibidor de proteases 1:100) por 1 hora a 4°C. Os lisados foram centrifugados a 15000g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para novos tubos. A eletroforese de proteínas foi realizada em géis de gradiente de 4-12%. Utilizou-se um padrão de proteínas de alto peso molecular (de 121 a 500 kDa, Invitrogen), e a transferência foi realizada por 1 hora no aparato de transferência semi-seco da BioRad. Utilizou-se anti-LRP1 (Santa Cruz) na diluição de 1:500.

7.11 MARCAÇÃO DOS ANTICORPOS PRIMÁRIOS COM ZENON

Em tubos de 1,5 ml adicionou-se 1 µl do anticorpo anti-PrPc 8H4 ou 2 µl de anti-LRP1 ou 2 µl de anti-Flag por placa. Adicionou-se 5 µl do componente A por placa sobre os respectivos anticorpos e incubou-se a temperatura ambiente por 5 minutos. Adicionou-se então 5 µl do componente B por placa e incubou-se por 5 minutos. Adicionou-se 125 µl por placa do tampão KRH, homogeneizou-se e adicionou-se sobre as células. No caso de dupla marcação, após a adição de KRH, misturou-se os dois anticorpos e então incubou-se com as células por 1 hora no gelo.

7.12 QUANTIFICAÇÕES

A quantificação da co-localização entre os marcadores utilizados e a STI1 fluorescente foi feita com o auxílio do programa Metamorph. O limiar de fluorescência foi definido e a quantidade de estruturas fluorescentes, vermelho para STI1 e verde para os demais marcadores, foi automaticamente e independentemente detectada pelo programa. Posteriormente, as imagens dos marcadores em verde e vermelho foram sobrepostas, e a quantidade de pixels onde houve co-localização foi calculada. Nos experimentos de estudo do tráfego de PrP^C na presença de Aβ oligômeros por imunofluorescência, a fluorescência total de PrP^C na membrana foi quantificada utilizando-se

metamorph. Essa fluorescência foi normalizada pela área de cada célula analisada. Nos experimentos de estudo do tráfego de PrP^C na presença de A β oligômeros utilizando-se o kit Zenon, a fluorescência de membrana e interna de cada célula foi determinada. A fluorescência interna foi dividida pelo número de objetos (que correspondem às vesículas internalizadas) e a fluorescência de membrana foi normalizada pela área de cada célula. A fluorescência interna normalizada foi então dividida pela fluorescência externa normalizada.

Para analisarmos os resultados obtidos no microscópio TIRF, os dados de intensidade de fluorescência ao longo do tempo foram exportados para excel. Utilizou-se estes dados correspondentes ao tratamento das células apenas com tampão para determinar a inclinação da reta. A equação determinada para os dados com tampão foi então utilizada para corrigir os dados obtidos com o tratamento com A β . Os novos dados, agora livres da internalização constitutiva ou por bleaching foram utilizados para avaliar as alterações no tráfego de PrP^C na presença de A β oligômeros. Esse tratamento foi feito para cada célula tratada independentemente.

8 OBJETIVOS

A segunda parte deste trabalho de tese teve como objetivo geral:

Estudar alterações no tráfego da proteína prion celular induzidas por seus ligantes e as consequências destas alterações para sinalização mediada por estas proteínas.

Objetivos específicos:

- 1- Estudar alterações no tráfego de PrP^C induzidas por STI1 exógena;
- 2- Investigar a influência da endocitose na sinalização mediada pela interação STI1-PrP^C;
- 3- Investigar as vias endocíticas envolvidas na endocitose de STI1 exógena;
- 4- Investigar o envolvimento de LRP1 como mediador da sinalização induzida pela interação STI1-PrP^C;
- 5- Estudar alterações no tráfego de PrP^C induzidas por oligômeros A β ;

A seguir, os resultados deste capítulo foram apresentados com dois artigos. Antes de cada artigo, eu descrevi a minha participação específica naquela publicação e coloquei os resultados adicionais que não foram publicados.

9 RESULTADOS

9.1 ENDOCYTOSIS OF PRION PROTEIN IS REQUIRED FOR ERK1/2 SIGNALING INDUCED BY STRESS-INDUCIBLE PROTEIN 1

Minha participação específica nesta publicação

Neste artigo nós investigamos a importância do tráfego de PrP^C para sinalização mediada pela interação desta proteína com STI1. Nós também estudamos o tráfego endocítico de STI1. Especificamente, eu fiz os experimentos de internalização de PrP^C induzida por STI1 seguindo a endocitose destas proteínas em tempo real no microscópio confocal (Figura 1, A e B); os experimentos de imunofluorescência e biotilação confirmando a endocitose de PrP^C mediada por STI1 e mostrando que este processo é dependente do motivo N-terminal de PrP^C (Figura 2, C, D, E); estudo da endocitose de STI1 em células SN56, CF-10 e PrP3F4 utilizando STI1 recombinante marcada fluorescentemente (Figura 5); experimentos para identificação da via endocítica utilizada para internalização de STI1, utilizando marcadores da via clássica (clatrina-GFP) e da via dependente de lípide *Rafts* (Flotilina e Caveolina-GFP) em células SN56 e PrP3F4 (Figura 6 e 7); estudo na localização intracelular de STI1 utilizando marcadores de organelas da via endocítica (Figura 8); experimentos de internalização de PrP^C e STI1 na presença do mutante de dinamina, K44A, em tempo real no microscópio confocal (Figura 9).

Os experimentos de sinalização de ERK1/2 foram realizados em São Paulo pelo grupo da Dra. Vilma Martins. Entretanto, eu repeti estes experimentos na presença de bloqueadores da endocitose e estes dados serão apresentados a seguir como resultados adicionais, dando continuidade ao trabalho iniciado neste artigo.

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

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

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

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

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

Introduction

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

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

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

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

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

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

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

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

DOI:10.1523/JNEUROSCI.1701-08.2008

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

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

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

Materials and Methods

Animals

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

Cell culture

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

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

Plasmids

The GFP-PrP^C vector, GFP-Rab5, dynamin I, the dominant-negative dynamin I K44A, and GFP-Rab7 mutant plasmids have been described previously (Lee et al., 2001; Santos et al., 2001; Barbosa et al., 2002; Magalhães et al., 2002, 2005; Ribeiro et al., 2005). Flotillin1–green fluorescent protein (GFP) and caveolin-1–GFP were kindly provided by Dr. B. J. Nichols (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK). The 3F4-tagged plasmids, PrP3F4, and the N-PrP3F4 (N-terminally mutated, altered from ²³KKRPKD²⁸ to ²³KQHPSD²⁸) (Sunyach et al., 2003) were kindly provided by R. Morris (Wolfson Centre for Age Related Diseases, Guy's Hospital Campus, King's College, London, UK). It is important to note that in the N-PrP3F4 mutant, a serine is present at the

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

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

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

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

Alexa Fluor 594, 568, or 488 protein labeling

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

Protein detection

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

Fluorescence imaging

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

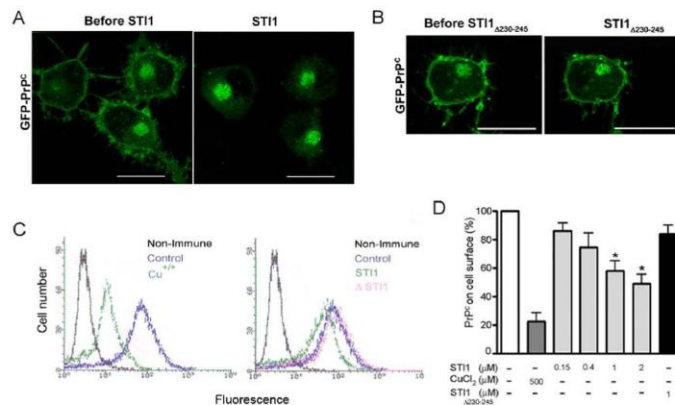


Figure 1. *A, B*, ST11 induces PrP^C internalization. SN56 cells expressing GFP-PrP^C were treated with 1 μM ST11 (*A*) or ST11_{Δ230–245} (*B*) for 45 min at 37°C. The left and right panels show the green fluorescence from GFP-PrP^C before and after the incubation with ST11 or ST11_{Δ230–245}, respectively. *A* and *B* represent Z projections acquired before and after the perfusion. Images are representative of nine and five independent experiments with multiple culture plates in which 40 and 12 cells were analyzed. Scale bars, 20 μm. *C*, Flow cytometry assay from SN56 cells treated with 500 μM Cu²⁺, 1 μM wild-type ST11, or 1 μM ST11_{Δ230–245} for 40 min. Cells were incubated with nonimmune or anti-PrP^C mouse serum followed by R-phycoerythrin-labeled anti-mouse IgG. *D*, The fluorescence for cell-surface PrP^C in untreated cells as described in *C* was set up to 100%, and the levels of PrP^C cell-surface expression after treatment with the indicated concentrations of Cu²⁺, ST11, or ST11_{Δ230–245} were normalized to untreated cells. The results shown are the mean values of six independent experiments. Error bars represent SEM. ANOVA followed by Tukey's HSD test was used for comparisons. **p* < 0.05.

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

Internalization of ST11 and PrP^C

SN56 cells were incubated with 1 μM fluorescent ST11 for different periods at 37°C in 5% CO₂, washed three times with serum-free medium, and visualized by confocal microscopy. For competition assays, cells were incubated with 10 μM ST11 or albumin in DMEM for 1 h at 4°C, followed by 1 μM fluorescent ST11. The coverslips were washed with serum-free medium and visualized by confocal microscopy.

Cells expressing GFP-PrP^C or coexpressing GFP-PrP^C and dynamin I K44A were maintained in a FCS2 chamber at 37°C and perfused with KRH to obtain the first image. After that, cells were perfused with 1 μM fluorescent ST11 or ST11_{Δ230–245}, and additional optical sections were acquired each minute for 50 min.

For cell-surface labeling, CF-10 PrP3F4 or N-PrP3F4 cells were treated with ST11 or ST11_{Δ230–245}, as described in the figure legends, for 20 min, washed in PBS three times, and fixed in 3.5% paraformaldehyde without any detergent for 20 min. Cells were incubated simultaneously with monoclonal 3F4 antibodies (1:100; Dako), and after washing with PBS, cells were incubated goat anti-mouse AF488 secondary antibodies (Invitrogen), mounted on coverslips with Hydromount (National Diagnostics), and imaged with the SP5 confocal microscope. In these experiments, nuclei were stained with Syto60Red (Invitrogen).

Biotinylation of cell-surface proteins was performed as described previously (Ribeiro et al., 2005; Lee et al., 2007). Briefly, cells were incubated with ST11 or 500 μM Cu²⁺ for 5 or 10 min, respectively, transferred to ice, washed, and incubated on ice in PBS/CM (PBS supplemented with 1.0 mM MgCl₂ and 0.1 mM CaCl₂). Cell-surface proteins were biotinylated with 1 mg/ml sulfo-NHS-SS-biotin (Pierce) for 1 h on ice. To

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

Labeling of organelles

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

Quantification of fluorescence

The effect of dynamin K44A expression on ST11 internalization was evaluated using the ImageJ software or MetaMorph. The total fluorescence inside cells after a 40 min incubation with ST11-AF568 was quantified. Images were thresholded, and the total fluorescence was detected automatically and independently by the software. The results were expressed as the mean of total fluorescence per cell. For colocalization indices, cells were analyzed using MetaMorph, by independently counting fluorescent objects (vesicles) and analyzing the percentage of colocalization independently by the software.

Conditioned medium from astrocytes

Primary mouse astrocyte cultures were obtained as described previously (Lima et al., 2007). After reaching confluence, cells were maintained in DMEM without serum for 48 h. The conditioned medium (CM) was collected, centrifuged for 10 min to remove cellular debris, and filtered in 0.2 μm membranes. CM (total volume of 30 ml) was concentrated to a final volume of 150 μl (200×) in Minicon Static concentrator B12 (Millipore). A total of 30 μl of the 200× concentrated CM was used to measure ST11 concentration. Alternatively, 50 μl of the 200× concentrated CM was immunodepleted of ST11 using a rabbit anti-ST11 antibody (IgG, 4 μg/ml) overnight at 4°C (Lima et al., 2007), mixed with protein A-Sepharose for 2 h at 4°C, and centrifuged. The pellets (washed three times) and supernatants were analyzed for the presence of ST11.

Kinase assays

P44/42 extracellular signal-regulated kinase phosphorylation. Phosphorylation assays were performed using the PhosphoPlus p44–42 extracellular signal-regulated kinase (ERK) (Thr202/Tyr204) antibody kit (Cell Signaling Technology) according to the manufacturer's instructions. Briefly, CF-10 cell lines (5 × 10⁴ cells, serum starved for 48 h with medium change every 24 h) and hippocampal primary culture (10⁶ cells) were stimulated or not with recombinant ST11 (0.5 μM) or 50 μl of the 200× concentrated CM to a final volume of 1 ml (5 nM ST11), rinsed once with ice-cold PBS, and lysed in Laemmli buffer. Cell extracts were subject to SDS-PAGE, followed by immunoblotting with anti-phospho-ERK1/2 and anti-ERK1/2 antibodies (Cell Signaling Technology). The bands obtained after x-ray film exposure to the membranes were analyzed by densitometric scanning and quantified using the Scion Image software.

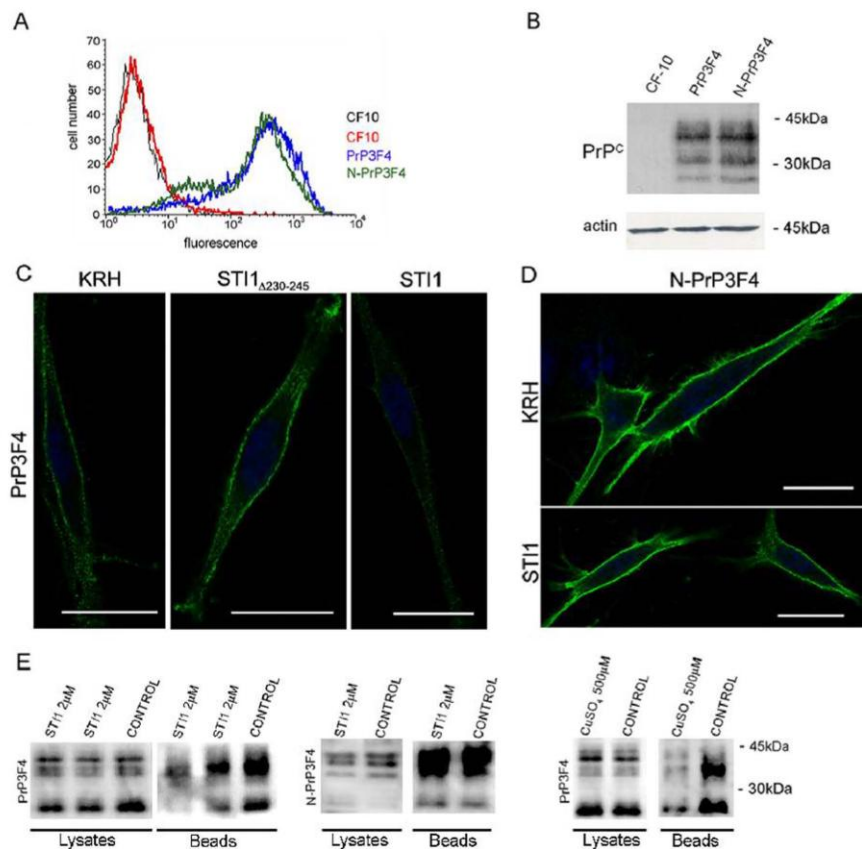


Figure 2. Internalization of PrP^C is dependent of the N-terminal basic motif. The PrP^C-null cell line CF-10 was transfected with an expression vector encoding wild-type PrP^C (PrP3F4) or a mutated PrP^C (N-PrP3F4) protein, the internalization of which is impaired, and stably transfected cells were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

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

Flow cytometry assay

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

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

Statistical analysis

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

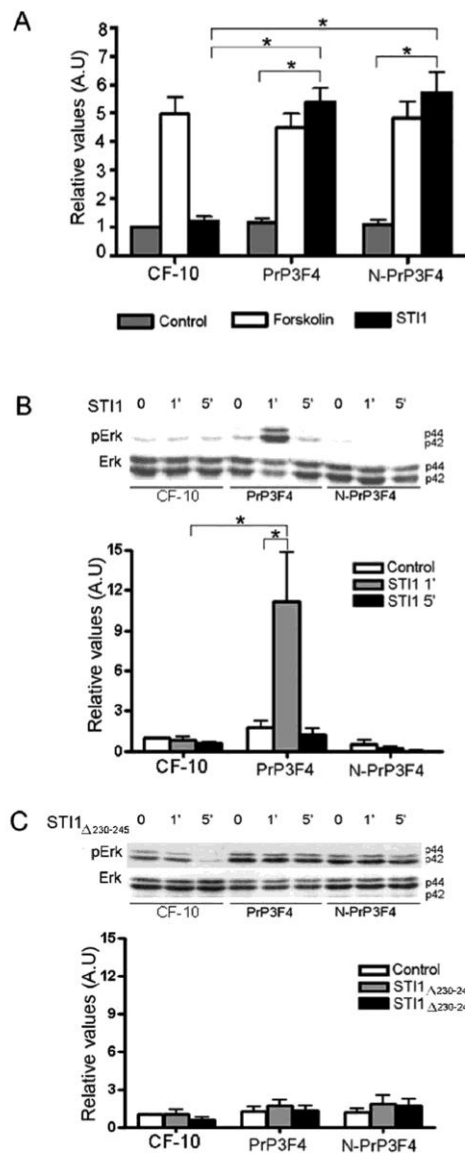


Figure 3. PrP^C endocytic trafficking is necessary for STI-PrP^C-dependent ERK1/2 but not for PKA activation. **A**, Cells were treated with forskolin or 1 μ M of STI1, and the PKA activity was evaluated. **B**, Cells were treated with 0.5 μ M STI1 for 1 or 5 min, and ERK1/2 activity (pErk) was analyzed. **C**, Cells were treated with 0.5 μ M STI1 $_{\Delta 230-245}$ for 1 or 5 min, and ERK1/2 activity was analyzed. The basal activity of CF-10 cells without treatment was normalized to 1, and the other values are relative to it. The results show the mean values of five (**A**) or four (**B**, **C**) independent datasets. Error bars represent SEM. ANOVA followed by Tukey's HSD test was used for comparisons. * $p < 0.05$. A.U., Arbitrary units.

Results

STI1 induces PrP^C internalization

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

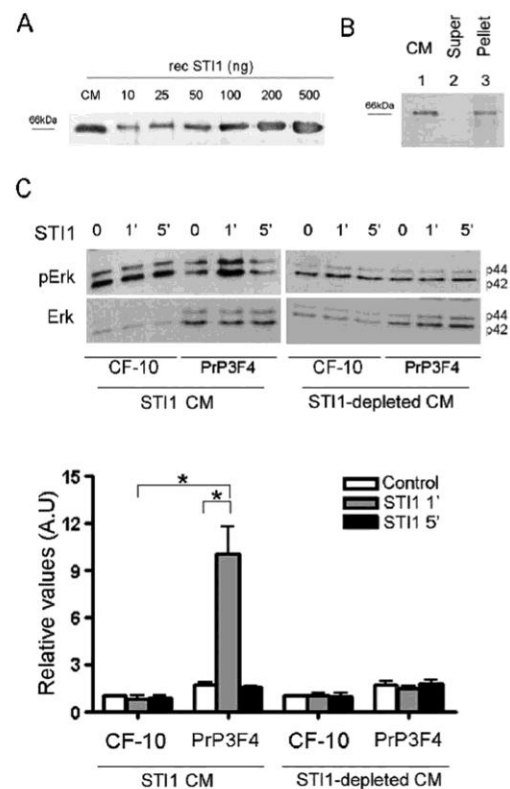


Figure 4. STI1 secreted by astrocytes induces ERK1/2 activation. **A**, Increasing amounts of recombinant STI1 (from 10 to 500 ng) and 30 μ l of 200 \times concentrated CM was loaded onto SDS-PAGE. Immunoblotting was developed with anti-STI1 antibodies. **B**, STI1 was immunoprecipitated from 150 μ l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

cally. This fluorescent protein has been previously shown to respond to Cu²⁺ and to present identical localization as endogenous PrP^C. For these experiments, we used SN56 cells, in which the cellular trafficking of fluorescent PrP^C and PrP^{res} was studied and which have also been shown to be infected by PrP^{res} (Lee et al., 2001; Magalhães et al., 2005). Maximum projection images obtained from confocal stacks (data not shown) demonstrated that, as described previously (Lee et al., 2001), GFP-PrP^C is present at the cell surface and in the perinuclear region that represents the Golgi apparatus and endosomes (Magalhães et al., 2002). In control experiments, we reproduced the observation that Cu²⁺ evokes internalization of GFP-PrP^C (data not shown) (Lee et al., 2001; Magalhães et al., 2002). We then evaluated GFP-PrP^C distribution in SN56 cells after treatment with STI1 or a deletion mutant unable to bind PrP^C, STI1 $_{\Delta 230-245}$ (Lopes et al.,

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

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

Endocytic trafficking of PrP^C is required for STI1-PrP^C-dependent ERK1/2 but not for activation of PKA

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

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

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

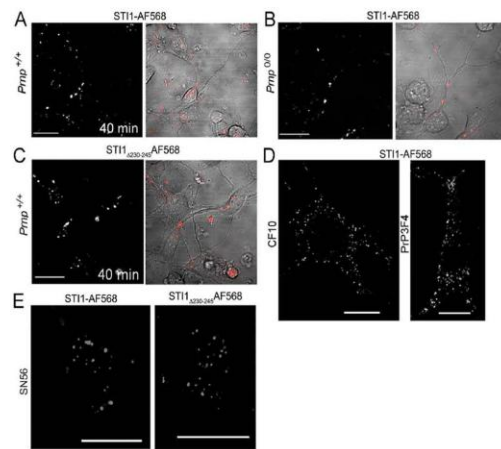


Figure 5. STI1 is internalized independently of PrP^C. *A–E*, Wild-type *Pmp*^{+/+} (*A*, *C*); PrP^C-null, *Pmp*^{0/0} primary hippocampal neurons (*B*), CF-10 and CF-10 PrP3F4 cells (*D*); or SN56 cells (*E*) were incubated with 1 μ M STI1-AF568 or STI1 $_{\Delta 230-245}$ -AF568, as indicated, for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

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

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

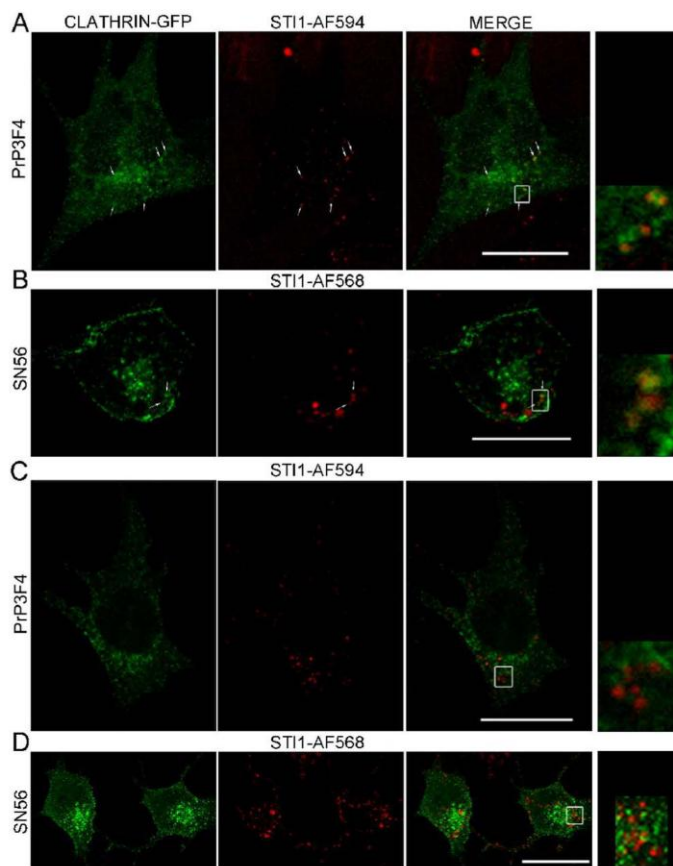


Figure 6. A fraction of internalized STII colocalizes with clathrin. PrP3F4 or SN56 cells, as indicated, were transfected with clathrin-GFP and incubated with 1 μ M STII-AF594 or STII-AF568 for various periods of time. **A, B,** Representative images for the first minutes after incubation with STII.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

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

STII binds to cells in a specific manner and is internalized

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

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

Intracellular localization of internalized STII

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

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

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

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

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

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

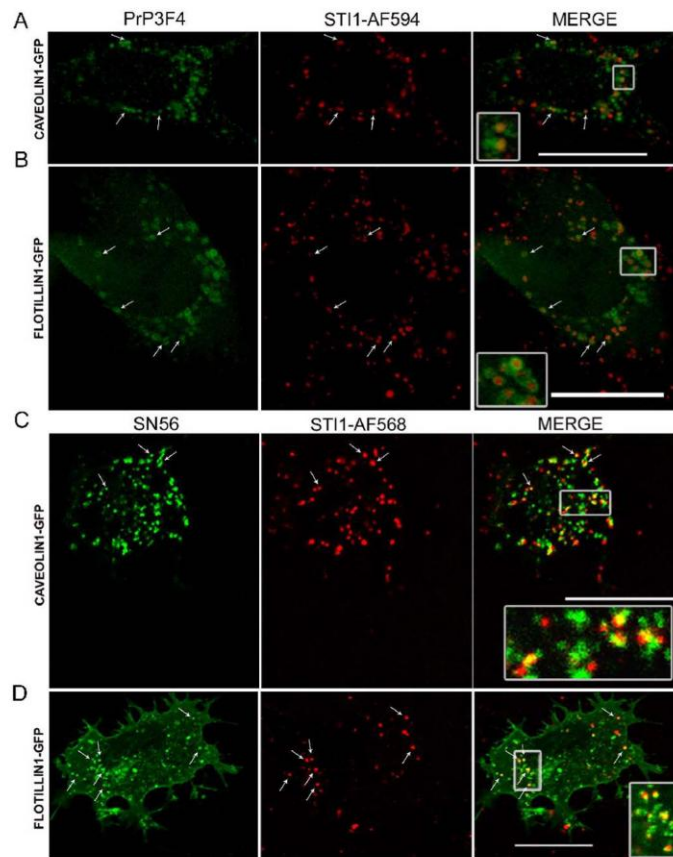


Figure 7. STI1 is also found in raft-derived vesicles. *A, B*, PrP3F4 cells were transfected with caveolin-1-GFP (*A*) or flotillin-1-GFP (*B*), and living cells were perfused with STI1-AF594 for 30 min at 37°C. These images are representative examples of colocalization patterns in the first 15 min of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

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

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

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

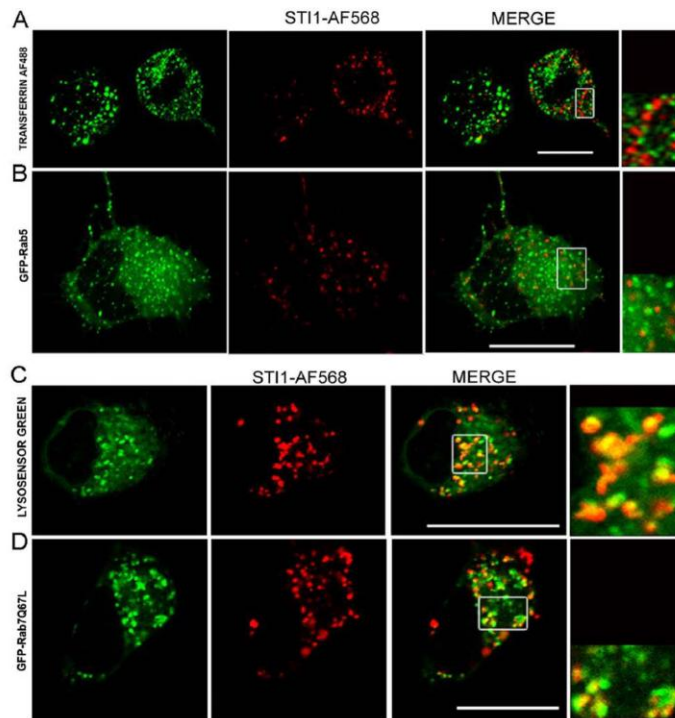


Figure 8. Subcellular localization of STI1. **A**, SN56 cells were double labeled with STI1–AF568 and transferrin–AF488 for 40 min at 37°C. **B**, Cells expressing GFP–Rab5 were incubated with STI1–AF568 for 40 min at 37°C. Right panels present a magnified view of the region indicated in the merged images.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

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

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

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

Discussion

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

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

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

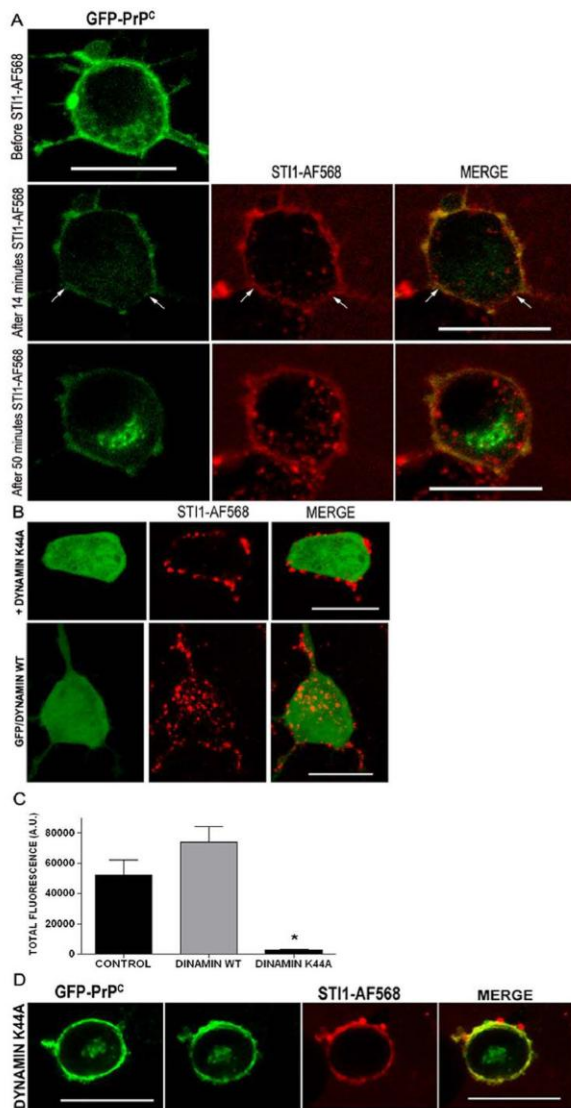


Figure 9. STI1 interacts with PrP^C predominantly at the cell surface. *A*, SN56 cells expressing GFP-PrP^C (green) were treated with 1 μ M STI1-AF568 (red) for distinct periods of time at 37°C. Images are representative five independent experiments with multiple dishes in which 40 and 12 cells were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

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

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

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

Our data revealed that extracellular STT1 is also internalized by endocytosis. The site that STT1 binds for its entry in cells has not been identified, but the experiments with the mutant STT1_{Δ230–245} and with *Prnp*^{0/0} neurons conclusively discarded the need of PrP^C for STT1 entry in cells. Colocalization experiments implicate lipid raft-derived organelles in the intracellular trafficking of STT1. Although we found that a small fraction of fluorescent STT1 colocalizes with clathrin-coated vesicles, STT1 was not found in classical early endosomes in living cells. In contrast, a significant portion of the protein was found in flotillin-derived vesicles. Flotillin-1-positive vesicles were proposed to differ from caveolae-derived vesicles (Glebov et al., 2006), but both likely originate from lipid raft-derived regions of the membrane (Harder and Simons, 1997). In agreement with these results, fluorescent STT1 also accumulates in acidic organelles that recruit GFP-Rab7, a marker of late endosomes/lysosomes. In this aspect, internalized STT1 presents a remarkable similarity to fluorescent PrP^{res}, which was recently shown to be sequestered in SN56 cells in Rab7-positive acidic organelles (Magalhães et al., 2005).

Intracellular trafficking of GPI-anchored proteins is complex, and these proteins can follow distinct pathways depending on the cell type (Fivaz et al., 2002). Despite reports suggesting internalization of PrP^C via caveolae (Peters et al., 2003), overwhelming evidence favors a model of endocytosis of PrP^C via clathrin-coated vesicles (Shyng et al., 1994; Sunyach et al., 2003; Taylor et al., 2005). Recently, an essential role in the endocytosis of PrP^C has been ascribed to the low-density lipoprotein receptor-like protein (LRP1) (Morris et al., 2006; Taylor and Hooper, 2006; Parkyn et al., 2008), by allowing PrP^C to enter clathrin-coated vesicles. In addition, LRP1 appears to have a role in the surface trafficking of PrP^C (Parkyn et al., 2008). Dynamin I dominant-negative mutant K44A blocks both clathrin-mediated endocytosis and caveolae-mediated endocytosis (Henley et al., 1998; Nichols and Lippincott-Schwartz, 2001; Conner and Schmid, 2003). We found that dynamin I K44A suppressed the endocytosis of both STT1 and PrP^C. Furthermore, the use of dynamin I K44A revealed that interaction of STT1 and PrP^C at the cell surface has a transient nature, but inhibition of endocytosis allowed the identification of an intermediate step in which the two proteins appear to remain together.

A likely scenario to explain these results is that STT1 binds to PrP^C at the cell surface and this triggers the interaction of the complex with unknown plasma membrane components that may mediate signaling by PKA. Simultaneously, PrP^C endocytosis is triggered, and that may lead to a new set of interactions, perhaps involving LRP1 or other proteins that can help PrP^C to piggyback to clathrin-coated vesicles, which may be important to cause ERK1/2 activation. Indeed, LRP1 has been shown to link cellular activation to ERK signaling (Orr et al., 2003) and is therefore a likely candidate to participate in this process for STT1-PrP^C. Thereafter, STT1 and PrP^C appear to follow parallel pathways downstream into the cells.

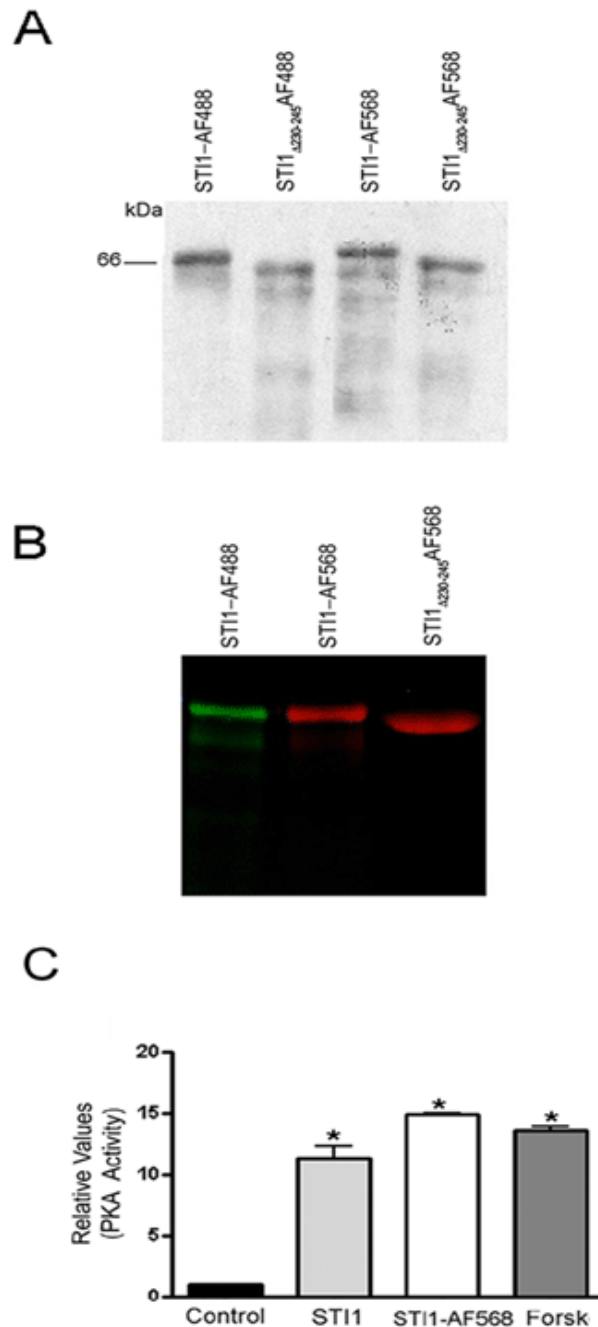
The physiological roles for STT1-PrP^C signaling *in vivo* remain to be established (see (Linden et al., 2008)). However, it is of remarkable interest that expression of truncated forms of PrP^C in a PrP-null background has been consistently shown to cause neurodegeneration in transgenic mice (Shmerling et al., 1998; Baumann et al., 2007; Li et al., 2007). This intriguing phenotype resembles some of the alterations in prion disorders and can be mitigated by expression of wild-type PrP^C in transgenic mice (Shmerling et al., 1998; Baumann et al., 2007; Li et al., 2007). The binding site of STT1 onto PrP^C (amino acids 113–128) (Zanata et al., 2002) is lacking in all truncated proteins that produce this

phenotype (Shmerling et al., 1998; Baumann et al., 2007), including a recently described mouse line with a deletion in amino acids 105–125 of PrP^C (Li et al., 2007). Future experiments should unravel whether the mechanisms described here for STT1-mediated PrP^C signaling contribute to such phenotypes.

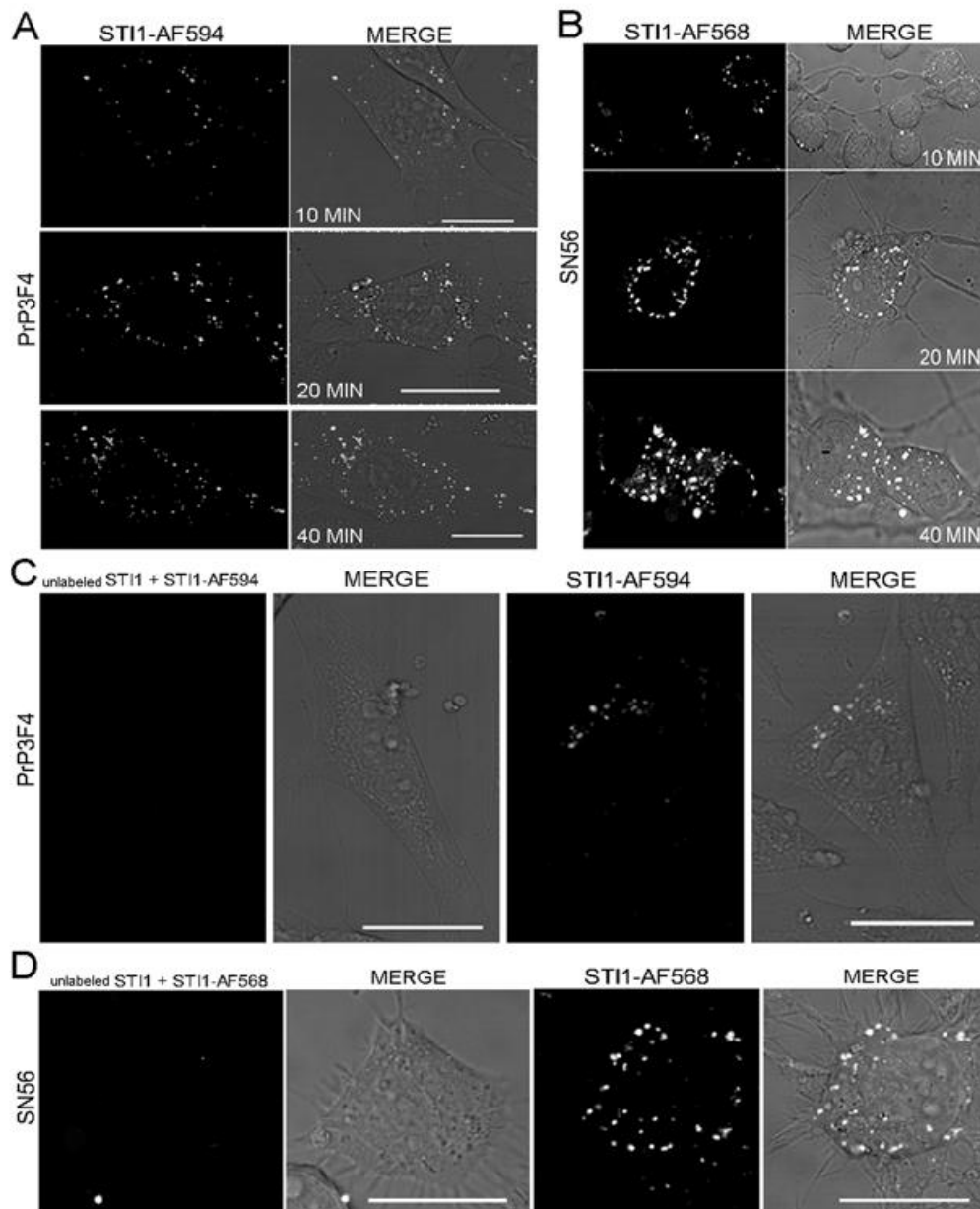
References

- Americo TA, Chiarini LB, Linden R (2007) Signaling induced by hop/STT-1 depends on endocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* 358:620–625.
- Barbosa Jr J, Ferreira LT, Martins-Silva C, Santos MS, Torres GE, Caron MG, Gomez MV, Ferguson SS, Prado MA, Prado VF (2002) Trafficking of the vesicular acetylcholine transporter in SN56 cells: a dynamin-sensitive step and interaction with the AP-2 adaptor complex. *J Neurochem* 82:1221–1228.
- Baron GS, Magalhães AC, Prado MAM, Caughey B (2006) Mouse-adapted scrapie infection of SN56 cells: greater efficiency with microsome-associated versus purified PrP-res. *J Virol* 80:2106–2117.
- Baumann F, Tolnay M, Brabeck C, Pahnke J, Kloz U, Niemann HH, Heikenwalder M, Rulicke T, Burkle A, Aguzzi A (2007) Lethal recessive myelin toxicity of prion protein lacking its central domain. *EMBO J* 26:538–547.
- Bucci C, Thomsen P, Nicoziani P, McCarthy J, van Deurs B (2000) Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell* 11:467–480.
- Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356:577–582.
- Caughey B, Baron GS (2006) Prions and their partners in crime. *Nature* 443:803–810.
- Caughey B, Raymond GJ (1991) The Scrapie-associated form of Prp is made from a cell-surface precursor that is both protease-sensitive and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem* 266:18217–18223.
- Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R (2002) Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J* 21:3317–3326.
- Coitinho AS, Lopes MH, Hajj GN, Rossato JJ, Freitas AR, Castro CC, Cammarota M, Brentani RR, Izquierdo I, Martins VR (2007) Short-term memory formation and long-term memory consolidation are enhanced by cellular prion association to stress-inducible protein 1. *Neurobiol Dis* 26:282–290.
- Conner SD, Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422:37–44.
- Daaka Y, Luttrell LM, Ahn S, La Rocca GJ, Ferguson SS, Caron MG, Lefkowitz RJ (1998) Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273:685–688.
- Drake MT, Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2006) Trafficking of G protein-coupled receptors. *Circ Res* 99:570–582.
- Erllich RB, Kahn SA, Lima FR, Muras AG, Martins RA, Linden R, Chiarini LB, Martins VR, Moura Neto V (2007) STT1 promotes glioma proliferation through MAPK and PI3K pathways. *Glia* 55:1690–1698.
- Eustace BK, Jay DG (2004) Extracellular roles for the molecular chaperone, hsp90. *Cell Cycle* 3:1098–1100.
- Evdonin AL, Martynova MG, Bystrova OA, Guzhova IV, Margulis BA, Medvedeva ND (2006) The release of Hsp70 from A431 carcinoma cells is mediated by secretory-like granules. *Eur J Cell Biol* 85:443–455.
- Fivaz M, Vilbois F, Thurnheer S, Pasquali C, Abrami L, Bickel PE, Parton RG, van der Goot FG (2002) Differential sorting and fate of endocytosed GPI-anchored proteins. *EMBO J* 21:3989–4000.
- Gaidarov I, Santini F, Warren RA, Keen JH (1999) Spatial control of coated-pit dynamics in living cells. *Nat Cell Biol* 1:1–7.
- Glebov OO, Bright NA, Nichols BJ (2006) Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 8:46–54.
- Gonzalez-Gaitan M (2003) Signal dispersal and transduction through the endocytic pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:213–224.
- Guzhova I, Kislyakova K, Moskaliyova O, Fridlanskaya I, Tytell M, Cheetham M, Margulis B (2001) In vitro studies show that Hsp70 can be released by glia and that exogenous Hsp70 can enhance neuronal stress tolerance. *Brain Res* 914:66–73.
- Hammond DN, Lee HJ, Tonsgard JH, Wainer BH (1990) Development and characterization of clonal cell lines derived from septal cholinergic neurons. *Brain Res* 512:190–200.

- Harder T, Simons K (1997) Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol* 9:534–542.
- Henley JR, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA (1998) Dynamically mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol* 141:85–99.
- Hernandez MP, Sullivan WP, Toft DO (2002) The assembly and intermolecular properties of the hsp70-Hop-hsp90 molecular chaperone complex. *J Biol Chem* 277:38294–38304.
- Honore B, Leffers H, Madsen P, Rasmussen HH, Vandekerckhove J, Celis JE (1992) Molecular cloning and expression of a transformation-sensitive human protein containing the TPR motif and sharing identity to the stress-inducible yeast protein STT1. *J Biol Chem* 267:8485–8491.
- Houenou LJ, Li L, Lei M, Kent CR, Tytell M (1996) Exogenous heat shock cognate protein Hsc70 prevents axotomy-induced death of spinal sensory neurons. *Cell Stress Chaperones* 1:161–166.
- Keller M, Ruegg A, Werner S, Beer HD (2008) Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* 132:818–831.
- Lassle M, Blatch GL, Kundra V, Takatori T, Zetter BR (1997) Stress-inducible, murine protein mSTT1. Characterization of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different kinases. *J Biol Chem* 272:1876–1884.
- Lee KS, Magalhães AC, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Prado MAM (2001) Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. *J Neurochem* 79:79–87.
- Lee KS, Raymond LD, Schoen B, Raymond GJ, Kett L, Moore RA, Johnson LM, Taubner L, Speare JO, Onwubiko HA, Baron GS, Caughey WS, Caughey B (2007) Hemin interactions and alterations of the subcellular localization of prion protein. *J Biol Chem* 282:36525–36533.
- Lefkowitz RJ, Whalen EJ (2004) beta-arrestins: traffic cops of cell signaling. *Curr Opin Cell Biol* 16:162–168.
- Li A, Christensen HM, Stewart LR, Roth KA, Chiesa R, Harris DA (2007) Neonatal lethality in transgenic mice expressing prion protein with a deletion of residues 105–125. *EMBO J* 26:548–558.
- Lima FR, Arantes CP, Muras AG, Nomizo R, Brentani RR, Martins VR (2007) Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. *J Neurochem* 103:2164–2176.
- Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR (2008) Physiology of the prion protein. *Physiol Rev* 88:673–728.
- Lopes MH, Hajj GN, Muras AG, Mancini GL, Castro RM, Ribeiro KC, Brentani RR, Linden R, Martins VR (2005) Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neurogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *J Neurosci* 25:11330–11339.
- Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK, Caron MG, Lefkowitz RJ (1999) Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 283:655–661.
- Magalhães AC, Silva JA, Lee KS, Martins VR, Prado VF, Ferguson SSG, Gomez MV, Brentani RR, Prado MAM (2002) Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. *J Biol Chem* 277:33311–33318.
- Magalhães AC, Baron GS, Lee KS, Steele-Mortimer O, Dorward D, Prado MA, Caughey B (2005) Uptake and neuritic transport of scrapie prion protein coincident with infection of neuronal cells. *J Neurosci* 25:5207–5216.
- Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J (1994) 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol* 8:121–127.
- Martins VR, Linden R, Prado MAM, Walz R, Sakamoto AC, Izquierdo I, Brentani RR (2002) Cellular prion protein: on the road for functions. *FEBS Lett* 512:25–28.
- Morris RJ, Parkyn CJ, Jen A (2006) Traffic of prion protein between different compartments on the neuronal surface, and the propagation of prion disease. *FEBS Lett* 580:5565–5571.
- Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, Laplanche JL, Lehmann S, Launay JM, Kellermann O (2000) Signal transduction through prion protein. *Science* 289:1925–1928.
- Nichols BJ, Lippincott-Schwartz J (2001) Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol* 11:406–412.
- Orr AW, Pedraza CE, Pallero MA, Elzie CA, Goicoechea S, Strickland DK, Murphy-Ullrich JE (2003) Low density lipoprotein receptor-related protein is a calcitriol coreceptor that signals focal adhesion disassembly. *J Cell Biol* 161:1179–1189.
- Parkyn CJ, Vermeulen EG, Mootoosamy RC, Sunyach C, Jacobsen C, Oxvig C, Moestrup S, Liu Q, Bu G, Jen A, Morris RJ (2008) LRP1 controls biosynthetic and endocytic trafficking of neuronal prion protein. *J Cell Sci* 121:773–783.
- Parsell DA, Lindquist S (1993) The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 27:437–496.
- Peters PJ, Mironov Jr A, Peretz D, van Donselaar E, Leclerc E, Erpel S, DeArmond SJ, Burton DR, Williamson RA, Vey M, Prusiner SB (2003) Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J Cell Biol* 162:703–717.
- Pimpinelli F, Lehmann S, Maridonneau-Parini I (2005) The scrapie prion protein is present in flotillin-1-positive vesicles in central- but not peripheral-derived neuronal cell lines. *Eur J Neurosci* 21:2063–2072.
- Prusiner SB (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13363–13383.
- Ribeiro FM, Black SA, Cregan SP, Prado VF, Prado MA, Rylett RJ, Ferguson SS (2005) Constitutive high-affinity choline transporter endocytosis is determined by a carboxyl-terminal tail dileucine motif. *J Neurochem* 94:86–96.
- Robinson MB, Tidwell JL, Gould T, Taylor AR, Newbern JM, Graves J, Tytell M, Milligan CE (2005) Extracellular heat shock protein 70: a critical component for motoneuron survival. *J Neurosci* 25:9735–9745.
- Samaia HB, Brentani RR (1998) Can loss-of-function prion-related diseases exist? *Mol Psychiatry* 3:196–197.
- Santos MS, Barbosa Jr J, Veloso GS, Ribeiro F, Kushmerick C, Gomez MV, Ferguson SS, Prado VF, Prado MA (2001) Trafficking of green fluorescent protein-tagged vesicular acetylcholine transporter to varicosities in a cholinergic cell line. *J Neurochem* 78:1104–1113.
- Santuccione A, Sytnyk V, Leshchynska I, Schachner M (2005) Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *J Cell Biol* 169:341–354.
- Shmerling D, Hegyi I, Fischer M, Blattler T, Brandner S, Gotz J, Rulicke T, Flechsig E, Cozzio A, von Mering C, Hangartner C, Aguzzi A, Weissmann C (1998) Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell* 93:203–214.
- Shyng SL, Heuser JE, Harris DA (1994) A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J Cell Biol* 125:1239–1250.
- Shyng SL, Moulder KL, Lesko A, Harris DA (1995) The N-terminal domain of a glycolipid-anchored prion protein is essential for its endocytosis via clathrin-coated pits. *J Biol Chem* 270:14793–14800.
- Stuermer CA, Langhorst MF, Wiechers MF, Legler DF, Von Hanwehr SH, Guse AH, Plattner H (2004) PrPc capping in T cells promotes its association with the lipid raft proteins reggie-1 and reggie-2 and leads to signal transduction. *FASEB J* 18:1731–1733.
- Sunyach C, Checler F (2005) Combined pharmacological, mutational and cell biology approaches indicate that p53-dependent caspase 3 activation triggered by cellular prion is dependent on its endocytosis. *J Neurochem* 92:1399–1407.
- Sunyach C, Jen A, Deng J, Fitzgerald KT, Frobert Y, Grassi J, McCaffrey MW, Morris R (2003) The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *EMBO J* 22:3591–3601.
- Taylor DR, Hooper NM (2006) The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) mediates the endocytosis of the cellular prion protein. *Biochem J* 402:17–23.
- Taylor DR, Watt NT, Perera WS, Hooper NM (2005) Assigning functions to distinct regions of the N-terminus of the prion protein that are involved in its copper-stimulated, clathrin-dependent endocytosis. *J Cell Sci* 118:5141–5153.
- Tidwell JL, Houenou LJ, Tytell M (2004) Administration of Hsp70 in vivo inhibits motor and sensory neuron degeneration. *Cell Stress Chaperones* 9:88–98.
- Vieira AV, Lamaze C, Schmid SL (1996) Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science* 274:2086–2089.
- Weissmann C (1999) Molecular genetics of transmissible spongiform encephalopathies. *J Biol Chem* 274:3–6.
- Westergaard L, Christensen HM, Harris DA (2007) The cellular prion protein (PrP^C): its physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta* 1772:629–644.
- Yu Q, Kent CR, Tytell M (2001) Retinal uptake of intravitreally injected Hsc70 and its effect on susceptibility to light damage. *Mol Vis* 7:48–56.
- Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, Hajj GN, Chiarini LB, Nomizo R, Freitas AR, Cabral AL, Lee KS, Juliano MA, de Oliveira E, Jachieri SG, Burlingame A, Huang L, Linden R, Brentani RR, Martins VR (2002) Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J* 21:3307–3316.



Supplemental 1:Alexa-labeled STI1 is functionally active. STI1 and STI1 Δ 230-245 were labeled with either Alexa 488 or Alexa 568, subjected to SDS-PAGE, gels were either (A) transferred to a PVDF membrane blotted with anti-STI1 antibodies or (B) UV irradiated. (C) Primary hippocampal cultures were treated with STI1 (1 μ M), Alexa-labeled STI1 (1 μ M) or a PKA activator Forskolin (Forsk) for 20 minutes. Cells were lysed and PKA activity was measured. Values were normalized to the control cells without treatment. The results shown the mean values of 3 bars are SEM. ANOVA followed by Tukey-HSD test was used for comparisons; * $p < 0.05$.



Supplemental 2:ST11 is internalized in a specific dependent way. PrP3F4 (A) and SN56 (B) cells were incubated with $1\mu\text{M}$ ST11-AF568 for 10, 20 and 40 minutes at 37°C and internalization followed in the time frame indicated. PrP3F4 (C) and SN56 (D) cells were pre-incubated with 10 Mm non-fluorescent ST11 for 1hour at 4°C (*first row*) or with Krebs buffer (*third row*) and then incubated with $1\mu\text{M}$ labeled ST11 for 30 (C) or 15 (D) minutes at 37°C . These images are representative for several independent cultures analyzed in 2 and 4 days different days. At least 30 cells were analyzed for each condition. Second and fourth rows in C and D show differential interference contrast image (DIC) of cells overlaid with the fluorescence images of the left panels. Scale bars = $20\mu\text{m}$.

Resultados Adicionais

9.2 ENDOCITOSE DE STI1 E SINALIZAÇÃO

Neste artigo foi demonstrado que STI1 é internalizada por células de forma independente de PrP^C. Experimentos de co-localização fortemente sugerem o envolvimento de vias dependentes de lípide *Rafts* na endocitose de STI1. Em relação a endocitose de PrP^C, existem várias evidências indicando a via clássica (dependente de clatrina) como sua principal via de internalização (Sunyach et al., 2003; Taylor et al., 2005; Taylor and Hooper, 2007b). Embora STI1 mostrou fraca co-localização com clatrina e não é direcionada para endosomas primários (seguindo a rota convencional da via clássica), dada a importância desta via para internalização de PrP^C, nós decidimos avaliar melhor a sua participação na endocitose de STI1. Utilizando mutantes de dinamina (K44A) nós mostramos um bloqueio da endocitose de PrP^C e STI1 (Caetano et al., 2008). Porém, como esse mutante já foi descrito interferir na endocitose mediada por lípide *Rafts* (Henley et al., 1998; Nichols and Lippincott-Schwartz, 2001; Conner and Schmid, 2003) nós decidimos utilizar outra ferramenta: AP180-C.

Para primeiramente avaliarmos se AP180-C altera a endocitose de PrP^C induzida por STI1, células CF-10 foram co-transfectadas com AP180-C e GFP-PrP^C e perfundidas com STI1 recombinante marcada com fluoróforo. Os resultados da figura 28 mostram uma inibição parcial, porém significativa, da internalização de PrP^C induzida por STI1. É interessante observar que diferente dos experimentos com dinamina K44A, na presença de AP180-C a distribuição de STI1 na membrana não ocorre de maneira homogênea. Observa-se também que a STI1 se co-localiza com PrP^C em pontos específicos da membrana celular.

AP180-C também parece alterar a endocitose de STI1. Para melhor avaliarmos o efeito desta construção somente sobre a endocitose de STI1, células SN56 foram co-transfectadas com AP180-C e GFP, incubadas com STI1 recombinante fluorescente, fixadas e analisadas no microscópio confocal (Figura 28B). Utilizou-se GFP apenas como indicador das células que receberam os plasmídeos. O primeiro painel da figura 28B mostra que esta construção não altera a internalização de STI1, podendo ser utilizada como controle. Novamente nota-se um bloqueio significativo da endocitose de STI1 pela expressão de AP180-C ($p < 0.0001$). Em conjunto os

resultados da figura 28 sugerem a participação da via clássica na endocitose de ST11.

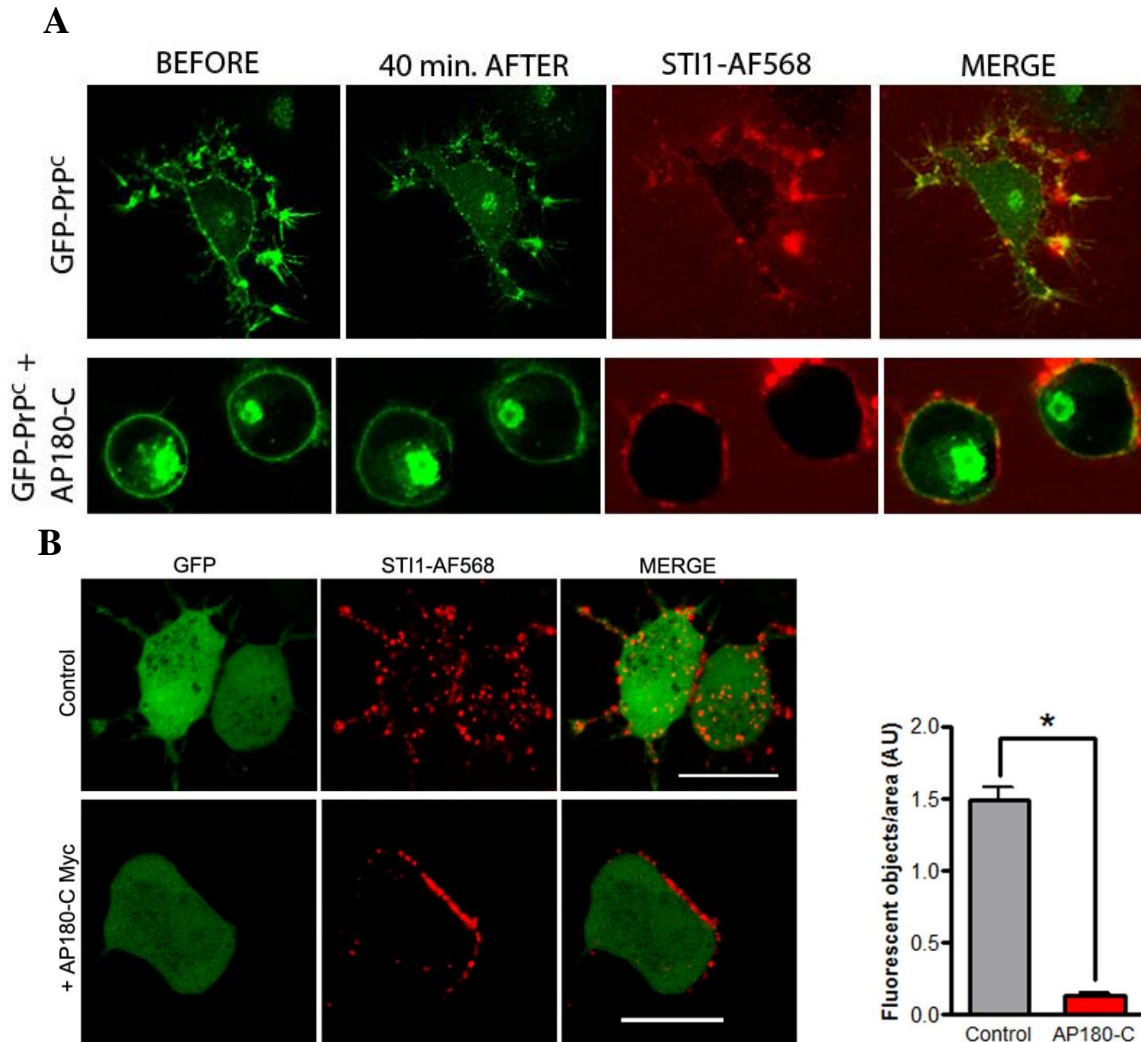


Figura 28- Endocitose de PrP^C e ST11 é inibida por AP180-C.

A, Células neuronais de camundongo foram transfectadas com GFP-PrP^C (primeira linha) ou co-transfectadas com GFP-PrP^C e AP180-C (segunda linha). Após 48 horas de transfecção, as células foram perfundidas com ST11 recombinante marcada fluorescentemente com Alexa-Fluor 568 (AF-568) por 40 minutos. As imagens correspondem a fatias ópticas representativas de 4 diferentes experimentos e foram adquiridas antes (before) e 40 minutos após (after) o tratamento com ST11. **B**, para quantificar o efeito de AP180-C sobre a endocitose de ST11 células SN56 foram transfectadas com GFP ou co-transfectadas com GFP e AP180-C (primeira e segunda linha respectivamente). As células foram tratadas com ST11-AF568 por 40 minutos, fixadas e analisadas no microscópio confocal. A quantificação da fluorescência interna (ST11 internalizada) foi realizada no programa Metamorph. Utilizou-se 68 células controle e 94 células co-transfectadas. Os resultados foram analisados utilizando-se Test *t-student*, $p < 0.0001$, e mostram um bloqueio significativo da endocitose de ST11 por AP180-C. Scale Bars, 20 μ m.

Como dito anteriormente, a distribuição de STI1 na presença do mutante de dinamina K44A e GFP-PrP^C ocorre de forma homogênea na membrana, co-localizando-se perfeitamente com PrP^C. Da mesma forma células super expressando apenas GFP-PrP^C observa-se que a distribuição de STI1 segue a distribuição de PrP^C na membrana (ver artigo, figuras 5 e 9). Nos casos em que não há a super ou mesmo a expressão de PrP^C (células CF-10) a STI1 forma vários aglomerados na membrana antes de ser internalizada. Essa distribuição também foi vista em células expressando apenas K44A, mais uma vez sugerindo que a presença de PrP^C pode atrair STI1 determinando sua distribuição. Porém, nos experimentos com AP180-C mostrados na figura 28, STI1 parece não seguir exatamente a distribuição de PrP^C. PrP^C é uma glicoproteína de membrana que se localiza em lípide *Rafts* (Sunyach et al., 2003; revisto por Linden et al., 2008), e STI1 exógena também se co-localiza com marcadores destes lípides nos primeiros minutos de interação com as células (Caetano et al., 2008). Dessa forma, uma das hipóteses seria que AP180-C altera a distribuição de lípide *Rafts*. AP180-C é bem conhecido pela sua atividade como bloqueador da endocitose mediada por clatrina (Carvou et al., 2007) não se sabendo exatamente seus efeitos sobre os lípide *Rafts*. Para avaliarmos se a super expressão de AP180-C altera a distribuição dos lípide *Rafts*, células SN56 foram co-transfectadas com os marcadores de lípide *Rafts* flotilina1 e caveolina1 e AP180-C. Clatrina-GFP foi utilizada como controle, tendo em vista a atuação de AP180-C sobre esta via. A figura 29 mostra a distribuição celular dos marcadores de via endocítica na ausência (coluna 1) e na presença (coluna 2) de AP180-C. Todos os marcadores tiveram sua distribuição celular alterada quando AP180-C foi expresso. Ao invés de uma distribuição pontuada na membrana, clatrina-GFP apresentou uma distribuição difusa no citoplasma, com formação de grandes aglomerados. Da mesma forma, flotilina e caveolina 1 formaram grandes aglomerados intracelulares sugerindo que AP180-C altera a distribuição ou composição dos lípide *Rafts*. A endocitose de transferrina via clatrina foi completamente bloqueada na presença de AP180-C (dados não mostrados). Já a funcionalidade das vias dependentes de flotilina e caveolina não foi avaliada neste trabalho. Vários artigos mostram que proteínas como a toxina da cólera podem ser internalizadas por vias independentes de clatrina na presença de AP180-C (Nichols, 2002). Dessa forma é possível que apesar da distribuição dos marcadores de lípide

Rafts estar alterada, a endocitose mediada por estas vias ainda estejam ativas o que explicaria a inibição parcial e não total da internalização de STI1 e PrP^C.

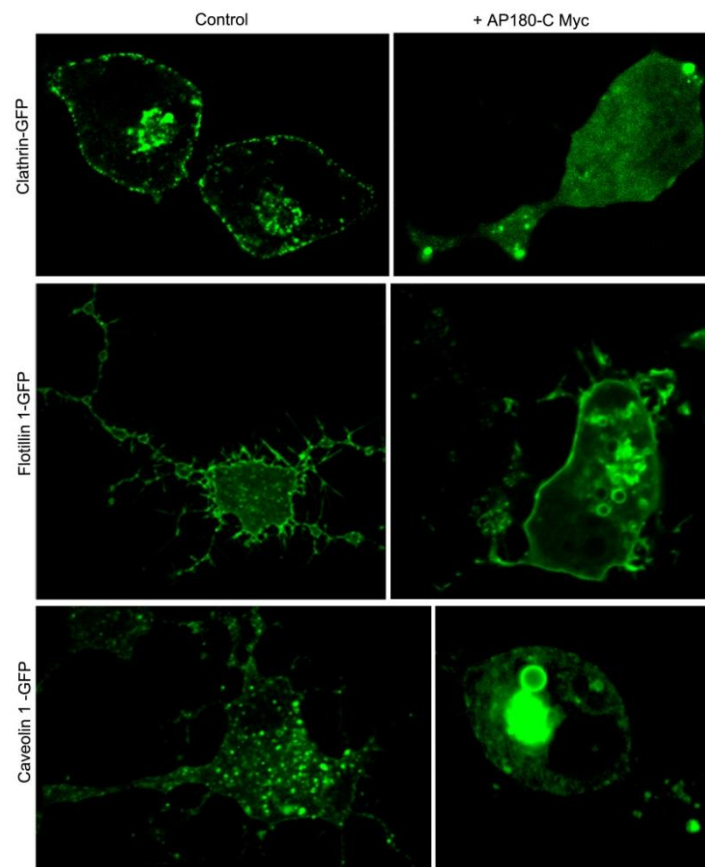


Figura 29: AP180-C altera a distribuição celular de Clatrina e também dos marcadores de lípide *Rafts*.

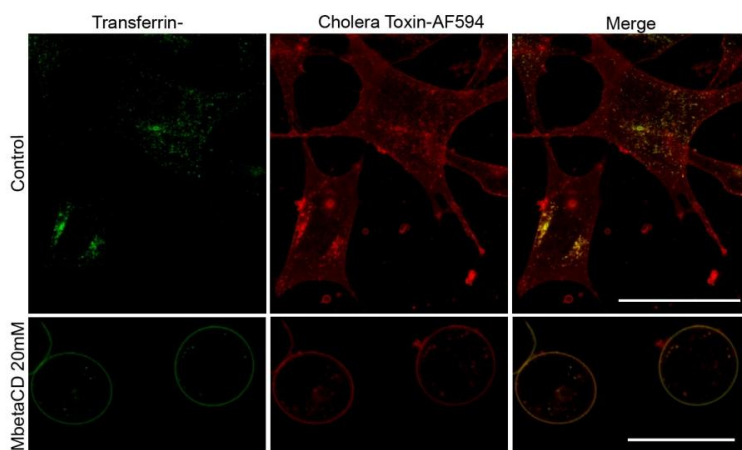
Células SN56 foram transfectadas com Clatrina-GFP, Flotilina1-GFP ou Caveolina1-GFP (primeira coluna) ou co-transfectadas com estas construções mais AP180-C (segunda coluna). Após a transfecção, as células foram diferenciadas por dois dias e analisadas no microscópio confocal. As figuras mostram fatias óticas de imagens representativas de 4 experimentos independentes.

Em conjunto, estes resultados sugerem a participação de vias dependentes e independentes de clatrina na endocitose de STI1. Para mais uma vez confirmar este resultado, nós utilizamos a droga metil- β -ciclodextrina (M β CD) que é conhecida por depletar colesterol na membrana plasmática alterando principalmente as vias endocíticas dependentes de lípide *Rafts*. Células PrP3F4 foram tratadas com diferentes concentrações de M β CD, variando de 6 a 30 mM. O objetivo era encontrar uma concentração de M β CD que não bloqueasse tanto a internalização dependente de clatrina, o que nos permitiria avaliar somente a influência das outras

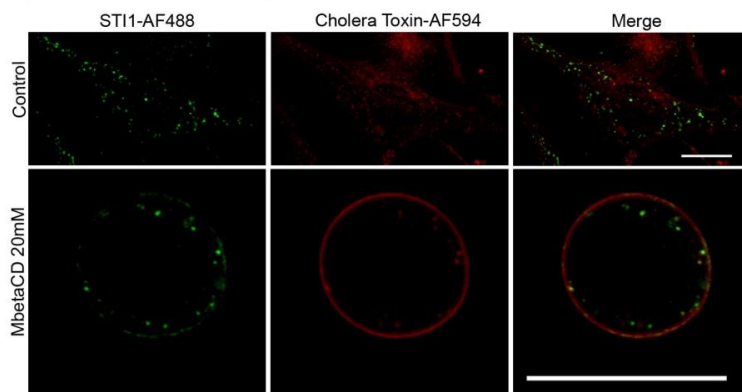
vias na endocitose de STI1. Porém, como visto na literatura, M β CD alterou significativamente a endocitose de transferrina em todas as concentrações utilizadas (Subtil et al., 1999; Rodal et al., 1999). Nós decidimos então utilizar 20 mM de M β CD que foi uma concentração que melhor inibiu a endocitose da subunidade B da Toxina Cólera (CTxB) e não bloqueou completamente a endocitose de transferrina (TF) (Figura 30).

O tratamento utilizado foi capaz de bloquear 90% da endocitose de CT e TF. Os outros 10% provavelmente representa endocitose dependente de clatrina, tendo em vista a co-localização de CTxB com TF e o envolvimento já descrito dessa via em parte da endocitose de CTxB (Torgersen et al., 2001). Em relação à STI1, o tratamento com M β CD bloqueou consideravelmente sua endocitose (cerca de 75%), mais uma vez sugerindo o envolvimento de vias dependentes e independentes de clatrina nesse processo. A fração de STI1 que conseguiu sofrer internalização na presença de M β CD apresentou apenas co-localização parcial com CTxB. No entanto, houve uma alteração morfológica substancial com essa droga, o que sugere que talvez as alterações encontradas ocorram devido a alterações de viabilidade celular.

A



B



C

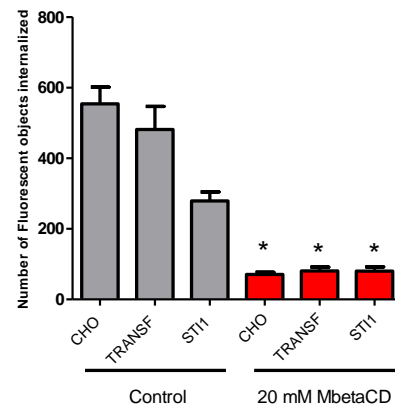


Figura 30: Endocitose de STI1 é dependente de lípidos.

Células PrP3F4 foram pré-tratadas com metil- β -ciclodextrina por 30 minutos a 37 °C e em seguida incubadas com Transferrina AF488 e Cholera Toxina AF-594 (A) ou STI1-AF488 e Cholera Toxina AF594 (B) por 10 minutos. As células foram rapidamente analisadas no microscópio confocal. Como controle seguiu-se o mesmo procedimento, porém o pré-tratamento foi feito apenas com tampão. C, A quantificação da fluorescência interna (vesículas internalizadas) foi realizada no programa Metamorph. Utilizou-se 87, 235 e 148 células para análises dos controles de transferrina, cholera e STI1 respectivamente. Para quantificação dos experimentos foram utilizadas 151, 429 e 278 células para transferrina, cholera e STI1 respectivamente. Os resultados mostram a média \pm SD e foram comparados utilizando-se one way Anova e Tukey's como pós-teste. * representa diferença estatística quando comparado com as células controle não tratadas, $p < 0.0001$. Nota-se uma diminuição de $75 \pm 3\%$ na internalização de STI1 (média \pm EMP). Scale Bars, 20 μ m. CHO = Toxina Cólera, TRANSF = Transferrina.

Um outro importante resultado do nosso artigo foi que a endocitose de PrP^C induzida por STI1 é importante para ativação de ERK1/2 dependente da interação entre estas proteínas. A nossa hipótese é de que a interação STI1-PrP^C na membrana é o primeiro passo para a ativação de um complexo protéico envolvido na endocitose e consequentemente sinalização mediada por estas proteínas. Os resultados mostrando o bloqueio da ativação de ERK foram obtidos utilizando-se células N-PrP3F4 que expressam uma proteína prion mutada na região polibásica, o que compromete sua endocitose via clatrina (Taylor et al., 2005). Nessa abordagem a endocitose de STI1 não foi bloqueada e portanto, sua implicação para sinalização não pode ser avaliada. Nós demonstramos que os mutantes K44A e AP180-C bloqueiam a endocitose de PrP^C e STI1 constituindo dessa forma, importantes ferramentas para estudo dos efeitos da endocitose nas atividades mediadas por estas proteínas. Dando continuidade ao trabalho, nós decidimos avaliar a fosforilação de ERK1/2 mediada pela interação STI1-PrP^C na presença de dinamina K44A e AP180-C. Como controle nós também avaliamos essa sinalização na presença de dinamina WT. A figura 31 mostra os resultados destes experimentos.

Células CF-10 foram utilizadas como controle, mostrando que a ativação de ERK induzida por STI1 é dependente de PrP^C. Células transfectadas com os mutantes K44A ou AP180-C não apresentaram ativação de ERK1/2 induzida por STI-PrP^C. Porém, surpreendentemente, células transfectadas com dinamina WT também não apresentaram ativação significativa de ERK1/2.

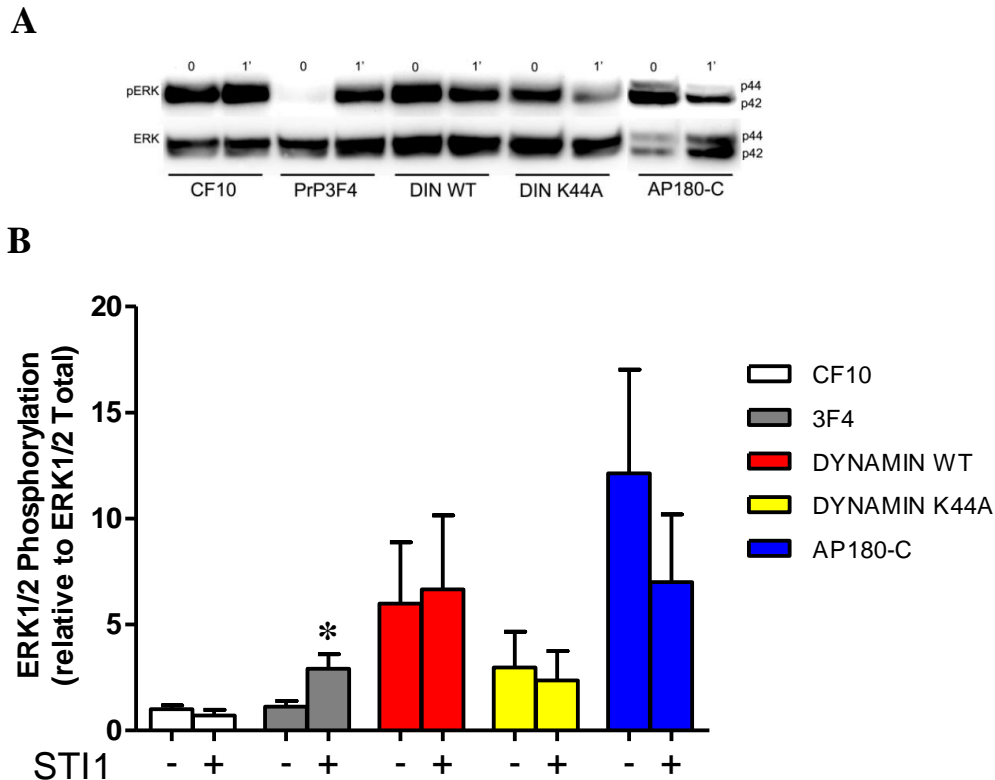


Figura 31 – Avaliação da ativação de ERK1/2 dependente de STI1- PrP^C na presença de bloqueadores da endocitose.

A, Células PrP3F4 foram transfectadas com dinamina selvagem (WT), mutante (K44A) ou AP180-C. Após 48 horas de transfecção, as células foram tratadas com STI1 recombinante por 1 minuto ou apenas com tampão e então lisadas. O extrato total foi submetido a eletroforese de proteínas e *Western Blotting* e a fosforilação de ERK1/2 foi avaliada utilizando-se o anticorpo fosfo-ERK. Células CF-10 e PrP3F4 não transfectadas foram usadas como controles do experimento. As bandas dos immunoblottings foram quantificadas no programa FluorChem (GE) e os resultados normalizados pela expressão de ERK total. **B**, Todos os experimentos foram normalizados pela média da atividade basal das células PrP3F4 não tratadas. Nota-se um aumento na atividade basal de ERK nas células transfectadas. Os resultados mostram os valores da média \pm SD de 5 experimentos independentes e foram comparados por Test *t-student*. * representa diferença estatística quando comparado com as células controle não tratadas, $p < 0.0420$.

Ao normalizarmos os resultados de todos os experimentos pela média da expressão basal de fosfo-ERK em células PrP3F4 não tratadas, nós observamos claramente que a atividade basal de ERK estava muito aumentada nas células transfectadas (figura 31B). Nós transfectamos células PrP3F4 com vetor vazio na mesma concentração utilizada nos experimentos para testar se o processo de transfecção era o responsável pelo aumento da atividade basal de ERK. Porém, tanto a atividade basal quanto a ativação induzida por STI1-PrP^C foram normais

nestas células (dados não mostrados), sugerindo que é a expressão das dinaminas e AP180-C que altera a atividade de ERK. É possível que a alta atividade basal de ERK nas células transfectadas mascare qualquer efeito adicional provocado por STI1. Portanto, nós não fomos capazes de avaliar o efeito da endocitose de STI1 e PrP^C na sinalização via ERK com essa abordagem. Em relação a AP180-C, nós não tínhamos a construção AP180 para utilizar como controle; mas como sua expressão também aumenta a atividade basal de ERK, esse experimento mostra-se inconclusivo.

9.3 ENVOLVIMENTO DE LRP1 NA SINALIZAÇÃO MEDIADA PELA INTERAÇÃO STI1-PrP^C

Uma questão intrigante na sinalização induzida pela interação STI1-PrP^C é quem é o mediador transmembrana que conecta esse sinal extracelular com eventos intracelulares. Tendo em vista que PrP^C é uma proteína ligada à membrana por uma âncora de GPI e não possui um domínio transmembrana, a nossa hipótese é que a sinalização via ERK induzida por STI1 é dependente da capacidade de PrP^C interagir com uma proteína transmembrana. Dados recentes sugerem que o receptor nicotínico $\alpha 7$ faz parte desse complexo e medeia o influxo de cálcio necessário para a ativação de sinais intracelulares (Beraldo et al. B). Por outro lado, o fato do mutante de PrP^C N-PrP3F4 (²³KKRPKP²⁸ para ²³KQHPS²⁸) impedir a sinalização por ERK 1/2 indica a possibilidade de participação de complexos endocíticos nesse processo. Uma proteína transmembrana candidata para este papel é LRP1, um receptor multifuncional recentemente descrito como um mediador da endocitose de PrP^C via clatrina (Taylor e Hooper, 2007; Parkyn et al., 2008).

Para avaliarmos o envolvimento de LRP1 na sinalização mediada por PrP^C, nosso primeiro passo foi avaliar a expressão de LRP1 nos modelos celulares que foram utilizados: células CF-10, PrP3F4 e também células embrionárias de rim humano, HEK 293. LRP1 é uma proteína formada por uma cadeia transmembrana de 85 kDa e uma cadeia extracelular de 515 kDa. A figura 32 mostra a expressão endógena de LRP1 nas células alvo deste trabalho. Os resultados sugerem uma diminuição da expressão de LRP1 em células *Knock outs* para PrP^C comparado com a expressão nas outras linhagens celulares utilizadas, porém tendo em vista a falta de um marcador de alto peso molecular que nos permitisse normalizar o

carregamento do gel, não foi possível avaliar essa diminuição mais precisamente. Morris e colaboradores mostraram que um aumento na expressão de PrP^C levou a um pequeno aumento na expressão de LRP1 (Parkyn et al., 2008). Da mesma forma os autores mostraram através do uso de siRNA para LRP1, que a diminuição dos níveis deste receptor também leva à diminuição dos níveis de expressão de PrP^C. Estes resultados sugerem que a expressão de PrP^C é modulada pela expressão de LRP1 e provavelmente a expressão desta última também seja alterada por PrP^C.

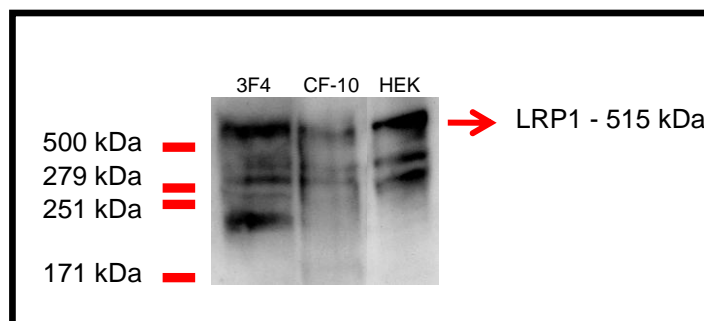


Figura 32 – Avaliação da expressão endógena de LRP1.

Células 3F4, CF-10 e HEK foram lisadas e o extrato total de proteínas (80ug) foi submetido a eletroforese em gel de gradiente Tris-Glicina de 4-12%. Após transferência para membrana de PVDF, a expressão de proteínas foi avaliada por Western Blotting utilizando anticorpo anti-LRP1 (Santa-Cruz) na diluição de 1:300.

A interação de LRP1 com PrP^C parece ser uma etapa importante na promoção da internalização desta proteína ancorada por GPI, provavelmente através de vesículas cobertas por clatrina (Taylor and Hooper, 2007b; Parkyn et al., 2008). Com descrito anteriormente, um mutante de PrP^C que não é internalizado pela via clássica não é capaz de sinalizar via ERK em resposta a STI1. Dessa forma, como LRP1 liga PrP^C à clatrina é possível que este receptor seja parte do complexo de sinalização envolvido nas atividades de PrP^C. Para testar esta hipótese nós decidimos bloquear a ligação de LRP1 com PrP^C e avaliar a fosforilação de ERK1/2 induzida por STI1. O bloqueio de LRP1 foi feito utilizando-se seu ligante RAP. O receptor associado a proteína (RAP) é uma chaperona biosintética de LRP1 que interage com esta proteína. Quando adicionado extracelularmente, RAP compete com PrP^C pelo sítio de ligação em LRP1, podendo, desta forma, ser usado para efetivamente bloquear a endocitose de PrP^C. Células 3F4 foram pré-tratadas com RAP por 40 minutos a 37°C e em seguida tratadas com STI1 recombinante por 1

minuto. O *Immunoblotting* da figura 33 mostra uma leve ativação de ERK1/2 induzida por STI1-PrP^C em células pré-tratadas com RAP. Porém, a quantificação das bandas dos *Immunoblottings* mostra que não houve diferença estatística entre as células controle e tratadas com RAP (Figura 33B), sugerindo que RAP bloqueia a ativação de ERK1/2 induzida pela interação STI1-PrP^C. Os resultados mostrados no gráfico da figura 32 foram normalizados pela atividade basal de ERK em células PrP3F4 não tratadas. Novos experimentos deverão ser realizados para avaliarmos melhor o envolvimento de LRP1 nesta sinalização.

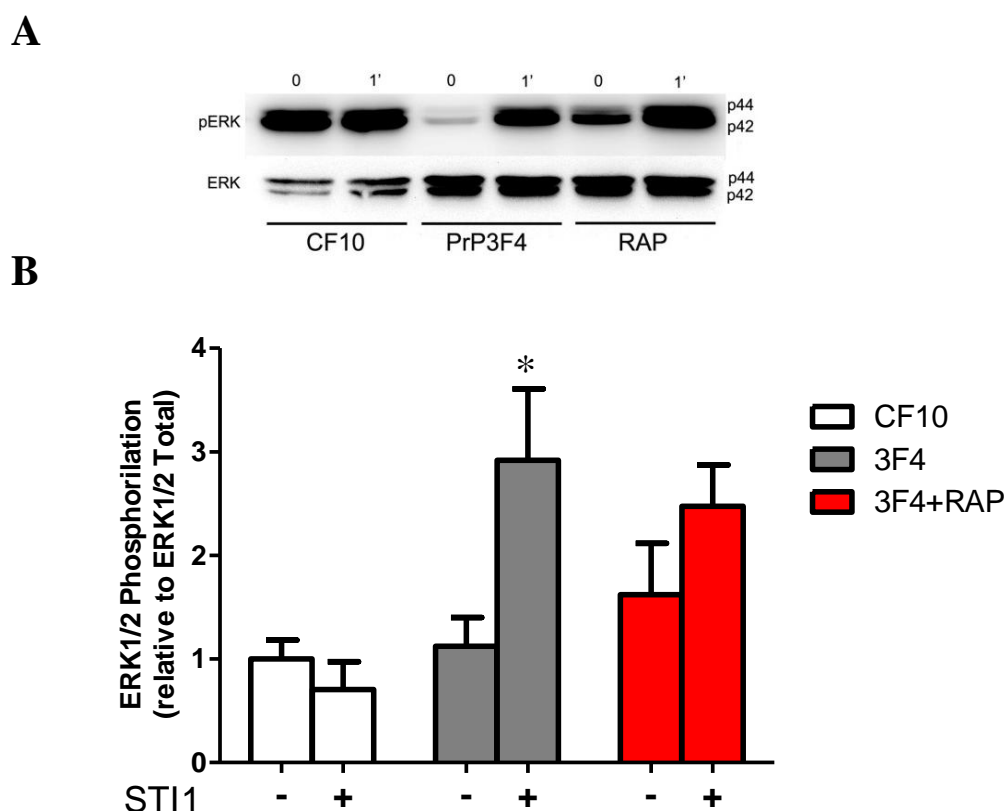


Figura 33 – Avaliação da ativação de ERK1/2 dependente de STI1- PrP^C na presença de RAP.

A, Células PrP3F4 foram pré-tratadas com RAP por 40 minutos a 37°C e em seguida tratadas com STI1 recombinante por 1 minuto. O extrato total foi submetido a eletroforese de proteínas e *Western Blotting* e a fosforilação de ERK1/2 foi avaliada utilizando-se o anticorpo fosfo-ERK. Células CF-10 e PrP3F4 não tratadas com RAP foram utilizadas como controles do experimento. As bandas dos immunoblottings foram quantificadas no programa FluorChem e os resultados normalizados pela expressão de ERK total. O gráfico em **B** mostra os resultados dos experimentos normalizados pela média da atividade basal de ERK das células PrP3F4 não tratadas. Os resultados mostram os valores da média±SD para 4 experimentos independentes e foram comparados por Test *t-student*. * representa diferença estatística quando comparado com as células controle não tratadas, $p < 0.0420$.

9.4 AMYLOID-BETA INCREASES THE LOCALIZATION OF PRION PROTEIN AT THE CELL SURFACE

Minha participação específica neste artigo

Nesse artigo, com exceção da figura 1, referente aos experimentos de sinalização de ERK induzida pelos oligômeros, eu fiz todos os outros experimentos.

Este artigo foi recentemente submetido à revista Journal of Neurochemistry e trata-se dos nossos resultados sobre os efeitos dos oligômeros A β sobre o tráfego de PrP^C. A seguir foi colocado o manuscrito no formato em que foi submetido para a revista.

Amyloid-beta increases the localization of prion protein at the cell surface

Fabiana A. Caetano^{1,3, 4}; Flavio H. Beraldo^{1,2}; Andre L. Guimaraes^{1,2,6}; Ivana Souza^{1,3,4}; Daisy .Y.-L. Wong¹, Vilma R. Martins⁵; Vania F. Prado^{1,2,3}; R. Jane Rylett^{1,2} and Marco A.M. Prado^{1,2,3,*}.

¹J. Allyn Taylor Centre for Cell Biology, Molecular Brain Research Group, Robarts Research Institute, ²Department of Physiology and Pharmacology, and ³Department of Anatomy and Cell Biology University Western Ontario, London, ON, Canada

⁴Program in Molecular Pharmacology, Faculdade de Medicina, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil

⁵Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo, SP, Brazil

⁶Department of Dentistry, Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, MG, Brazil

To whom correspondence should be addressed at:

e-mail: mprado@robarts.ca

Address: Robarts Research Institute, The University of Western Ontario, P.O. Box 5015, 100

Perth Drive, London, ON N6A 5K8

Tel: 519-663-5777 Ext. 24888

Fax: 519-663-3789

Abbreviations: Amyloid- β (A β), Alzheimer's disease (AD), Amyloid precursor protein (APP), Prion protein (PrP^C), Total internal reflection microscopy (TIRF), transmissible spongiform encephalopathy (TSE), Glycosylphosphatidylinositol (GPI).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

In Alzheimer's disease Amyloid- β peptide ($A\beta$) interacts with distinct proteins at the cell surface to interfere with synaptic communication. Recent data have implicated the prion protein (PrP^C) as a putative receptor for $A\beta$ with possible involvement its effects on synaptic plasticity and behavioural dysfunction. PrP^C is a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein which cycles between the plasma membrane and intracellular compartments. We show here that $A\beta$ oligomers signals in cells in a PrP^C -dependent manner. Immunofluorescence, flow cytometry and cell surface protein biotinylation experiments indicated that treatment with $A\beta$ oligomers, but not monomers, increased the localization of PrP^C at the cell surface. We used confocal and total internal reflection microscopy to follow PrP^C in living cells and we show that treatment with $A\beta$ oligomers increase the localization of PrP^C at the cell surface and to clusters and vesicles in very close proximity to the cell surface. $A\beta$ oligomers inhibited the constitutive endocytosis of PrP^C , whereas $A\beta$ also seemed to recruit more PrP^C to clusters at the cell surface. Our experiments show for the first time that $A\beta$ oligomers affect PrP^C trafficking, increasing its localization at the cell surface.

Key words: Abeta, amyloid, prion protein, Alzheimer's disease, endocytosis, TIRF microscopy

Running title: PrP^C trafficking and Alzheimer's disease

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent form of dementia in humans. Considerable evidence in AD points to a causal role for altered metabolism of the amyloid precursor protein (APP), with increased levels of peptides derived from APP collectively known as amyloid- β peptides [A β , (Selkoe and Schenk 2003;Haass and Selkoe 2007)]. The pathological hallmarks of AD are the accumulation of extracellular senile plaques formed by aggregation of A β , and intracellular tangles formed by the hyperphosphorylated form of the microtubule-associated protein Tau. These pathological alterations are believed to represent endpoints in AD, hence considerable effort is being made to understand the early events in the disease that can affect cognitive function (Klein 2002;Gong *et al.* 2003;Selkoe and Schenk 2003). It is predicted that these early events might be amenable to pharmacological manipulation, thereby providing novel targets to decrease cognitive loss in AD. A β peptides self-assemble to generate oligomers and these species of A β may impair communication between neurons in the brain many years before clinical symptoms of AD emerge (Selkoe 2006). For example, A β oligomers inhibit synaptic transmission and plasticity (Lambert *et al.* 1998;Klyubin *et al.* 2005) causing deficits in cognitive-related behaviors in animal models (Cleary *et al.* 2005;Selkoe 2008) and humans (Sperling *et al.* 2009).

There is great interest in understanding mechanisms by which A β oligomers (also known as ADDLs) affect cellular signaling in neurons. Recent work has shown, by using an unbiased genetic screen, that A β oligomers bind to the prion protein [PrP^C, (Lauren *et al.* 2009).] PrP^C is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein that can undergo conformational change to a β -sheet enriched conformer called PrP^{Sc} and is involved in transmissible spongiform encephalopathies [(TSE), (Prusiner 1998;Weissmann 1999). TSEs and AD show some remarkable similarities, albeit with the former diseases progressing more quickly after symptoms are detected (Collinge 2005). Increasingly, there is evidence reported that PrP^C contributes to neuronal alterations that culminate in the pathological changes detected in TSEs (Caughey and Baron 2006;Linden *et al.* 2008).

There are a remarkable number of possible functions for PrP^C and consequently the potential physiological roles for PrP^C are still controversial (Westergard *et al.* 2007;Linden *et al.* 2008;Martins *et*

1
2
3 *al.* 2009). We hypothesized that PrP^C functions as an extracellular scaffold protein capable of binding
4 multiple ligands and organizing signaling platforms at the cell surface (Martins *et al.* 2002;Prado *et al.*
5 2004;Linden *et al.* 2008). Thus by modulating neuronal signaling, PrP^C could indeed have multiple
6 functions in the nervous system. Several ligands that interact with PrP^C to trigger neuronal signaling have
7 been described, and these are relevant for neuritogenesis (Graner *et al.* 2000a;Graner *et al.* 2000b;Lopes
8 *et al.* 2005;Santuccione *et al.* 2005;Hajj *et al.* 2007;Linden *et al.* 2008), neuronal survival (Chiarini *et al.*
9 2002;Zanata *et al.* 2002;Lopes *et al.* 2005;Roffe *et al.* 2010) and learning and memory (Coitinho *et al.*
10 2006;Coitinho *et al.* 2007).

11
12 PrP^C may also function as a receptor for A β oligomers. Importantly, deficits in synaptic plasticity
13 caused by synthetic A β oligomers are rescued in PrP^C-null mice (Lauren *et al.* 2009). Moreover, some of
14 the behavioural deficits observed in a transgenic mouse model of AD are also prevented by the absence of
15 PrP^C (Gimbel *et al.* 2010), although synaptic plasticity dysfunction was not prevented in a different
16 transgenic AD mouse model by the lack of PrP^C (Calella *et al.* 2010). The binding site of A β oligomers to
17 PrP^C was mapped to amino acids 90-105 (Lauren *et al.* 2009), a region of PrP^C that is critical for its
18 signalling properties and that is in close proximity to binding sites for other PrP^C ligands such as
19 vitronectin (Hajj *et al.* 2007) and STI1 (Zanata *et al.* 2002). Binding of A β oligomers to recombinant PrP^C
20 was confirmed in other reports (Balducci *et al.* 2010;Chen *et al.* 2010), with one of these groups also
21 identifying amino acids 23-27 at the N-terminus of PrP^C as a secondary binding site (Chen *et al.* 2010).
22 Remarkably, this N-terminal region was shown previously to mediate both constitutive and copper-
23 evoked clathrin-mediated endocytosis of PrP^C (Taylor and Hooper 2006;Parkyn *et al.* 2008).

24
25 Many GPI-anchored proteins are internalized by cells in a process that can be increased by ligand
26 binding (Mayor *et al.* 1994;Maxfield and Mayor 1997). A β can trigger endocytosis of glutamate receptor
27 subunits (Snyder *et al.* 2005;Almeida *et al.* 2005) and the insulin receptor (Zhao *et al.* 2008;De Felice *et al.*
28 2009), and change the trafficking of metabotropic glutamate receptor 5 (Renner *et al.* 2010). However,
29 it is unknown if A β affects PrP^C trafficking. We used multiple experimental approaches to test the
30 hypothesis that, similar to other receptors, internalization of PrP^C could be triggered by A β oligomers.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Surprisingly, treatment of cells with A β oligomers actually increases cell surface localization of PrP^C,
4
5 with this occurring at least in part by a decrease in the constitutive internalization of PrP^C. This is the first
6
7 report of the effects of A β oligomers on the trafficking of PrP^C and these results provide a new framework
8
9 to understand the mechanisms by which A β can modulate neuronal function.
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Material and Methods

A β oligomers and monomers: A β (1-42) peptides (California Peptide Research, Napa, CA) was prepared and used to generate oligomeric and monomeric forms as described previously (Dahlgren *et al.* 2002;Stine, Jr. *et al.* 2003;Young *et al.* 2009). Briefly, lyophilized peptides were dissolved in HFIP (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol; Sigma-Aldrich) to ensure that the starting material was in a homogenous non-aggregated monomeric state, then aliquots containing peptide were placed in polypropylene microcentrifuge tubes. HFIP was removed by evaporation and the resulting A β peptide films were stored at -80°C. Prior to use, each peptide film was reconstituted in DMSO to give an 1 mM A β stock solution, then incubated in a bath sonicator for 10 min. The peptide stock was then diluted to a concentration of 100 μ M with ice-cold Ham's F-12 (phenol red-free), and incubated for 24 h at 4°C to facilitate the formation of A β oligomers. These A β oligomer preparations were either stored at -80°C or used immediately for treatment of cells; individual A β oligomer stocks were never thawed and re-frozen. For non-aggregated monomeric A β , 1mM DMSO stock solutions were diluted to 100 μ M with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 and used in experiments immediately.

Cell culture - CF-10, a PrPC-null neuronal cell line derived from 129/Ola *Prnp0/0* mice (Manson *et al.*, 1994) and its counterparts expressing either 3F4-tagged mouse PrP^C (PrP3F4) or N-PrP3F4 [N-terminally mutated, altered from ²³KKRPKP²⁸ to ²³KQHPSP²⁸ which decreases its clathrin-mediated endocytosis, see [(Sunyach *et al.* 2003;(Caetano *et al.* 2008)] were cultured in DMEM containing glutamine (2 mM), penicillin (100 IU), and streptomycin (100 μ g/ml) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). PrP3F4 and N-PrP3F4 cells were maintained in 10 μ g/ml Hygromycin B. Human embryonic kidney HEK293 cells were cultured in MEM containing penicillin (100 IU) and streptomycin (100 μ g/ml) supplemented with 10% FBS. Cell culture media and supplements were obtained from Invitrogen.

ERK1/2 activity: CF-10 and PrP3F4 cells were plated onto 35 mm plates and serum-starved for 48 h prior to experiments. CF-10 and PrP3F4 were treated with A β oligomers (1 μ M) for 0.5 to 10 min, then

1
2
3 rinsed with ice-cold PBS and lysed in RIPA Buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40,
4
5 1% sodium deoxycholate and 1% SDS) containing protease inhibitors (Sigma-Aldrich) and phosphatase
6
7 inhibitors (NaF 10 mM and Na₃VO₄ 500 μM) for 1 h at 4°C. Cell extracts were subject to SDS-PAGE
8
9 (10%) and proteins were transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were immersed in
10
11 blocking solution (5% milk, 0.1% Tween-20 in TBS) for 1 h at room temperature, then incubated with
12
13 anti-phospho ERK1/2 (p44-p42) and anti-total ERK1/2 antibodies (Cell Signaling Technology Beverly,
14
15 MA) at 1:1000 dilution overnight at 4°C. Membranes were incubated with peroxidase-coupled, goat anti-
16
17 rabbit secondary antibody at 1:10000 (BioRad) in 5% milk/TBST for 1 h at room temperature, then
18
19 immersed in enhanced chemiluminescence (ECL) solution (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and
20
21 immunopositive bands detected using a CCD-based system (Alpha Innotech). ERK1/2 band densities
22
23 were quantified using Image J Software (NIH) and represented as a relative value of the ratio of phospho-
24
25 ERK1/2 to total ERK1/2 for each sample.
26
27

28
29 **Immunofluorescence:** PrP3F4 cells were treated with 1 μM Aβ oligomers, 1 μM monomers or buffer for
30
31 1, 5 or 10 min at 37°C in Krebs buffer (124 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 25 mM HEPES, 10
32
33 mM glucose, 1 mM CaCl₂). After treatment, cells were washed 3 times with PBS, fixed in 4% p-
34
35 formaldehyde (Polyscience) for 20 min at room temperature, then prepared for immunofluorescence.
36
37 Briefly, cells were permeabilized for 5 min using 0.5% Triton-X100 in PBS and incubated for 1 h in
38
39 blocking solution (1% BSA and 5% calf serum in PBS). After blocking, cells were incubated with anti-
40
41 PrP^C antibody raised in PrP^C-null mice against recombinant mouse PrP^C (Zanata *et al.* 2002;Caetano *et al.*
42
43 2008) at 1:200 dilution overnight at 4°C. Cells were incubated with fluorescence-conjugated secondary
44
45 antibody and analyzed by confocal microscope.
46
47

48
49 **Flow Cytometry:** PrP3F4 cells were seeded in 35 mm dishes two days prior to experiments. Cells were
50
51 treated with 1 μM Aβ oligomers in Krebs buffer for 1, 5 or 10 min at 37°C. After treatment, cells were
52
53 transferred to ice, washed 3 times with cold Krebs buffer and incubated with anti-PrP^C antibody (Zanata
54
55 *et al.* 2002) at 1:300 dilution for 1 h at 4°C. Cells were then incubated with fluorescence-conjugated
56
57
58
59
60

1
2
3 secondary antibody for 1 h at 4°C, washed twice with cold PBS and released from the dishes using 5 mM
4
5 EDTA in PBS. Cells were fixed in 4% p-formaldehyde for 15 min while rotating, then centrifuged and
6
7 washed. The cell surface immunofluorescence was analyzed by flow cytometry using a FACSCalibur
8
9 analysis cytometer from BD running the Becton Dickinson CellQuest Pro software. **Biotinylation:**
10
11 Biotinylation of cell surface proteins was performed as described previously (Caetano *et al.* 2008).
12
13 Briefly, PrP3F4 cells were incubated with 1 µM Aβ oligomers or monomers, transferred to ice, washed,
14
15 and incubated on ice in PBS/CM (PBS supplemented with 1 mM MgCl₂ and 0.1 mM CaCl₂). Cell surface
16
17 proteins were biotinylated with sulfo-NHS-SS-biotin (Thermo Scientific) for 40 min on ice. To quench
18
19 the biotinylation reaction, cells were washed and incubated for 30 min with cold 100 mM glycine in
20
21 PBS/CM, and proteins were extracted using 10 mM Tris, pH 7.4, 0.1 M NaCl, 10 mM EDTA, 0.5%
22
23 Triton X-100, 0.5% acid deoxycholic and protease inhibitor cocktail. Biotinylated proteins were separated
24
25 from non-biotinylated proteins by Neutravidin beads pull-down from equivalent amounts of total cellular
26
27 proteins (800 µg) from each sample. Biotinylated proteins were subjected to SDS-PAGE, followed by
28
29 electroblotting onto polyvinylidene-fluoride membranes and revealed using a mouse anti-PrP^C antibody
30
31 (Zanata *et al.* 2002). For quantification, PrP^C bands were analyzed using the Alpha Innotec FluoChem
32
33 software and normalized to the amount of PrP^C in the cell lysates.
34
35

36
37 **Fluorescent antibody labeling of PrP^C:** Mouse IgG2b Zenon Alexa Fluor 488 labeling reagent was
38
39 combined with anti-PrP^C 8H4 (Abcam, 1µl/reaction) according to manufacturer's instructions
40
41 (Invitrogen). PrP3F4 cells were incubated with this complex for 1 h at 4°C, then treated with pre-warmed
42
43 Krebs buffer or 1µM Aβ oligomers or monomers for 1, 5 or 10 min at 37°C. After treatment, cells were
44
45 washed with PBS and fixed in 4% p-formaldehyde for 20 min at room temperature. As an additional
46
47 control, a dish of untreated fluorescent antibody-labeled cells was kept on ice for the entire experiment.
48
49 Cells were imaged by confocal microscope.
50
51

52
53 **Confocal microscopy imaging:** Confocal microscopy was performed on a Leica SP5 laser-scanning
54
55 confocal microscope using 63 x 1.4 N.A. oil-immersion lens.
56
57

1
2
3
4 **Total internal reflection microscopy (TIRF) Imaging:** Time series experiment was performed using a
5
6 Leica DMI6000 B MC TIRF system with 63 x 1.4 NA or a 100 x 1.4 N.A. oil-immersion lens coupled
7
8 with temperature control chamber and a CCD camera (1000x1000, Hammamatsu 9100-02 EMCCD
9
10 camera). CF-10 cells were transfected with GFP-PrP^C [1.0 µg DNA, (Lee *et al.* 2001)], or co-transfected
11
12 with GFP-PrP^C and mCherry-Rab5 (1:0.5 µg DNA respectively, kindly provided by Dr. Stephen
13
14 Ferguson, University of Western Ontario) using Effectene (Qiagen), according to manufacturer's
15
16 instructions. HEK 293 cells were transfected with 3F4-PrP^C (1.0 µg of DNA) or co-transfected with 3F4-
17
18 PrP^C and mCherry-Rab5 (1:0.5 µg of DNA respectively) using modified calcium phosphate method
19
20 (Ferguson and Caron 2004). Forty-eight h after transfection, individual cells were imaged by TIRF
21
22 usually at 5-10 Hz. HEK 293 cells were incubated with Zenon Alexa Fluor 488/8H4 antibody complex
23
24 for 1 h at 4°C before analyses. After labeling, cells were warmed-up for at least 15 min to allow for
25
26 constitutive internalization of PrP^C, before imaging. Cells were treated with 1 µM Aβ oligomers and/or
27
28 500 µM Cu²⁺ during time series acquisition.
29
30

31
32 **Quantification of Fluorescence:** Image analysis and processing for confocal and TIRF images were
33
34 performed with Leica Application Suite Advanced Fluorescent Lite, Metamorph and Image J software.
35
36 Fluorescence intensity was quantified using the MetaMorph software. Total cell surface fluorescence for
37
38 each cell in the immunofluorescence experiments (Fig. 1) was measured and normalized by the area
39
40 analyzed. For the PrP^C internalization experiments (Fig. 5), the internal fluorescence of each cell was
41
42 measured, divided by the number of internalized fluorescent objects (vesicles) and normalized by the total
43
44 fluorescence at the cell surface. Images were thresholded, and the total fluorescence was detected
45
46 automatically and independently by the software. The results were expressed as the mean of normalized
47
48 fluorescence.
49

50
51 **TIRF analyses:** For the experiments in which PrP^C was labeled with fluorescent 8H4 antibodies, we
52
53 measured total fluorescence intensity in the TIRF images for individual cells for several minutes prior to
54
55 treatment with Aβ oligomers to estimate constitutive changes in fluorescence. We observed a small but
56
57 significant decay in fluorescence over time prior to Aβ-treatment, likely due to the constitutive
58
59
60

1
2
3 internalization of PrP^C. For quantification we estimated the degree of fluorescence loss during this period
4
5 using a linear equation and subtracted it from the values of fluorescence after treatment with A β
6
7 oligomers. We then measured fluorescence intensity in the beginning of A β -treatment (15 seconds after
8
9 addition of A β oligomers) and expressed fluorescence intensity as a percentage of this initial value. We
10
11 note that both in experiments with GFP-PrP^C as well as fluorescent labeling with 8H4, addition of A β
12
13 peptide caused a sharp increase in fluorescence (flash) that subsequently returned to normal levels
14
15 (movies 3 and 4). This flash is unlikely to reflect changes in localization of PrP^C as it occurred too fast, so
16
17 it possibly reflects movement of the cells. Therefore, all analyses were done 15 sec after the return of
18
19 fluorescence to normal levels.
20
21

22 **Statistical Analyses:** Statistical analyses were performed using Sigma Stat software. Results are
23
24 represented as mean \pm standard error of the mean (SEM) and the total number of experiments is specified
25
26 in each figure legend. Data were compared by Student's *t*-test or one-way ANOVA.
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Results

Previous experiments have implicated PrP^C as a binding partner for A β oligomers (Lauren *et al.* 2009; Gimbel *et al.* 2010; Chen *et al.* 2010; Calella *et al.* 2010). To further test if A β oligomers can initiate signal transduction events in cells in a PrP^C-dependent fashion, we used CF-10 cells and PrP3F4 cells; the former cell line is the parental PrP^C-deficient line derived from PrP^C-null mice and the latter represents CF-10 cells reconstituted with PrP^C using a mouse construct bearing the 3F4 epitope (Caetano *et al.* 2008). One of the reported effects of A β peptides in cellular signalling is activation and phosphorylation of ERK1/2 (Ghribi *et al.* 2003; Chong *et al.* 2006; Ma *et al.* 2007), hence we tested if this effect is dependent on PrP^C expression. ERK1/2 phosphorylation is not altered upon CF-10 cells treatment with A β (Fig. 1B), whereas PrP3F4 cells had a rapid increase in ERK1/2 phosphorylation that reached maximum at 5 min (Fig. 1A), suggesting that some signalling pathways can be activated by A β peptides in a PrP^C-dependent way.

Binding of A β oligomers affects the endocytosis and cell surface localization of several of its binding partners, including a number of receptors (Snyder *et al.* 2005; Almeida *et al.* 2005; Zhao *et al.* 2008; De Felice *et al.* 2009; Young *et al.* 2009). To test if A β oligomers altered the localization of PrP^C at the cell surface, our initial experiment involved treating PrP3F4 cells for 1, 5 or 10 min with A β oligomers then imaging them by immunofluorescence under non-permeabilizing conditions. Surprisingly, we found a rapid, time-dependent increase in PrP^C fluorescence at the cell surface following treatment with A β oligomers (Fig. 2A); within 1 min, localization of PrP^C at the cell surface was significantly greater than control. Quantification of the fluorescence at the cell surface revealed an increase of more than 2-fold at 5 min exposure to A β oligomers (Fig. 2B). Importantly, A β monomers did not alter the localization of PrP^C at the plasma membrane (Fig. 2A and 2B) indicating that this effect is related to oligomeric forms of A β .

To further confirm this result we performed a second set of experiments where we analysed cell surface PrP^C levels by flow cytometry using PrP3F4 cells that were incubated with 3F4 antibodies in non-

1
2
3 permeabilizing conditions (Caetano *et al.* 2008). This analysis also indicates an increase of PrP^C at the
4 cell surface within 1 min after treatment with A β oligomers (Fig. 2C). We also performed cell surface
5 biotinylation experiments in PrP3F4 cells (Caetano *et al.* 2008) and again, treatment of cells with A β
6 oligomers for only 1 min increased PrP^C levels at the plasma membrane (Fig. 2D). Taken together, our
7 data from immunofluorescence, flow cytometry and membrane biotinylation experiments strongly
8 suggest that treatment of cells with A β oligomers rapidly increases PrP^C at the cell surface.
9

10
11 To further investigate cell surface expression and early endocytic trafficking of PrP^C in cells, we
12 took advantage of total internal reflection (TIRF) microscopy and live cell imaging. TIRF microscopy
13 allows for high resolution imaging of events up to 200 nm from the coverslip interface due to the
14 generation of an evanescent field when a laser is directed in a critical angle through the specimen. CF-10
15 cells were transfected with GFP-PrP^C (Lee *et al.* 2001) and trafficking of PrP^C followed over time. Using
16 TIRF microscopy, we could easily detect GFP-PrP^C at the cell surface and also early endocytic vesicles
17 labelled with mCherry-Rab5 that co-localized with some GFP-PrP^C-positive vesicles (Fig. 3A, arrows),
18 similar to previously published work (Magalhaes *et al.* 2002;Sunyach *et al.* 2003;Brown and Harris
19 2003). We first tested if treatment with Cu²⁺, which effectively increases the internalization of PrP^C
20 (Pauly and Harris 1998;Lee *et al.* 2001;Perera and Hooper 2001;Magalhaes *et al.* 2002), allowed for TIRF
21 imaging of PrP^C endocytosis. Still images (Fig. 3B) and live cell imaging movies (Movie 1) confirm the
22 fast disappearance of GFP-PrP^C from the cell surface and its increased localization to endocytic vesicles
23 upon exposure to Cu²⁺, as described previously using confocal microscopy (Lee *et al.* 2001;Magalhaes *et*
24 *al.* 2002).
25

26
27 GFP-PrP^C transfected cells were treated with A β oligomers, then imaged (Fig. 3C). Surprisingly,
28 treatment with A β oligomers increased the fluorescence of GFP-PrP^C close to the cell surface and also at
29 the cell surface (Fig. 3C arrows). A number of clusters/vesicles of GFP-PrP^C appeared close to the
30 cell/coverslip interface (150 nm) and there was an increase in the fluorescence of clusters that were
31 already at the membrane prior to the treatment with A β oligomers. Interestingly, some of these
32 clusters/vesicles increased first at 200 nm from the cell/coverslip interface, and within a few sec they
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 began to appear closer to the cell membrane (110 nm), suggesting that rather than reflecting internalized
4
5 GFP-PrP^C they reflect vesicles that are moving towards the membrane (Supplemental Fig. 1).
6

7
8 These experiments with GFP-PrP^C suggest that A β oligomers may recruit PrP^C and increase
9
10 fluorescence in clusters located at the plasma membrane. We used a second experimental approach to
11
12 further test this possibility by following PrP^C movement using a fluorescently-labelled antibody (8H4,
13
14 which recognizes amino acids 140-180 of PrP^C, away from the A β binding sites). For these experiments,
15
16 we took advantage again of TIRF microscopy, but instead of PrP3F4 cells we used HEK 293 cells as they
17
18 have a larger proportion of plasma membrane in contact with the coverslip and therefore afforded better
19
20 TIRF imaging. We labelled PrP^C-3F4 transfected HEK 293 cells on ice for 60 min with fluorescently-
21
22 labelled 8H4 antibody, after that we warmed the cells at 37°C for 15-25 min to allow constitutive PrP^C
23
24 internalization prior to image them. Fig. 4A shows antibody labelled PrP^C diffusely at the cell surface and
25
26 in clusters. Some of these clusters are likely to be PrP^C in coated-pits or in early endocytic vesicles; the
27
28 latter are positive for mCherry-Rab 5, similar to our observations in the experiments with GFP-PrP^C
29
30 [compare Fig. 3A and 4A, movie 2 and see (Magalhaes *et al.* 2002)]. Importantly, antibody labelled PrP^C
31
32 was also internalized in living cells in response to Cu²⁺ (Fig. 4B) indicating that 8H4 binding did not
33
34 disturb PrP^C trafficking.
35
36

37
38 After establishing that 8H4 binding to PrP^C did not cause major disturbances to PrP^C localization,
39
40 we used antibody labelled-PrP^C to further investigate the effects of A β oligomers. TIRF images showed a
41
42 small decrease in cell surface fluorescence over time prior to addition of any of the treatments, which
43
44 likely indicates some constitutive internalization of antibody bound PrP^C (Supplemental Fig. 2). This is in
45
46 agreement with the constitutive cycling for PrP^C described previously (Shyng *et al.* 1993; Shyng *et al.*
47
48 1994; Magalhaes *et al.* 2002). Live cell movies show that immediately upon the addition of A β oligomers,
49
50 there is a rapid and sharp increase in the overall fluorescence that is likely an artefact as the level of
51
52 fluorescence quickly returns to baseline and a similar “flash” was observed with the addition of A β
53
54 monomers (Movie 3 and Movie 4). It should be noted that it is difficult to ensure that some A β monomers
55
56 did not undergo oligomerization during preparation of the samples, and indeed HPLC analysis of freshly
57
58
59
60

1
2
3 prepared A β monomer aliquots suggests that a small amount of oligomers were present (data not shown).
4
5 However, because this sharp increase in fluorescence occurred immediately upon addition of A β peptides
6
7 and the levels of fluorescence returned almost immediately to baseline, we consider it unlikely that this
8
9 reflects an increase in cell surface expression of PrP^C. It is also possible that this flash is due to movement
10
11 of the cells as similar flashes were observed in GFP-PrP^C-transfected cells. We therefore examined cells
12
13 only after the fluorescence had stabilized which was usually 15 sec after the addition of A β peptides.
14
15

16 Still images (Fig. 4C) and live cell movies (Movie 5) show that cell surface fluorescence
17
18 increased steadily in cells treated with A β oligomers. Similar to the results using GFP-PrP^C, we noted an
19
20 increase in the number of clusters at the cell surface and also an increased fluorescence in existing
21
22 clusters (arrowheads). These clusters are likely to be a mixture of vesicles moving to the membrane and
23
24 PrP^C located in specific membrane domains possibly rafts, as previously described (Sunyach *et al.* 2003).
25
26 We quantified the fluorescence at the membrane of cells and compared this to the fluorescence intensity
27
28 prior to the treatment with A β oligomers; we detected a variable increase in membrane fluorescence in 15
29
30 of the 16 cells studied (Fig. 4D). Importantly this effect was not seen in cells not treated with A β
31
32 oligomers (Supplemental Figure 3). These experiments suggest that treatment with A β causes a fast
33
34 increase in the localization of PrP^C at the cell surface, with an increase in clustered/vesicular structures
35
36 that could be imaged within the evanescent field close to 110 nm from the coverslip. Since PrP^C cycles
37
38 via endocytic compartments and is then delivered back to the plasma membrane (Shyng *et al.* 1993; Shyng
39
40 *et al.* 1994), some of these clusters may reflect vesicles of previously internalized PrP^C enroute to the cell
41
42 surface.
43
44
45

46 In addition to the possibility that PrP^C recruitment to the membrane is increased by A β oligomers,
47
48 we cannot exclude the possibility that A β oligomer binding to PrP^C could decrease the constitutive
49
50 internalization of the GPI-anchored protein. Because PrP^C is constantly cycling, inhibition of constitutive
51
52 endocytosis would effectively contribute to the increase in PrP^C localization at the cell surface. Although
53
54 it has been determined that A β oligomers bind to amino acids 90-105 in PrP^C (Lauren *et al.* 2009), recent
55
56 data have uncovered a second binding site involving amino acids 23-27; both domains are in an
57
58
59
60

1
2
3 unstructured region of the N-terminus of PrP^C (Chen *et al.* 2010). Remarkably, the PrP^C region bearing
4 amino acids 23-27 is critical for both constitutive (Sunyach *et al.* 2003) and Cu²⁺-induced sequestration of
5 PrP^C (Taylor *et al.* 2005). Therefore, PrP^C endocytosis could be disturbed by the binding of A β oligomers,
6 leading to accumulation of PrP^C at the cell surface. To test this possibility, we used confocal microscopy
7 and quantified antibody-labelled PrP^C internalization in the presence of A β oligomers in PrP3F4 cells
8 (Fig. 5). Cells were labelled for 1 h with 8H4-fluorescently labelled antibodies on ice and then warmed to
9 37°C for 1, 5 or 10 min in the presence or absence of A β oligomers or monomers. Cells were then *p*-
10 formaldehyde-fixed and total fluorescence in endocytic vesicles was quantified. During the first min of
11 constitutive internalization, we were unable to detect early endocytic vesicles that were positive for 8H4
12 antibodies under any of the conditions tested. However, after 5 and 10 min both in control conditions and
13 upon treatment with A β monomers, we detected internalized 8H4 antibodies (Fig. 5A and B).
14 Interestingly, in cells treated with A β oligomers internalization of PrP^C bound to 8H4 fluorescently-
15 labelled antibodies was significantly decreased both at 5 and 10 min. Overall, treatment with A β
16 oligomers decreased internalization of PrP^C by about 50% (Fig. 5B). These experiments suggest that A β
17 oligomers block the constitutive internalization of PrP^C under the present experimental conditions.
18 Moreover, although constitutive endocytosis of PrP^C is disturbed by A β oligomers, its Cu²⁺-evoked
19 internalization monitored by GFP-PrP^C using TIRF microscopy did not seem to be affected (Supplemental
20 Figure 4).
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41

42 Discussion

43
44 The present experiments show that in contrast to what would be predicted based on the effects of
45 A β peptides on a number of receptors (Snyder *et al.* 2005; Zhao *et al.* 2008; De Felice *et al.* 2009) and on
46 the discovery of PrP^C as a binding partner of A β oligomers (Cisse and Mucke 2009), PrP^C does not
47 undergo internalization upon exposure to A β . We used a combination of techniques, including live cell
48 microscopy to test the hypothesis that PrP^C internalization would be increased by A β oligomers. Our data
49 show that contrary to our initial expectation, binding of A β oligomers to PrP^C increased cell surface
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 localization of the latter. This effect may reflect two complementary mechanisms: inhibition of
4
5 constitutive endocytosis of PrP^C; and increased PrP^C recruitment from endocytic compartments.
6

7
8 Trafficking of PrP^C has been suggested to have key roles in both physiological and pathological
9
10 functions for this protein (Shyng *et al.* 1994;Prado *et al.* 2004). Conversion of PrP^C to PrP^{Sc} likely occurs
11
12 in an endocytic compartment (Caughey and Raymond 1991) and PrP^{Sc} accumulates in Rab7-positive late
13
14 endosomes/lysosomes (Magalhaes *et al.* 2005;Marijanovic *et al.* 2009;Jen *et al.* 2010). PrP^C trafficking
15
16 has received considerable attention as treatments that changes the localization of PrP^C may also change
17
18 conversion to PrP^{Sc} (Gilch *et al.* 2001).
19

20
21 It is increasingly recognized that understanding the physiological functions of PrP^C may have
22
23 important consequences not only for understanding prion diseases, but also for understanding AD (Linden
24
25 *et al.* 2008;Hooper and Turner 2008). There is clear interaction in relation to pathology between the
26
27 misfolded proteins that cause Alzheimer's and prion diseases, since animal models of AD shown
28
29 enhanced pathology and have increased levels A β when infected with prions (Baier *et al.* 2008;Morales
30
31 *et al.* 2010). Moreover, PrP^C regulates the processing of APP (Parkin *et al.* 2007;Hooper and Turner 2008),
32
33 and A β appears to use PrP^C as a receptor to disturb synaptic plasticity in neurons and affect memory in a
34
35 mouse model of AD (Lauren *et al.* 2009;Gimbel *et al.* 2010). However, a recent report questions the role
36
37 of PrP^C in the LTP deficits in a different animal model of AD (Calella *et al.* 2010). In spite of this, it is
38
39 well established that A β binds to PrP^C (Lauren *et al.* 2009;Balducci *et al.* 2010;Chen *et al.* 2010;Calella
40
41 *et al.* 2010). Our data on ERK1/2 activation, one of the signalling pathways associated with the effects of
42
43 A β oligomers (Dineley *et al.* 2001;Ghribi *et al.* 2003;Chong *et al.* 2006;Ma *et al.* 2007), support a role for
44
45 PrP^C in A β -mediated signalling, since a PrP^C-deficient cell line does not respond to A β oligomers.
46
47

48
49 A major finding in the present work is that, contrary to what has been anticipated, A β oligomers
50
51 do not trigger PrP^C internalization. In fact, A β oligomers increased PrP^C at the cell surface. Albeit the
52
53 mechanisms involved in A β oligomer changes in trafficking of PrP^C at this time are not entire clear, they
54
55 seem to involve both, a recruitment of intracellular PrP^C, as well as an inhibition of constitutive PrP^C
56
57 endocytosis. These observations resemble those of recent experiments showing that A β oligomers may
58
59
60

1
2
3 scaffold metabotropic glutamate receptors at the cell surface of neurons and change their diffusion
4
5 behaviour to alter cellular signalling and intracellular Ca^{2+} homeostasis (Renner *et al.* 2010).
6

7
8 The concept of PrP^C acting as a receptor is not new (Martins *et al.* 2002;Prado *et al.* 2004;Linden
9
10 *et al.* 2008) and several ligands for PrP^C with agonist-like effects have been described, including STII,
11
12 laminin- γ chain and vitronectin (Graner *et al.* 2000a;Graner *et al.* 2000b;Chiarini *et al.* 2002;Zanata *et al.*
13
14 2002;Lopes *et al.* 2005;Hajj *et al.* 2007). But PrP^C is a GPI-anchored protein, and as such it may need to
15
16 interact and modulate other receptors to transduce extracellular signals leading to intracellular activation.
17
18 It has been demonstrated that A β interacts with several other proteins such as $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine
19
20 receptors (Wang *et al.* 2000) and metabotropic glutamate receptor 5 (Renner *et al.* 2010), two receptors
21
22 that we identified recently as partners used by PrP^C to translate extracellular signals from the ligands STII
23
24 (Beraldo *et al.*, submitted, a) and laminin (Beraldo *et al.*, submitted b), respectively. It is not known at
25
26 present if these receptors have a role in modulating the effects of A β oligomers in conjunction with PrP^C.
27
28

29
30 One of the mechanisms that we identified as contributing to the increase in PrP^C localization at
31
32 the cell surface is inhibition of constitutive PrP^C endocytosis. This effect of A β oligomers is likely to arise
33
34 from its interaction with the N-terminal endocytic motif of PrP^C localized to amino acids 23-28 and future
35
36 experiments will be needed to address that. The binding of A β oligomers with this domain may affect the
37
38 PrP^C interaction and internalization mediated by lipoprotein-related receptor-related protein 1 (LPR1)
39
40 (Taylor and Hooper 2007;Parkyn *et al.* 2008). The second possibility raised by our experiments is that A β
41
42 oligomer treatment increases the recycling of PrP^C to the membrane. We were not able to detect fusion of
43
44 PrP^C containing vesicles to the plasma membrane, but we detected an increase in PrP^C fluorescent clusters
45
46 upon treatment with A β oligomers. PrP^C recycles rapidly to and from the cell surface (Shyng *et al.* 1993),
47
48 and perhaps this increased fluorescence that we observed in cell surface clusters may reflect the delivery
49
50 of PrP^C to the membrane coupled with inhibition of its subsequent internalization. Alternatively, based on
51
52 the fact that we detected an increase in PrP^C-positive vesicles further from the plasma membrane (at 200
53
54 nm) prior to their appearance nearer to the membrane (at 110 nm), PrP^C-positive vesicles may be
55
56
57
58
59
60

1
2
3 recruited to the cell surface in response to signalling induced by A β oligomers. This latter possibility
4
5 requires further investigation.
6

7
8 In summary, the physiological consequences of the increased PrP^C recruitment to the cell surface
9
10 induced by A β oligomers remains to be established, but it is known that PrP^C can signal both to protect
11
12 and to damage cells (Linden *et al.* 2008). The hypothesis that PrP^C functions as a scaffold protein to
13
14 assemble signalling complexes at the cell surface provides a framework to understand how distinct
15
16 binding partners of PrP^C can trigger selected signalling activities to influence neuronal function. A β
17
18 oligomers may corrupt some of the signalling activities of PrP^C, either by increasing the levels of
19
20 signalling, causing ectopic activation of signalling complexes, or by inducing novel signalling modalities.
21
22 Hence, the increased localization of PrP^C at the cell surface may contribute to a disturbance of neuronal
23
24 communication and plasticity.
25
26
27
28

29
30 **Acknowledgements:** This work was supported by the Canadian Foundation for Innovation (CFI)
31
32 (M.A.M.P. and V.F.P.), PrionNet-Canada (M.A.M.P., V.R.M. and V.F.P.), CIHR (R.J.R, V.F.P. and
33
34 M.A.M.P.) and FAPESP-Brazil (V.R.M. and M.A.M.P.) and Programa Institutos Nacionais de Ciência e
35
36 Tecnologia, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/MCT) (V.R.M.).
37
38 F.A.C. and A.L.G. received a fellowships from CNPq. F.H.B received a fellowship from DFAIT-Canada.
39
40 I.S was supported by a CAPES fellowship and a partial fellowship from DFAIT (ELAP program).
41
42 V.R.M. is an International Scholar of the Howard Hughes Medical Institute. We are indebted to Stephen
43
44 Ferguson (University of Western Ontario) for the Rab5 construct, Roger Morris (King's College London)
45
46 for the original PrP-3F4 constructs and Suzette A. Priola (NIAID-RML) for CF-10 cells. We would like
47
48 to acknowledge the help of Lianne Dale from the London Regional Cell & *In Vitro* Molecular Imaging
49
50 Facility for initial help with TIRF microscopy.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

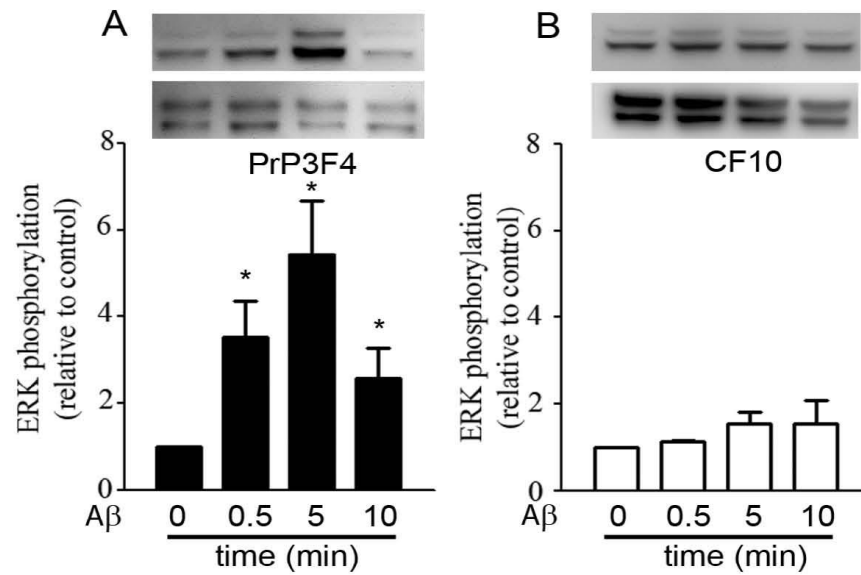


Figure 1 – A β oligomers induce ERK1/2 phosphorylation in a PrP^C-dependent way. (A-B) PrP3F4 and CF-10 cells were treated with A β oligomers (1 μ M) for 0.5, 5 and 10 min respectively. Relative levels of ERK1/2 activity represent the ratio between phosphorylated ERK1/2 and total ERK1/2, normalized to the untreated group (0 min). The results show the mean \pm SEM of four independent experiments for PrP3F4 cells and three for CF-10 cells analyzed and compared by one-way ANOVA and Dunn's Method post-hoc test. *Denotes statistical significance when compared to control cells without treatment, $p < 0.05$.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

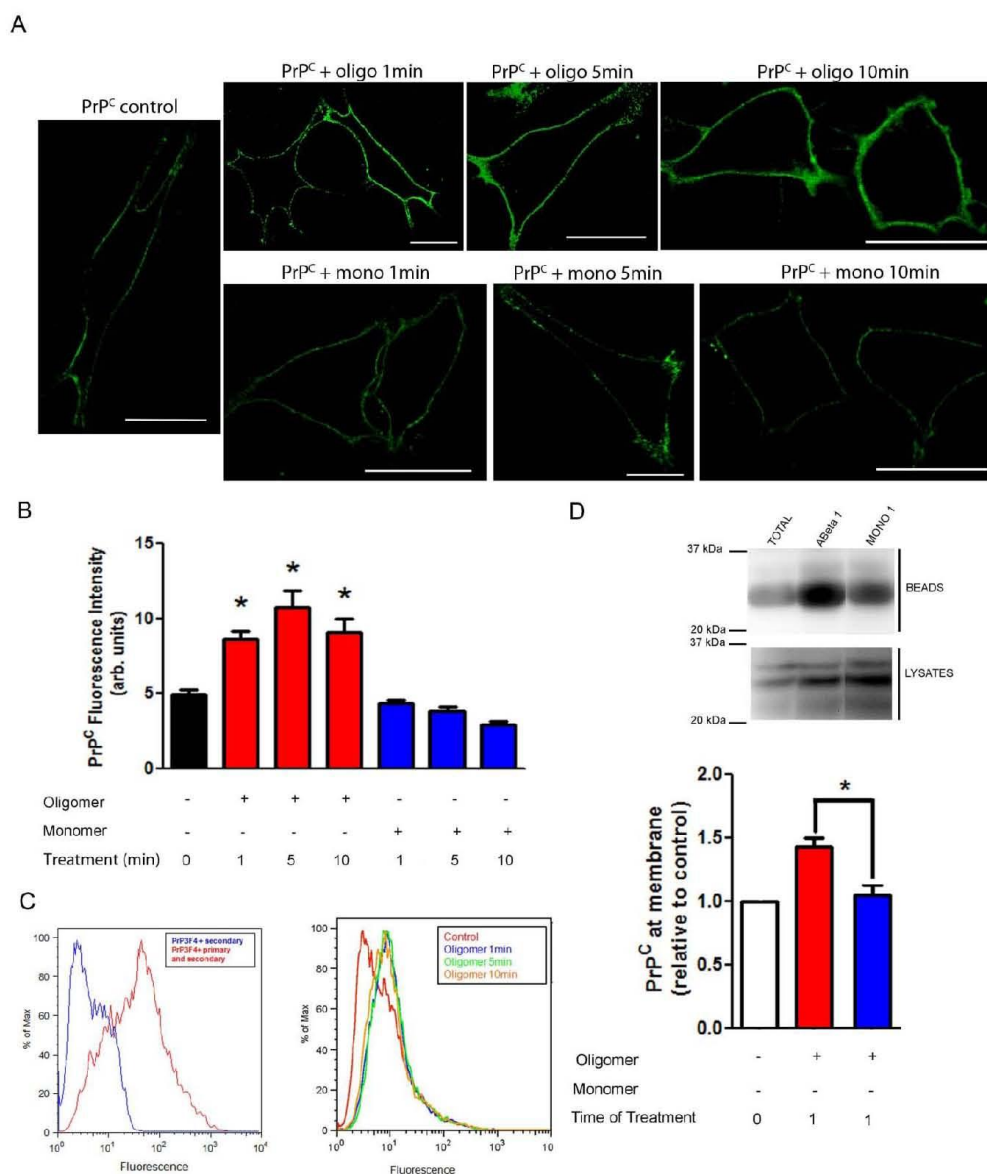
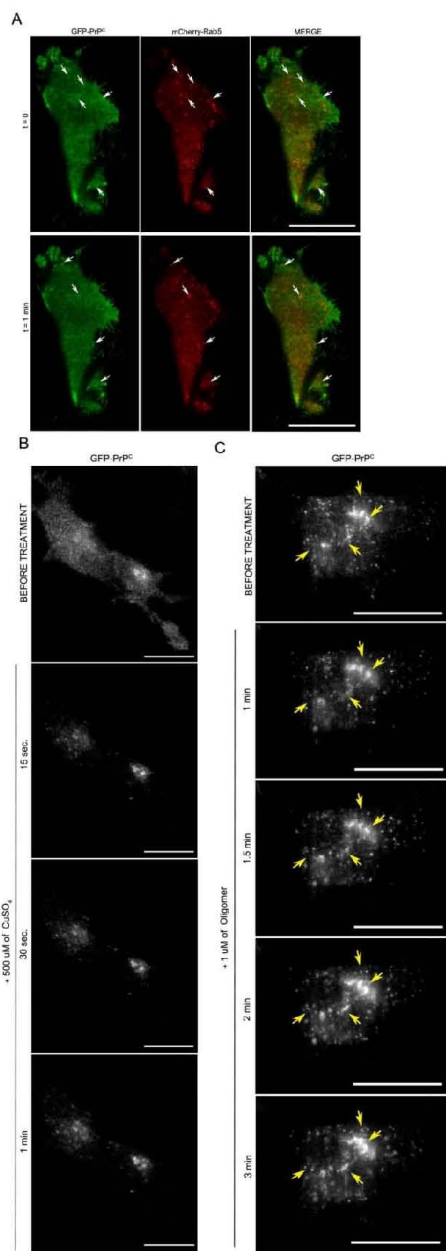


Figure 2 – A β oligomers increase PrP^C at cell surface. **A**, PrP3F4 cells were treated with A β oligomers or monomers (1 μ M) at different time points (1, 5 and 10 min). Cells were fixed and the amount of PrP^C at the cell surface was detected through immunofluorescence and quantified using the Metamorph software (**B**). The results show the mean \pm SEM of 4 independent experiments. Results were compared by one-way

1
2
3 ANOVA and Dunn's Method post-hoc test. *Denotes statistical significance when compared to control
4 and cells treated with monomers, $p < 0.001$. A minimum of 50 cells per group was analyzed. (C) Flow
5 cytometry assay from PrP3F4 cells treated (right panel) or not (left panel) with $1 \mu\text{M}$ of A β oligomers for
6 1, 5 and 10 min. Cells were incubated with anti-PrPC mouse serum followed by Alexa-fluor 488 labeled
7 anti-mouse IgG (both panels) or only with Alexa-fluor 488 labeled anti-mouse IgG (secondary, left
8 panel). (D) Cell-surface PrP^C was detected by biotinylation of cell-surface proteins after treatment of
9 PrP3F4 cells with A β oligomers or monomers for 1 min. Biotinylated proteins were isolated using
10 Neutravidin beads, subjected to SDS-PAGE, and immunoblotted using a mouse anti-PrP^C antibody. The
11 lysates represent the expression of PrP3F4 protein and beads represent biotinylated cell-surface PrP^C after
12 treatment with A β or Krebs buffer (Total control). In this representative blot the lane showing the
13 monomer treatment was cut from another part of the gel and pasted closer to that of oligomers for
14 comparison. The results in the graph show the mean \pm SEM of six independent experiments. *Denotes
15 statistical significance when compared to cells treated with monomers, $p < 0.026$. Scale bars, $20 \mu\text{m}$.
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

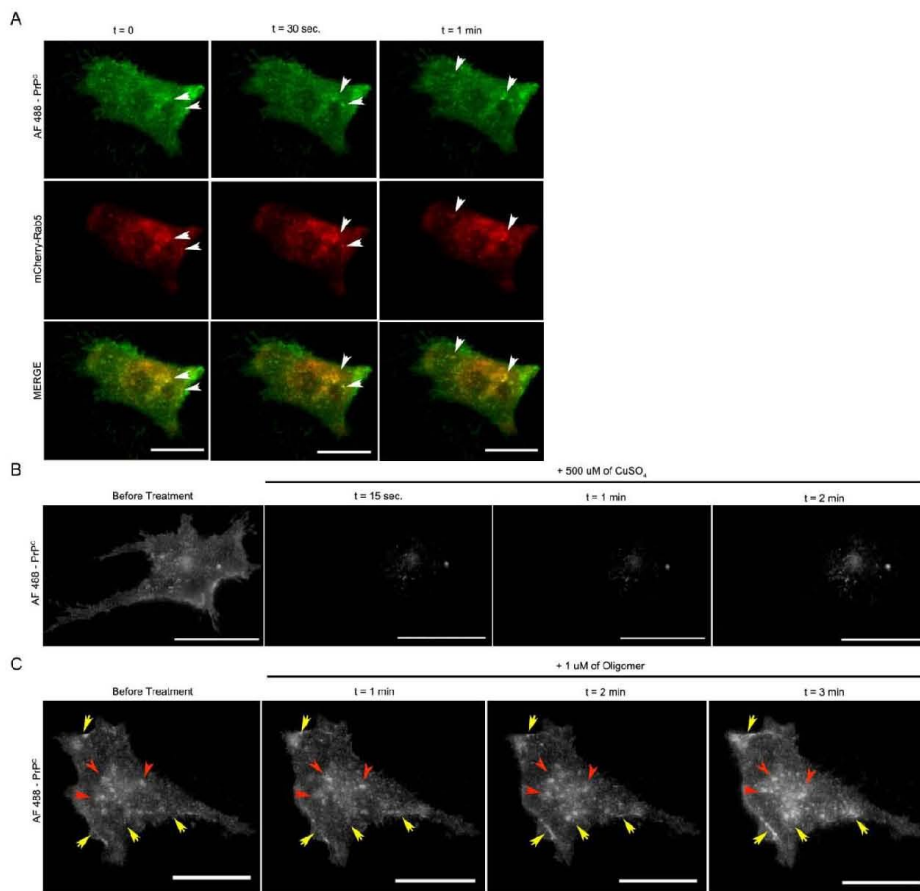


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 3: A β Oligomers increase GFP-PrP^C at cell surface in CF-10 cells. (A) Representative TIRF image of CF-10 cells transfected with GFP-PrP^C and mCherry-Rab5 (depth of the evanescent field set at 110 nm) at time 0 and 1 min of imaging. Arrows indicate vesicles colocalizing with Rab5. (B) CF-10 cells transfected with GFP-PrP^C were treated with Cu²⁺ and movement of PrP^C was followed using time-lapsing images. (C) CF-10 cells transfected with GFP-PrP^C were treated with A β oligomers and PrP^C was followed in time-lapsing movies (dept of the evanescent field set at 150 nm). Arrows point to clusters of fluorescence that change upon treatment with A β oligomers. Scale bars, 20 μ m.

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Cells Treated with 1 μM of Aβ Oligomers - % of fluorescence increase at cell surface

| TIME | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | L | M | N | O | P | Q |
|--------|-----|----|-----|-----|----|-----|-----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| 1 MIN | 12 | 1 | -85 | 17 | 13 | -17 | -17 | 15 | 2 | 30 | 26 | -10 | 21 | 42 | 62 | 296 |
| 2 MIN | 48 | 16 | -86 | 13 | 38 | -17 | -10 | 24 | 7 | 40 | 73 | -7 | 45 | 88 | 75 | 293 |
| 3 MIN | 138 | 21 | 3 | 51 | 37 | -17 | 3 | 26 | 10 | 99 | 115 | 43 | 58 | 184 | 212 | 613 |
| 4 MIN | | 37 | -12 | 162 | 48 | 17 | 50 | 44 | 42 | 138 | 124 | 85 | 82 | 213 | 449 | 1561 |
| 5 MIN | | | | 197 | 62 | 40 | 240 | 59 | 23 | 155 | 122 | 223 | 125 | 262 | 507 | 1722 |
| 6 MIN | | | | 278 | 44 | 46 | 162 | 66 | 33 | 183 | 128 | 346 | 189 | 321 | 508 | 1657 |
| 7 MIN | | | | | | | 180 | 69 | 64 | 235 | 121 | 443 | 195 | 306 | 547 | 1517 |
| 8 MIN | | | | | | | | | 88 | 314 | 107 | 453 | 221 | 256 | 527 | 1422 |
| 9 MIN | | | | | | | | | | | 94 | 430 | 226 | 288 | 447 | 1541 |
| 10 MIN | | | | | | | | | | | | | 218 | 315 | 516 | 1841 |

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 4 – A β oligomers increase PrP^C at cell surface in HEK 293 cells. (A) PrP-3F4 and mCherry-Rab5 transfected HEK 293 cells were labelled on ice with a fluorescent PrP^C antibody (8H4) and were then warmed-up and imaged. Arrows point to some of the vesicles positive for both PrP^C and Rab 5. (B) PrP-3F4 transfected HEK 293 cells were labelled as in A, and then treated with Cu²⁺. (C) As in B, but cells were treated with A β oligomers. Arrows point for an increase in the number of clusters at the cell surface and arrowheads for increased fluorescence in existing clusters. (D) Quantification of plasma membrane fluorescence in cells treated with A β oligomers. 14 of 16 cells examined showed increase in fluorescence intensity at the plasma membrane over time upon treatment with A β oligomers. Scale bars, 20 μ m; depth of the evanescent field set at 150nm.

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

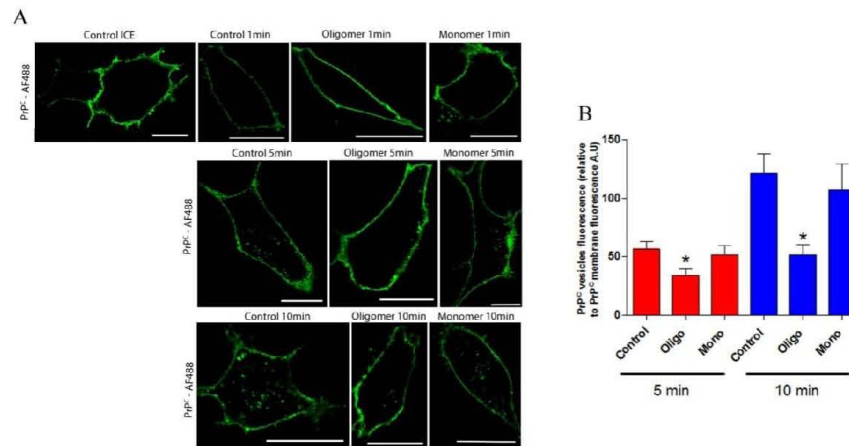
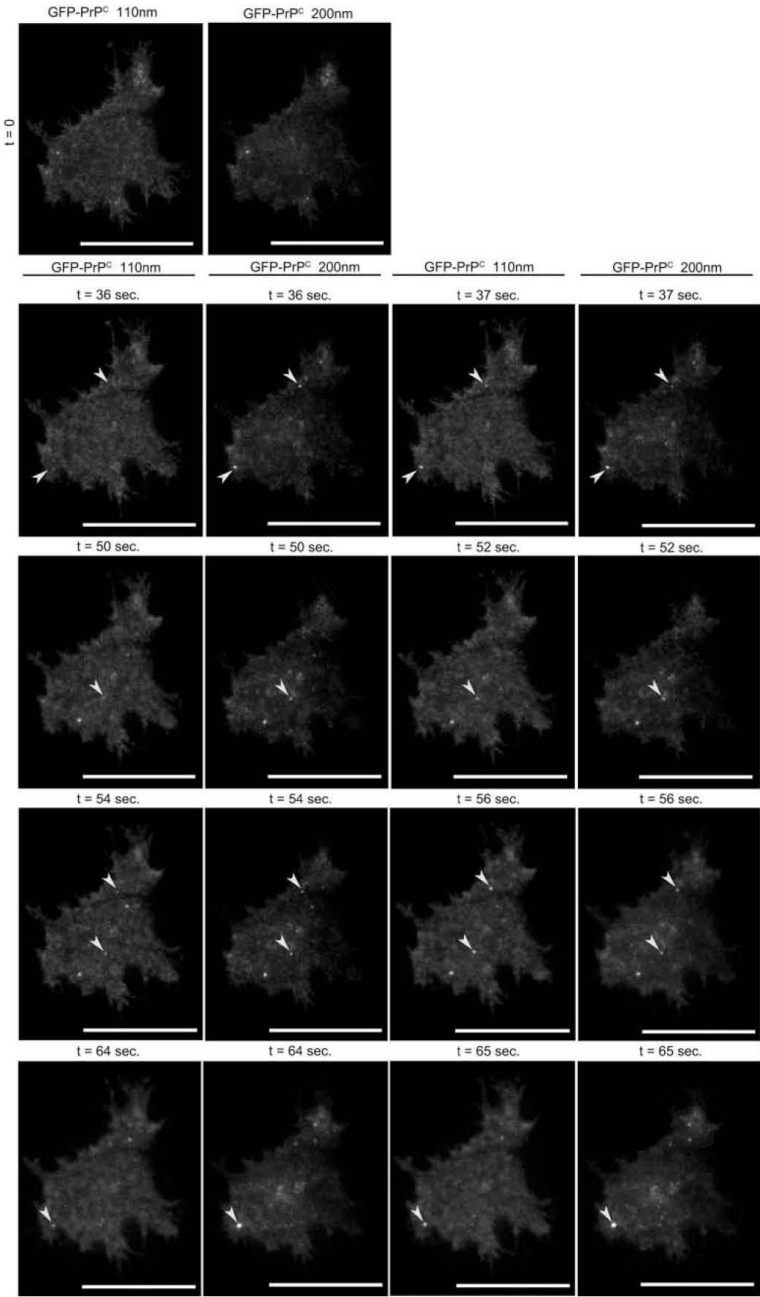


Figure 5 - A β oligomers block constitutive endocytosis of PrP^C. (A) PrP3F4 cells were previously labelled with anti-PrP^C 8H4 conjugated with Zenon Alexa Fluor 488 reagent. Cells were then treated with A β oligomers or monomers (1 μ M) for 1, 5 or 10 min at 37°C. (B) Endocytic trafficking of PrP^C was evaluated by the proportion of internalized vesicles normalized by the cell surface fluorescence. A β oligomers but not monomers seem to decrease the constitute internalization of PrP^C. The results show the mean \pm SEM of relative fluorescence. A minimum of 30 cells per group were analyzed.*Denotes statistical significance when compared to control and cells treated with monomers, $p < 0.002$ for 5 min group and $p < 0.001$ for the 10 min group. One-way ANOVA and Dunn's Method post-hoc test. Scale bars, 20 μ m.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

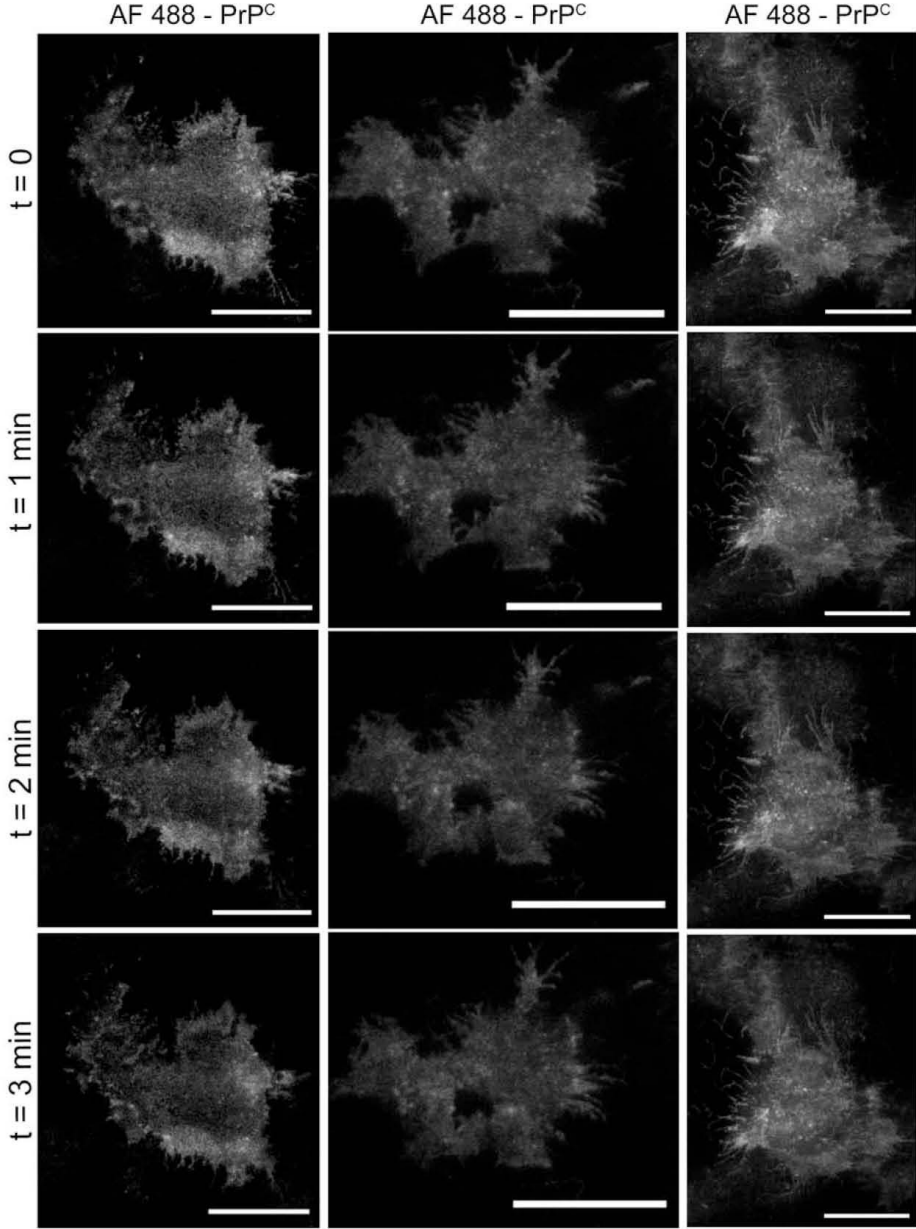


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Supplemental 1 – CF-10 cells transfected with GFP-PrP were treated with A β oligomers and followed by time lapping images in two different depts. (110 and 200 nm). The first row indicates cells before the treatment. Arrow heads point to vesicles which showed up first at 200 nm and then in 110 nm. Note that in TIRF microscopy when vesicles become more fluorescent closer to the plasma membrane is indicative that they are moving towards the coverlip. Scale bars, 20 μ m.

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

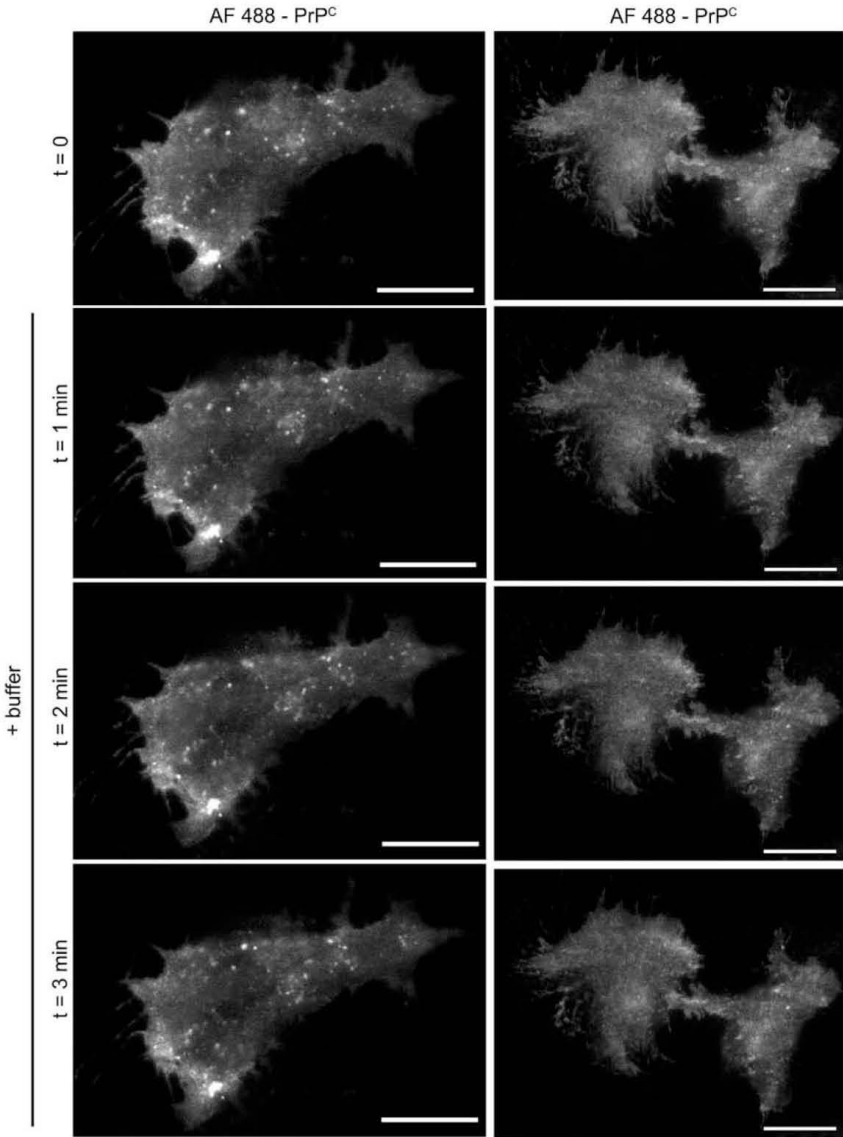


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Supplemental Figure 2 – PrP-3F4 transfected HEK 293 cells were labelled on ice with a fluorescent PrP^C antibody (8H4) and were then warmed-up and imaged for 3 minutes. The image shows 3 distinct cells. Note that cell surface fluorescence was stable during 3 min imaging, and if anything decreased with time. Scale bars, 20 μ m; depth = 150nm.

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

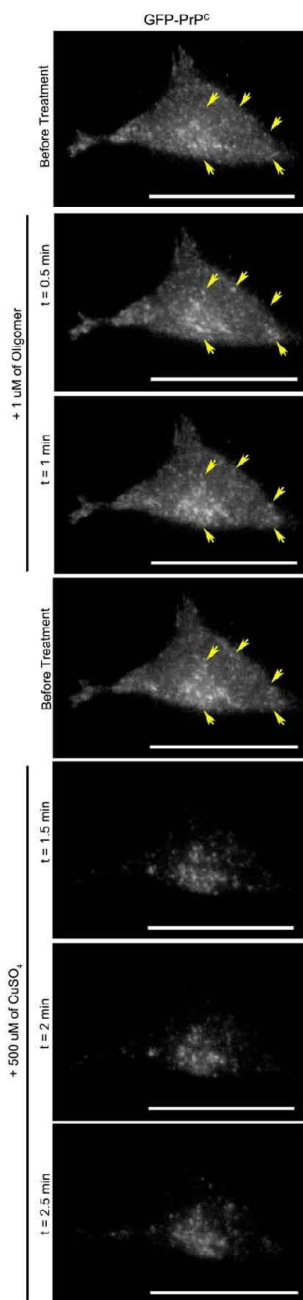


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Supplemental Figure 3 – PrP-3F4 transfected HEK 293 cells were labelled on ice with a fluorescent PrP^C antibody (8H4) and were then warmed-up and imaged for 3 minutes after addition of buffer. Note that fluorescence decreases slightly during the time-course experiment. Scale bars, 20 μ m; depth = 150nm.

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Supplemental Figure 4 – CF-10 cells transfected with GFP-PrP^C and were treated with A β oligomers, followed during 1 minute by time lapsing images and then were treated with Cu²⁺. Scale bars, 20 μ m; depth = 150 nm.

Reference List

- Almeida C. G., Tampellini D., Takahashi R. H., Greengard P., Lin M. T., Snyder E. M. and Gouras G. K. (2005) Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses. *Neurobiol. Dis.* **20**, 187-198.
- Baier M., Apelt J., Riemer C., Gultner S., Schwarz A., Bamme T., Burwinkel M. and Schliebs R. (2008) Prion infection of mice transgenic for human APPSwe: increased accumulation of cortical formic acid extractable A β (1-42) and rapid scrapie disease development. *Int. J. Dev. Neurosci.* **26**, 821-824.
- Balducci C., Beeg M., Stravalaci M., Bastone A., Scip A., Biasini E., Tapella L., Colombo L., Manzoni C., Borsello T., Chiesa R., Gobbi M., Salmona M. and Forloni G. (2010) Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **107**, 2295-2300.
- 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.
- Caetano F. A., Lopes M. H., Hajj G. N., Machado C. F., Pinto A. C., Magalhaes A. C., Vieira M. P., Americo T. A., Massensini A. R., Priola S. A., Vorberg I., Gomez M. V., Linden R., Prado V. F., Martins V. R. and Prado M. A. (2008) Endocytosis of prion protein is required for ERK1/2 signaling induced by stress-inducible protein 1. *J. Neurosci.* **28**, 6691-6702.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- Calella A. M., Farinelli M., Nuvolone M., Mirante O., Moos R., Falsig J., Mansuy I. M. and Aguzzi A. (2010) Prion protein and Abeta-related synaptic toxicity impairment. *EMBO Mol. Med.*
- Caughey B. and Baron G. S. (2006) Prions and their partners in crime. *Nature* **443**, 803-810.
- Caughey B. and Raymond G. J. (1991) The Scrapie-Associated Form of Prp Is Made from A Cell-Surface Precursor That Is Both Protease-Sensitive and Phospholipase-Sensitive. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 18217-18223.
- Chen S., Yadav S. P. and Surewicz W. K. (2010) Interaction between human prion protein and A{beta} oligomers: the role of N-terminal residues. *J. Biol. Chem.*
- 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.
- Chong Y. H., Shin Y. J., Lee E. O., Kaye R., Glabe C. G. and Tenner A. J. (2006) ERK1/2 activation mediates Abeta oligomer-induced neurotoxicity via caspase-3 activation and tau cleavage in rat organotypic hippocampal slice cultures. *J. Biol. Chem.* **281**, 20315-20325.
- Cisse M. and Mucke L. (2009) Alzheimer's disease: A prion protein connection. *Nature* **457**, 1090-1091.
- Cleary J. P., Walsh D. M., Hofmeister J. J., Shankar G. M., Kuskowski M. A., Selkoe D. J. and Ashe K. H. (2005) Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat. Neurosci.* **8**, 79-84.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- Coitinho A. S., Freitas A. R., Lopes M. H., Hajj G. N., Roesler R., Walz R., Rossato J. I., Cammarota M., Izquierdo I., Martins V. R. and Brentani R. R. (2006) The interaction between prion protein and laminin modulates memory consolidation. *Eur. J. Neurosci.* **24**, 3255-3264.
- Coitinho A. S., Lopes M. H., Hajj G. N., Rossato J. I., Freitas A. R., Castro C. C., Cammarota M., Brentani R. R., Izquierdo I. and Martins V. R. (2007) Short-term memory formation and long-term memory consolidation are enhanced by cellular prion association to stress-inducible protein 1. *Neurobiol. Dis.* **26**, 282-290.
- Collinge J. (2005) Molecular neurology of prion disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **76**, 906-919.
- Dahlgren K. N., Manelli A. M., Stine W. B., Jr., Baker L. K., Krafft G. A. and Ladu M. J. (2002) Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J. Biol. Chem.* **277**, 32046-32053.
- De Felice F. G., Vieira M. N., Bomfim T. R., Decker H., Velasco P. T., Lambert M. P., Viola K. L., Zhao W. Q., Ferreira S. T. and Klein W. L. (2009) Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: insulin signaling prevents the pathogenic binding of Abeta oligomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**, 1971-1976.
- Dineley K. T., Westerman M., Bui D., Bell K., Ashe K. H. and Sweatt J. D. (2001) Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: In vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **21**, 4125-4133.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- Ferguson S. S. and Caron M. G. (2004) Green fluorescent protein-tagged beta-arrestin translocation as a measure of G protein-coupled receptor activation. *Methods Mol. Biol.* **237**, 121-126.
- Ghribi O., Prammonjago P., Herman M. M., Spaulding N. K. and Savory J. (2003) Abeta(1-42)-induced JNK and ERK activation in rabbit hippocampus is differentially regulated by lithium but is not involved in the phosphorylation of tau. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **119**, 201-206.
- Gilch S., Winkhofer K. F., Groschup M. H., Nunziante M., Lucassen R., Spielhauer C., Muranyi W., Riesner D., Tatzelt J. and Schatzl H. M. (2001) Intracellular re-routing of prion protein prevents propagation of PrP(Sc) and delays onset of prion disease. *EMBO J.* **20**, 3957-3966.
- Gimbel D. A., Nygaard H. B., Coffey E. E., Gunther E. C., Lauren J., Gimbel Z. A. and Strittmatter S. M. (2010) Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein. *J. Neurosci.* **30**, 6367-6374.
- Gong Y., Chang L., Viola K. L., Lacor P. N., Lambert M. P., Finch C. E., Krafft G. A. and Klein W. L. (2003) Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 10417-10422.
- 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.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

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.

Haass C. and Selkoe D. J. (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 101-112.

Hajj G. N., Lopes M. H., Mercadante A. F., Veiga S. S., da Silveira R. B., Santos T. G., Ribeiro K. C., Juliano M. A., Jacchieri S. G., Zanata S. M. and Martins V. R. (2007) Cellular prion protein interaction with vitronectin supports axonal growth and is compensated by integrins. *J. Cell Sci.* **120**, 1915-1926.

Hooper N. M. and Turner A. J. (2008) A new take on prions: preventing Alzheimer's disease. *Trends Biochem. Sci.* **33**, 151-155.

Jen A., Parkyn C. J., Mootoosamy R. C., Ford M. J., Warley A., Liu Q., Bu G., Baskakov I. V., Moestrup S., McGuinness L., Emptage N. and Morris R. J. (2010) Neuronal low-density lipoprotein receptor-related protein 1 binds and endocytoses prion fibrils via receptor cluster 4. *J. Cell Sci.* **123**, 246-255.

Klein W. L. (2002) Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem. Int.* **41**, 345-352.

Klyubin I., Walsh D. M., Lemere C. A., Cullen W. K., Shankar G. M., Betts V., Spooner E. T., Jiang L., Anwyl R., Selkoe D. J. and Rowan M. J. (2005) Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes Abeta oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo. *Nat. Med.* **11**, 556-561.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Lambert M. P., Barlow A. K., Chromy B. A., Edwards C., Freed R., Liosatos M., Morgan T. E., Rozovsky I., Trommer B., Viola K. L., Wals P., Zhang C., Finch C. E., Krafft G. A. and Klein W. L. (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 6448-6453.

Lauren J., Gimbel D. A., Nygaard H. B., Gilbert J. W. and Strittmatter S. M. (2009) Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* **457**, 1128-1132.

Lee K. S., Magalhaes A. C., Zanata S. M., Brentani R. R., Martins V. R. and Prado M. A. M. (2001) Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. *Journal of Neurochemistry* **79**, 79-87.

Linden R., Martins V. R., Prado M. A., Cammarota M., Izquierdo I. and Brentani R. R. (2008) Physiology of the prion protein. *Physiol Rev.* **88**, 673-728.

Lopes M. H., Hajj G. N., Muras A. G., Mancini G. L., Castro R. M., Ribeiro K. C., Brentani R. R., Linden R. and Martins V. R. (2005) Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *J. Neurosci.* **25**, 11330-11339.

Ma Q. L., Harris-White M. E., Ubeda O. J., Simmons M., Beech W., Lim G. P., Teter B., Frautschy S. A. and Cole G. M. (2007) Evidence of Abeta- and transgene-dependent defects in ERK-CREB signaling in Alzheimer's models. *J. Neurochem.* **103**, 1594-1607.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- Magalhaes A. C., Baron G. S., Lee K. S., Steele-Mortimer O., Dorward D., Prado M. A. and Caughey B. (2005) Uptake and neuritic transport of scrapie prion protein coincident with infection of neuronal cells. *J. Neurosci.* **25**, 5207-5216.
- Magalhaes A. C., Silva J. A., Lee K. S., Martins V. R., Prado V. F., Ferguson S. S. G., Gomez M. V., Brentani R. R. and Prado M. A. M. (2002) Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 33311-33318.
- Marijanovic Z., Caputo A., Campana V. and Zurzolo C. (2009) Identification of an intracellular site of prion conversion. *PLoS. Pathog.* **5**, e1000426.
- Martins V. R., Beraldo F. H., Hajj G. N., Lopes M. H., Lee K. S., Prado M. M. and Linden R. (2009) Prion Protein: Orchestrating Neurotrophic Activities. *Curr. Issues Mol. Biol.* **12**, 63-86.
- Martins V. R., Linden R., Prado M. A. M., Walz R., Sakamoto A. C., Izquierdo I. and Brentani R. R. (2002) Cellular prion protein: on the road for functions. *Febs Letters* **512**, 25-28.
- Maxfield F. R. and Mayor S. (1997) Cell surface dynamics of GPI-anchored proteins. *Adv-Ribosylation in Animal Tissues* **419**, 355-364.
- Mayor S., Rothberg K. G. and Maxfield F. R. (1994) Sequestration of Gpi-Anchored Proteins in Caveolae Triggered by Cross-Linking. *Science* **264**, 1948-1951.
- Morales R., Estrada L. D., az-Espinoza R., Morales-Scheihing D., Jara M. C., Castilla J. and Soto C. (2010) Molecular cross talk between misfolded proteins in animal models of Alzheimer's and prion diseases. *J. Neurosci.* **30**, 4528-4535.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Parkin E. T., Watt N. T., Hussain I., Eckman E. A., Eckman C. B., Manson J. C., Baybutt H. N., Turner A. J. and Hooper N. M. (2007) Cellular prion protein regulates beta-secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**, 11062-11067.

Parkyn C. J., Vermeulen E. G., Mootoosamy R. C., Sunyach C., Jacobsen C., Oxvig C., Moestrup S., Liu Q., Bu G., Jen A. and Morris R. J. (2008) LRP1 controls biosynthetic and endocytic trafficking of neuronal prion protein. *J. Cell Sci.* **121**, 773-783.

Pauly P. C. and Harris D. A. (1998) Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 33107-33110.

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.

Prado M. A., Alves-Silva J., Magalhaes A. C., Prado V. F., Linden R., Martins V. R. and Brentani R. R. (2004) PrP^c on the road: trafficking of the cellular prion protein. *J. Neurochem.* **88**, 769-781.

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

Renner M., Lacor P. N., Velasco P. T., Xu J., Contractor A., Klein W. L. and Triller A. (2010) Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5. *Neuron* **66**, 739-754.

Roffe M., Beraldo F. H., Bester R., Nunziante M., Bach C., Mancini G., Gilch S., Vorberg I., Castilho B. A., Martins V. R. and Hajj G. N. (2010) Prion protein interaction with stress-

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

inducible protein 1 enhances neuronal protein synthesis via mTOR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **107**, 13147-13152.

Santuccione A., Sytnyk V., Leshchyn'ska I. and Schachner M. (2005) Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* **169**, 341-354.

Selkoe D. J. (2006) The ups and downs of Abeta. *Nat. Med.* **12**, 758-759.

Selkoe D. J. (2008) Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav. Brain Res.* **192**, 106-113.

Selkoe D. J. and Schenk D. (2003) Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **43**, 545-584.

Shyng S. L., Heuser J. E. and Harris D. A. (1994) A Glycolipid-Anchored Prion Protein Is Endocytosed Via Clathrin-Coated Pits. *Journal of Cell Biology* **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. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 15922-15928.

Snyder E. M., Nong Y., Almeida C. G., Paul S., Moran T., Choi E. Y., Nairn A. C., Salter M. W., Lombroso P. J., Gouras G. K. and Greengard P. (2005) Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat. Neurosci.* **8**, 1051-1058.

Sperling R. A., Laviolette P. S., O'Keefe K., O'Brien J., Rentz D. M., Pihlajamaki M., Marshall G., Hyman B. T., Selkoe D. J., Hedden T., Buckner R. L., Becker J. A. and Johnson K. A. (2009)

- 1
2
3 Amyloid deposition is associated with impaired default network function in older persons
4
5 without dementia. *Neuron* **63**, 178-188.
6
7
8
9 Stine W. B., Jr., Dahlgren K. N., Krafft G. A. and Ladu M. J. (2003) In vitro characterization of
10
11 conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* **278**,
12
13 11612-11622.
14
15
16
17 Sunyach C., Jen A., Deng J., Fitzgerald K. T., Frobert Y., Grassi J., McCaffrey M. W. and
18
19 Morris R. (2003) The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored
20
21 prion protein. *Embo Journal* **22**, 3591-3601.
22
23
24
25 Taylor D. R. and Hooper N. M. (2006) The low-density lipoprotein receptor-related protein 1
26
27 (LRP1) mediates the endocytosis of the cellular prion protein. *Biochem. J.*
28
29
30
31 Taylor D. R. and Hooper N. M. (2007) The low-density lipoprotein receptor-related protein 1
32
33 (LRP1) mediates the endocytosis of the cellular prion protein. *Biochem. J.* **402**, 17-23.
34
35
36
37 Taylor D. R., Watt N. T., Perera W. S. and Hooper N. M. (2005) Assigning functions to distinct
38
39 regions of the N-terminus of the prion protein that are involved in its copper-stimulated, clathrin-
40
41 dependent endocytosis. *J. Cell Sci.* **118**, 5141-5153.
42
43
44
45 Wang H. Y., Lee D. H., D'Andrea M. R., Peterson P. A., Shank R. P. and Reitz A. B. (2000)
46
47 beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity.
48
49 Implications for Alzheimer's disease pathology. *J. Biol. Chem.* **275**, 5626-5632.
50
51
52
53 Weissmann C. (1999) Molecular genetics of transmissible spongiform encephalopathies. *J. Biol.*
54
55 *Chem.* **274**, 3-6.
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Westergard L., Christensen H. M. and Harris D. A. (2007) The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1772**, 629-644.

Young K. F., Pasternak S. H. and Rylett R. J. (2009) Oligomeric aggregates of amyloid beta peptide 1-42 activate ERK/MAPK in SH-SY5Y cells via the alpha7 nicotinic receptor. *Neurochem. Int.* **55**, 796-801.

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.

Zhao W. Q., De Felice F. G., Fernandez S., Chen H., Lambert M. P., Quon M. J., Krafft G. A. and Klein W. L. (2008) Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. *FASEB J.* **22**, 246-260.

10 DISCUSSÃO

Na primeira parte deste trabalho nós focamos nas interações intracelulares de STI1 na tentativa de compreendermos melhor como sua secreção é regulada. Mas, como dito anteriormente, STI1 é uma proteína de vida dupla: ela tem uma atividade no meio intracelular e outra no meio extracelular. E uma vez no meio extracelular, STI1 exerce diversas funções neurotróficas através da sua interação com a proteína prion celular. Nesta segunda parte do trabalho portanto, nós focamos nas funções de STI1 como um ligante da proteína prion celular, e também em outros ligantes de PrP^C.

A capacidade de PrP^C de se ligar a diversas proteínas, e de reunir complexos multi-protéicos na superfície celular apontam esta proteína como uma plataforma na membrana responsável por orquestrar atividades neurotróficas (Linden et al., 2008; Martins et al., 2009). Acredita-se que a perda destas interações durante o desenvolvimento das doenças priônicas possa participar dos efeitos tóxicos observados (Collinge and Palmer, 1994; Shmerling et al., 1998; Wadsworth et al., 2003; Baumann et al., 2007; Martins et al., 2009). A interação de PrP^C com STI1 foi descrita a mais de 10 anos pelo grupo da Dra Vilma Martins, e é uma das interações de PrP^C mais bem caracterizada até hoje. Esta interação induz neuritogênese, neuroproteção e consolidação da memória através da ativação de diferentes vias de sinalização (Zanata et al., 2002; Lopes et al., 2005; Coitinho et al., 2006). Para entendermos melhor o mecanismo pelo qual PrP^C exerce suas funções, no nosso primeiro trabalho nós exploramos a importância da endocitose de PrP^C para a sinalização (Caetano et al., 2008).

Utilizando STI1 recombinante marcada com fluoróforo e células transfectadas com GFP-PrP^C nós mostramos que STI1 induz a internalização de PrP^C. Esse efeito foi específico, uma vez que a STI1 cujo sítio de ligação a PrP^C foi deletado (STI1_{Δ230-245}) não foi capaz de induzi-lo. A endocitose de proteínas é um importante evento que pode modular eventos de sinalização que se iniciam na membrana celular (Gonzalez-Gaitan, 2003). A endocitose de PrP^C já foi descrita anteriormente, e é induzida por alguns metais como cobre e zinco em um processo dependente de clatrina (revisado por Hooper et al., 2008). Lee e colaboradores desenvolveram uma construção de PrP^C acoplada à GFP (GFP-PrP^C, utilizada neste trabalho) que é funcional, também sofrendo endocitose mediada por íons cobre (Lee et al., 2001).

Sunyach e Checler mostraram que a atividade pro-apoptótica de PrP^C mediada pela sua interação com p53, está relacionada com sua endocitose (Sunyach and Checler, 2005). Este e outros dados da literatura apontam a endocitose de PrP^C como um importante evento para sinalização mediada por esta proteína.

Dados do grupo da Dra Vilma Martins mostraram que a neuroproteção e neuritogênese induzida pela interação STI1-PrP^C é mediada pela ativação de PKA e ERK1/2 respectivamente (Chiarini et al., 2002; Lopes et al., 2005). Nós avaliamos a importância da endocitose de PrP^C induzida por STI1 para ativação destas vias e nossos resultados mostraram que um mutante de PrP^C que não pode ser internalizado pela via de clatrina não foi capaz de ativar ERK1/2, embora pudesse ativar PKA. Nossos dados demonstram que a STI1 recombinante é funcionalmente equivalente à STI1 secretada por astrócitos (Lima et al., 2007; Caetano et al., 2008). A dependência da endocitose de PrP^C para ativação de ERK1/2, mas não de PKA, mais uma vez suporta a idéia de que PrP^C consegue integrar diferentes sinais interagindo com diferentes complexos. Esse mesmo modelo é proposto para atuação de neurotrofinas como NGF através da sua ligação aos receptores Trk. Várias evidências mostram que a endocitose e o tráfego intracelular dos Trks controlam a cascata de sinalização que é iniciada pela ativação destes receptores (Huang and Reichardt, 2003). Chen e colaboradores demonstraram que os Trks utilizam vias endocíticas alternativas para ativar diferentes vias de sinalização que levarão a diferentes respostas frente ao mesmo ligante (Chen et al., 2005). Assim como para o complexo STI1-PrP^C, a ativação de MAP Kinase mediada pelos receptores Trks é dependente da sua endocitose (Huang and Reichardt, 2003). Uma vez endocitado, várias vesículas pequenas se fundem com os endosomas contendo Trk, formando os endosomas de sinalização. Estas pequenas vesículas contém toda a maquinaria necessária para uma sustentada ativação de ERK que levará a diferenciação celular (Huang and Reichardt, 2003).

Nós também estudamos a internalização e tráfego intracelular de STI1. Nossos resultados mostraram que STI1 se liga a células neuronais e é internalizada de forma independente da presença de PrP^C. Esses resultados sugerem a existência de outros receptores para STI1. Arantes e colaboradores mostraram que a sobrevivência e diferenciação de astrócitos induzidas por STI1, é estritamente dependente da sua interação com PrP^C (Arantes et al., 2009). Porém, também foi

visto neste trabalho que a STI1 inibe a proliferação de astrócitos de maneira independente de PrP^C, fortalecendo a idéia da existência de outros receptores para STI1 que modulam suas atividades.

A internalização de STI1 foi bloqueada a 4°C e pelo pré-tratamento com excesso de STI1 não marcada, sugerindo que a sua internalização ocorre através de um mecanismo específico. A principal via de internalização de proteínas é a via dependente de clatrina. Tendo em vista que várias neurotrofinas são internalizadas por esta via (Howe et al., 2001), nós decidimos avaliar o seu envolvimento na internalização de STI-1. Nossos resultados mostraram que em torno de 41% das vesículas positivas para STI1 foram também positivas para clatrina, mas somente nos minutos iniciais da internalização de STI1. Após 20 minutos, a porcentagem destas vesículas cai para em torno de 9%. Estes resultados sugerem que parte da internalização de STI1 ocorre através de clatrina, mas a maior parte se dá por um mecanismo distinto.

A segunda via endocítica mais bem caracterizada é a via dependente de lípide *Rafts*. Como estes microdomínios possuem composições diferentes ao longo da membrana, existem distintos mecanismos de internalização dentro desta mesma via (Nichols e Lippincott-Schwartz, 2001; Nichols, 2002). Utilizando dois marcadores de lípide *Rafts*, Caveolina1 e Flotilina1, nós mostramos a participação desta via na internalização de STI1. Nos minutos iniciais de sua endocitose, foi observado em torno de 38% de vesículas positivas para STI1 e caveolina1. Assim como para clatrina, essa porcentagem de co-localização diminuiu ao longo do tempo (15% após 20 minutos). Já com Flotilina1, nós observamos em torno de 61% de vesículas positivas para este marcador e para STI1 nos minutos iniciais da endocitose de STI1. Essa co-localização se manteve ao longo do tempo (68% de co-localização após 20 minutos) sugerindo que a via dependente de Flotilina1 seja o principal mecanismo de internalização de STI1.

Ainda explorando os mecanismo envolvidos na endocitose de STI1, nós utilizamos mais 3 ferramentas importantes: o mutante de dinamina K44A, o fragmento da proteína adaptadora de clatrina AP180-C e a depleção de colesterol da membrana utilizando metil- β -ciclodextrina (M β CD). A dinamina é uma GTPase que atua na fissão das vesículas liberando-as da membrana plasmática (revisto por Mousavi et al., 2004). O mutante de dinamina K44A, cujo sítio de ligação a GTP foi

mutado, tem sido extensivamente utilizado como bloqueador da endocitose (Herskovits et al., 1993; van der Blik et al., 1993; Magalhaes et al., 2002). O uso deste mutante bloqueou quase que completamente a endocitose de STI1. Como tanto a via clássica quanto as vias mediadas por lípide *Rafts* são dependentes de dinamina, não é possível inferir nada a respeito do mecanismo de endocitose de STI1 baseados somente nos resultados de K44A. Nós então utilizamos outra ferramenta que pensávamos ser mais específica para a endocitose mediada por clatrina, o AP180-C. Esse fragmento constitui o domínio de ligação a clatrina, sequestrando-a no citoplasma e bloqueando a endocitose por esta via (McMahon, 1999; Carvou et al., 2007). O uso de AP180-C bloqueou parcial porém significativamente a endocitose de STI1. Porém nós também avaliamos o efeito de AP180-C sobre os marcadores de lípide *Rafts*, e vimos que o AP180-C leva a uma distribuição anormal destes marcadores. Não foi possível dentro deste trabalho avaliar a funcionalidade das vias dependentes de lípide *Rafts* na presença de AP180-C. Há trabalhos que mostram a endocitose de toxina cólera na presença desse fragmento (Nichols, 2002), o que explicaria a inibição parcial e não total de STI1. Mas dada a grande aberração na distribuição de caveolina1 e flotilina1 devido a AP180-C, é possível que boa parte da internalização por estas vias esteja prejudicada. Não está claro se a perturbação na endocitose via clatrina pelo AP180 pode alterar outras formas de endocitose ou se o AP180 tem efeitos fora de seu alvo principal.

A terceira ferramenta utilizada foi a M β CD, que é uma droga conhecida por depletar colesterol da membrana plasmática alterando principalmente as vias dependentes de lípide *Rafts*. Os nossos resultados mostraram uma inibição de cerca de 75% da endocitose de STI1 na presença de M β CD. Nós também observamos significativo bloqueio da endocitose de cólera toxina e transferrina nas condições utilizadas, mais uma vez implicando em alteração em ambas as vias endocíticas. Em conjunto, nossos dados sugerem a participação de vias dependentes e independentes de clatrina na internalização de STI1. Esses resultados sugerem também que o processo de internalização de proteínas por estas vias distintas é mais interconectado do que se antecipa pela literatura.

Após a endocitose, STI1 foi diretamente direcionada para vesículas ácidas (endosomas tardios/lisosomas), não passando pelos endosomas primários positivos

para rab5. O primeiro destino das proteínas internalizadas pela via clássica são os endosomas primários (González-Gaitán, 2003). Já as proteínas internalizadas pelas vias dependentes de lípide *Rafts* são capazes de se acumular em vesículas acídicas, sendo a própria Flotilina1 encontrada nestas vesículas (Stuermer et al., 2004; Pimpinelli et al., 2005). Os nossos resultados portanto, são mais compatíveis com o modelo de internalização de proteínas via *Rafts* e propões esta via como o principal mecanismo para endocitose de STI1; a via clássica no entanto também tem sua contribuição, ainda que menor, para esse processo.

É interessante notar que este modelo é diferente daquele proposto para internalização da proteína prion celular. Magalhães e colaboradores mostraram que PrP^C é internalizados predominantemente pela via dependente de clatrina e é direcionado para endosomas da via clássica (Magalhaes et al., 2002). A internalização de PrP^C por caveolae já foi mostrada (Harmey et al., 1995; Peters et al., 2003). Porém há muitas controvérsias em relação a estes resultados visto que alguns pesquisadores não foram capazes de detectar a presença destas estruturas no modelos celulares utilizados (Shyng et al., 1994; Marella et al., 2002). O modelo proposto para a internalização de STI1 porém, coincide com a endocitose vista para PrP^{Sc} em células SN56 (Magalhães et al., 2005). Além disso já foi demonstrado a presença de PrP^{Sc} em vesículas positivas para Flotina1 (Pimpinelli et al., 2005). É possível que STI1 interaja com PrP^{Sc} em algum compartimento da via endocítica, embora não se saiba as implicações fisio-patológicas.

O uso do mutante de dinamina K44A mostrou uma forte co-localização de STI1 com PrP^C na membrana celular. Essa interação na membrana é transiente, e certamente corresponde ao primeiro passo no recrutamento de um complexo de sinalização. A nossa hipótese é de que o recrutamento deste complexo dispara a ativação de PKA, e leva ao engajamento de proteínas envolvidas na endocitose de PrP^C que é crítica para ativação de ERK1/2. Parte de STI1 é provavelmente internalizada junto com PrP^C através de vesículas cobertas por clatrina, enquanto a maior parte é internalizada independente de PrP^C por vias dependentes de lípide *Rafts*. Uma vez internalizada STI1 segue uma via distinta sendo direcionada para vesículas acídicas enquanto PrP^C pode seguir em endosomas de sinalização. Desta maneira, a sinalização por ERK seria transiente, compatível com a ativação encontrada em neurônios. Essa hipótese requer entre outros componentes, a

participação de uma proteína transmembrana que seja capaz de mediar a internalização de PrP^C via clatrina.

Taylor e Hooper e Parkyn e colaboradores mostraram que o receptor LRP1 está envolvido na endocitose de PrP^C via clatrina (Taylor and Hooper, 2007b; Parkyn et al., 2008). Este receptor está associado com a ativação de ERK através da sua interação com o fator de crescimento PDGF (Muratoglu et al., 2010). Interessantemente, foi demonstrado neste trabalho que a ativação de ERK é dependente da internalização de LRP1 e formação de um complexo endosomal de sinalização; semelhante ao modelo que temos proposto para STI1-PrP^C. Shi e colaboradores também mostraram ativação de ERK mediada por LRP1 (Shi et al., 2009). Neste caso, essa ativação se deu pela transativação de receptores neurotróficos Trk, e culminou em neuritogênese. Todos estes dados apontam LRP1 como um potencial candidato a ser um dos mediadores transmembrana dos efeitos induzidos pela interação STI1-PrP^C. Nós testamos essa hipótese utilizando o ligante RAP que bloqueia a interação de LRP1 com PrP^C. Nossos resultados mostraram que não houve ativação significativa de ERK1/2 induzida por STI1-PrP^C em células pré-tratadas com RAP. Estes resultados fortalecem a nossa hipótese, porém novos experimentos deverão ser feitos para confirmar o envolvimento de LRP1 na sinalização dependente da endocitose de PrP^C induzida por STI1.

Beraldo e colaboradores (2010, artigo submetido B) mostraram que a interação STI1-PrP^C modula a atividade do receptor colinérgico $\alpha 7$, promovendo um influxo de cálcio que é *Upstream* à ativação de ERK1/2 e PKA. Este recente trabalho nos mostra que além de LRP1, os receptores $\alpha 7$ também são fortes candidatos a mediador transmembrana dos efeitos induzidos pela interação STI1-PrP^C. Tomando como exemplo os receptores neurotróficos Trks, a ativação de ERK mediada por estes receptores pode ocorrer através do recrutamento de diferentes efetores. Essa ativação pode ser transiente, prolongada, depender ou não da endocitose dos Trks e envolver vias de sinalização completamente distintas; tudo depende do tipo e localização celular, do tipo de ligante, da disponibilidade dos efetores próximos à membrana entre outros (revisto por Huang e Reichardt, 2003). Portanto, é possível que tanto LRP1 quanto os receptores $\alpha 7$ estejam envolvidos na neuritogênese induzida por STI1-PrP^C. Futuros experimentos revelarão em que contexto cada um destes receptores é preferencialmente recrutado, e se existe uma

comunicação entre eles e se o complexo formado por PrP^C engloba simultaneamente essas duas proteínas.

Outras proteínas de membrana como os receptores metabotrópicos mGluR1/5 (Beraldo et al., 2010 artigo submetido A), receptores purinérgico P2Y, receptor de bradicinina BKR e canais de potássio TREK-1 estão envolvidos nas atividades neurotróficas mediadas por PrP^C (revisto por Martins et al., 2009). Estes dados mais uma vez mostram que PrP^C é uma proteína versátil quanto as suas ligações além de ser multifuncional. O estudo dos seus ligantes portanto, nos permite entender os papéis de PrP^C tanto no contexto fisiológico quanto no patológico.

Explorando essa idéia, Laurén e colaboradores mostraram que os oligômeros A β -amilóide se ligam com alta afinidade à PrP^C induzindo disfunção sináptica (Lauren et al., 2009). Estes e outros autores mostraram que os oligômeros se ligam em duas porções da região N-terminal de PrP^C: os resíduos 95-100 e 23-27 (Lauren et al., 2009; Chen et al., 2010). Estes trabalhos chamaram nossa atenção porque os resíduos 23-27 correspondem à região polibásica de PrP^C que é fundamental para sua endocitose mediada por clatrina e LRP1 (Taylor and Hooper, 2007; Parkyn et al., 2008). Nós tínhamos explorado a endocitose de PrP^C como um importante mecanismo para ativação de suas atividades fisiológicas, mas estes trabalhos levantam a hipótese que esse mesmo mecanismo pode também estar envolvido em atividades patológicas.

Nós inicialmente mostramos que os oligômeros A β induzem ativação de ERK1/2 de forma dependente de PrP^C. Diferente dos efeitos vistos para STI1, a ativação de ERK1/2 mediada por A β parece estar envolvida nos efeitos neurotóxicos observados na Doença de Alzheimer (Chong et al., 2006), sugerindo o recrutamento de efetores diferentes daqueles envolvidos na interação STI1-PrP^C. Utilizando uma combinação de diferentes técnicas de biologia celular nós mostramos que A β induz um aumento de PrP^C na superfície celular. Nós confirmamos este resultado utilizando um avançado sistema de microscopia, a microscopia de fluorescência de reflexão interna total (TIRF). Esta técnica permite a aquisição de imagens de alta resolução de eventos acontecendo na superfície celular. Através deste sistema nós visualizamos em tempo real o acúmulo de vesículas de PrP^C induzidas pelo tratamento com A β oligômeros (ver filmes no cd em anexo). Em algumas células o

aparecimento de vesículas foi visto primeiro em 200nm (distância a partir da lamínula) e logo em seguida em 110nm (mais próximo da superfície, Artigo 2, figura suplementar 1), sugerindo que o acúmulo de PrP^C seja devido ao recrutamento de PrP^C de compartimentos endocíticos intracelulares. Experimentos de tráfego de PrP^C a partir da membrana, utilizando anticorpo contra esta proteína marcado fluorescentemente, mostram uma diminuição da internalização de PrP^C em células tratadas com A β . Estes resultados mostram uma inibição da endocitose constitutiva de PrP^C. Portanto, em conjunto os nossos resultados sugerem que o acúmulo de PrP^C na membrana induzido pela interação com A β seja devido a ambos os mecanismos: recrutamento de novas vesículas de PrP^C a partir de compartimentos intracelulares e inibição da sua endocitose constitutiva.

Nós ainda não sabemos quais são os efeitos fisiológicos desse aumento de PrP^C na membrana induzido por A β . O tráfego de PrP^C tem sido proposto como um mecanismo chave para a ativação de algumas de suas funções fisiológicas (Prado et al., 2004;Caetano et al., 2008) e também para o processo patológico no qual esta proteína está envolvida (Caughey and Raymond, 1991; Gilch et al., 2001; Prado et al., 2004). Distúrbios nesse processo certamente alteram a homeostasia celular. Interessantemente, a ligação de A β se dá no sítio de PrP^C que é fundamental para sua endocitose via clatrina. Essa interação pode portanto, impedir a ligação de PrP^C com proteínas adaptadoras, explicando a inibição de sua endocitose constitutiva. Uma das possíveis interações que poderia ser prejudicada pela ligação de PrP^C a A β , é a sua interação com LRP1. Essa possibilidade estaria de acordo com os nossos resultados mostrando inibição parcial da endocitose de PrP^C pelos oligômeros, porém contradiz nossos experimentos mostrando que a endocitose de PrP^C induzida por cobre (que também é mediada por LRP1) não é afetada pelo pré-tratamento com os oligômeros. LRP1 parece estar envolvido no tráfego das formas monoméricas de A β (Deane et al., 2004). Neste trabalho os autores mostraram que peptídeos A β reduzem os níveis de expressão de LRP1 no endotélio cerebral através da ativação de sua degradação dependente de proteasoma. A internalização e a síntese de LRP1 não foram alterados por A β (Deane et al., 2004). É possível então que mais do que um prejuízo na interação entre PrPC e LRP1, a redução nos níveis de LRP1 explique os efeitos de A β sobre a endocitose de PrP^C. Novos experimentos deverão ser realizados para confirmar essa hipótese e re-

avaliar os efeitos de A β sobre a endocitose de PrP^C induzida por cobre em células pré-tratadas por um período mais prolongado.

Outra observação importante em relação aos sítios de interação de A β em PrP^C é que um deles (95-105) é muito próximo do sítio de ligação de ST11 (Zanata et al., 2002). Coitinho e colaboradores mostraram que a interação ST11-PrP^C é importante para a formação e consolidação da memória (Coitinho et al., 2007). Interessantemente, Gimbel e colaboradores recentemente mostraram o prejuízo na memória em camundongos modelo de Alzheimer foi dependente da presença de PrP^C (Gimbel et al., 2010). Além disso, sabe-se que outra característica da doença de Alzheimer é a perda de neurônios colinérgicos, o que também afeta a memória (revisto por Buckingham et al., 2009). A ligação dos oligômeros A β aos receptores α 7 nicotínicos já foi demonstrada (Wang et al., 2000a; Wang et al., 2000b; Wang et al., 2009). O tipo de oligômeros utilizado neste trabalho também já foi caracterizado por se ligar a estes receptores nicotínicos (Young et al., 2009). Da mesma forma, a interação de ST11 com PrP^C modula a atividade dos receptores α 7, levando à ativação de vias de sinalização que estão envolvidas na proteção e diferenciação neuronal mediadas por estas proteínas (Lopes et al., 2005; Beraldo et al., 2010 artigo submetido B). Portanto, é possível que a perda da interação ST11-PrP^C possa participar do mecanismo neurotóxico induzido pelos oligômeros A β .

Além dos receptores colinérgicos, os efeitos neurotóxicos de A β também estão associados a outro ligante de PrP^C: os receptores glutamatérgicos mGluR5 (Renner et al., 2010; Beraldo et al., submetido A), sugerindo mais uma vez que a perda das interações de PrP^C pela sua ligação a A β está envolvida no processo patológico da AD.

Em conjunto, os nossos dados associados à literatura reforçam a hipótese que PrP^C atua como uma plataforma na membrana celular capaz de reunir diferentes complexos de sinalização. Suas atividades fisiológicas estão estritamente associadas com seus ligantes, como ST11, e em alguns casos com sua endocitose. A perda destas interações provavelmente leva a efeitos neurotóxicos, como vistos para formas truncadas de PrP^C e também pelo seu 'direcionamento' na membrana celular por A β .

11 CONCLUSÕES

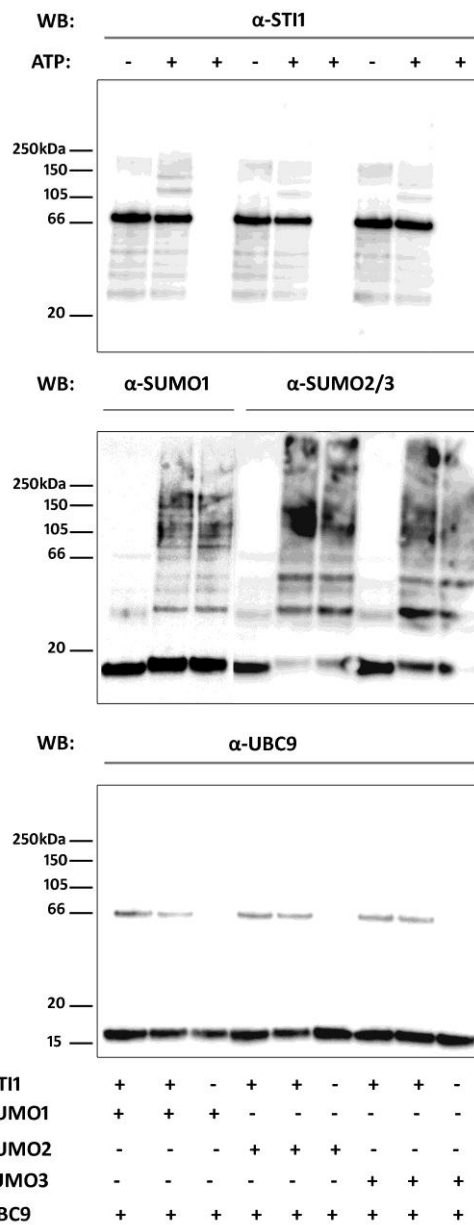
As principais conclusões deste trabalho são:

- 1- STI1 interage com as proteínas da via de SUMOilação;
- 2- STI1 é SUMOilada por SUMO1 e SUMO2/3, sendo PIAS1 a E3 ligase específica para este processo;
- 3- A interação de STI1 com PIAS1 ou SUMO3 leva ao aumento da localização nuclear de STI1;
- 4- STI1 é direcionada para os corpos PML onde se co-localiza com SUMO1 e SUMO3, em um processo dependente de PIAS1;
- 5- Estresse celular por choque térmico não altera a distribuição intracelular de STI1, ainda que na presença das proteínas da via de SUMOilação;
- 6- Estresse celular por Irradiação Ionizante leva ao translocação de STI1 para o núcleo, onde provavelmente atua na via de reparo ao DNA.
- 7- Uma vez secretada, STI1 interage com as células de modo específico e é internalizada independente da presença de PrP^C;
- 8- A internalização de STI1 ocorre principalmente por vias dependentes de lípidos 'rafts', mas uma fração considerável também é internalizada pela via clássica;
- 9- Uma vez internalizada, STI1 é diretamente direcionada para vesículas acídicas, sem passar pelos endosomas primários;
- 10- O mutante de dinamina, K44A, e o fragmento AP180-C foram capazes de bloquear significativamente a endocitose de STI1 e PrP^C, mostrando uma forte co-localização destas proteínas na membrana plasmática;
- 11- STI1 induz a endocitose de PrP^C, e este processo é importante para a ativação de ERK1/2 mediada pela interação entre estas proteínas;
- 12- O ligante de LRP1, RAP, parece bloquear a ativação de ERK1/2 induzida por STI1-PrP^C;
- 13- Ao contrário de STI1, os oligômeros A β induzem um aumento de PrP^C na superfície celular.

Os anexos 1 a 4 a seguir são dados da tese da estudante de doutorado Iaci Soares, que complementam os resultados apresentados neste trabalho. Trata-se de *Immunoblottings* mostrando a SUMOilação de STI1 *in vitro* e em células de mamíferos, a caracterização de PIAS1 mas não de Pc2, como E3 ligase para STI1 e também dados mostrando a diminuição da SUMOilação de STI1 após irradiação ionizante.

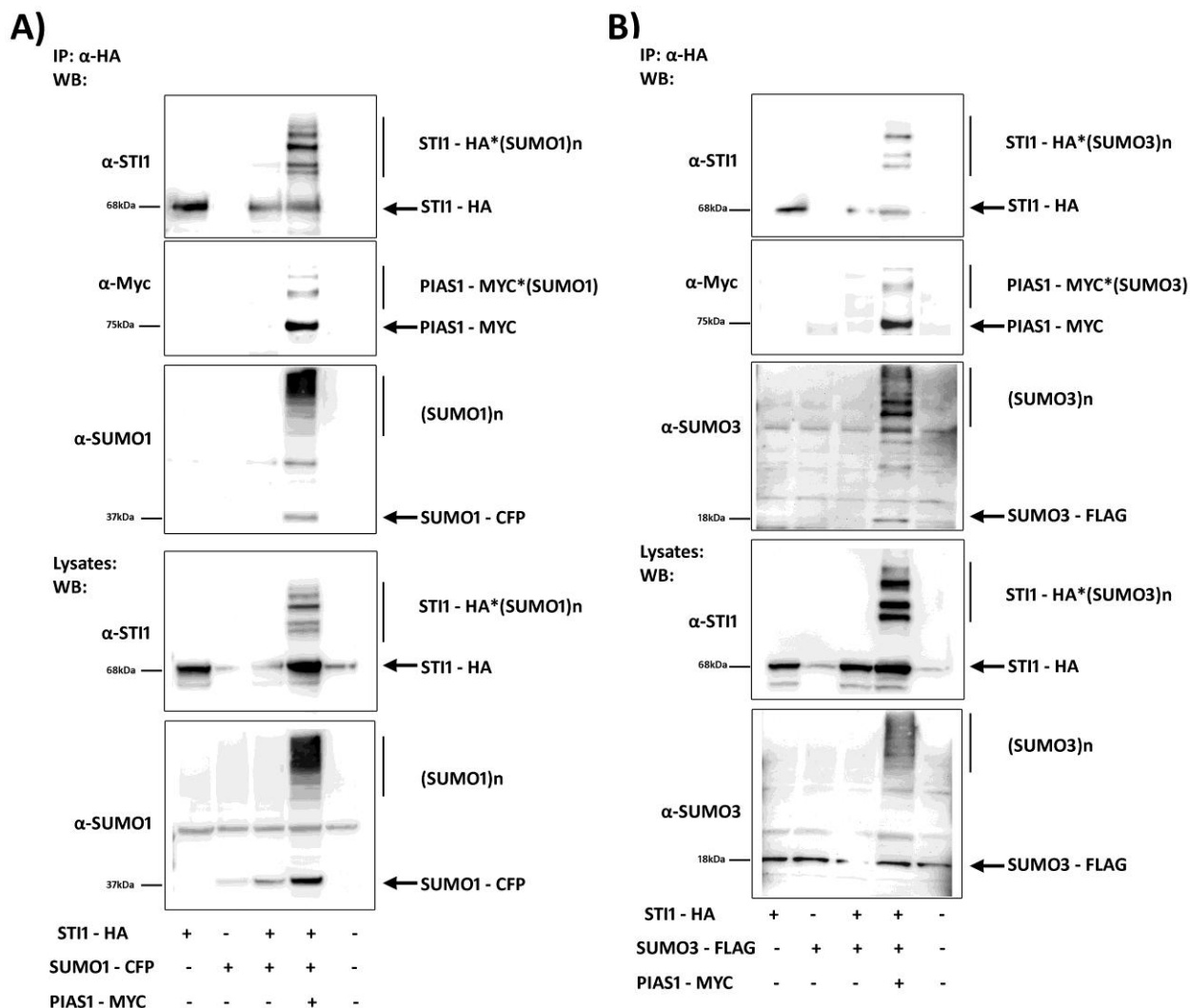
O anexo 5 corresponde a uma lista do material disponível do cd que foi enviado junto com esta tese.

12 ANEXOS

ANEXO 1 – SUMOilação *in vitro* de ST11*In vitro* SUMOylation

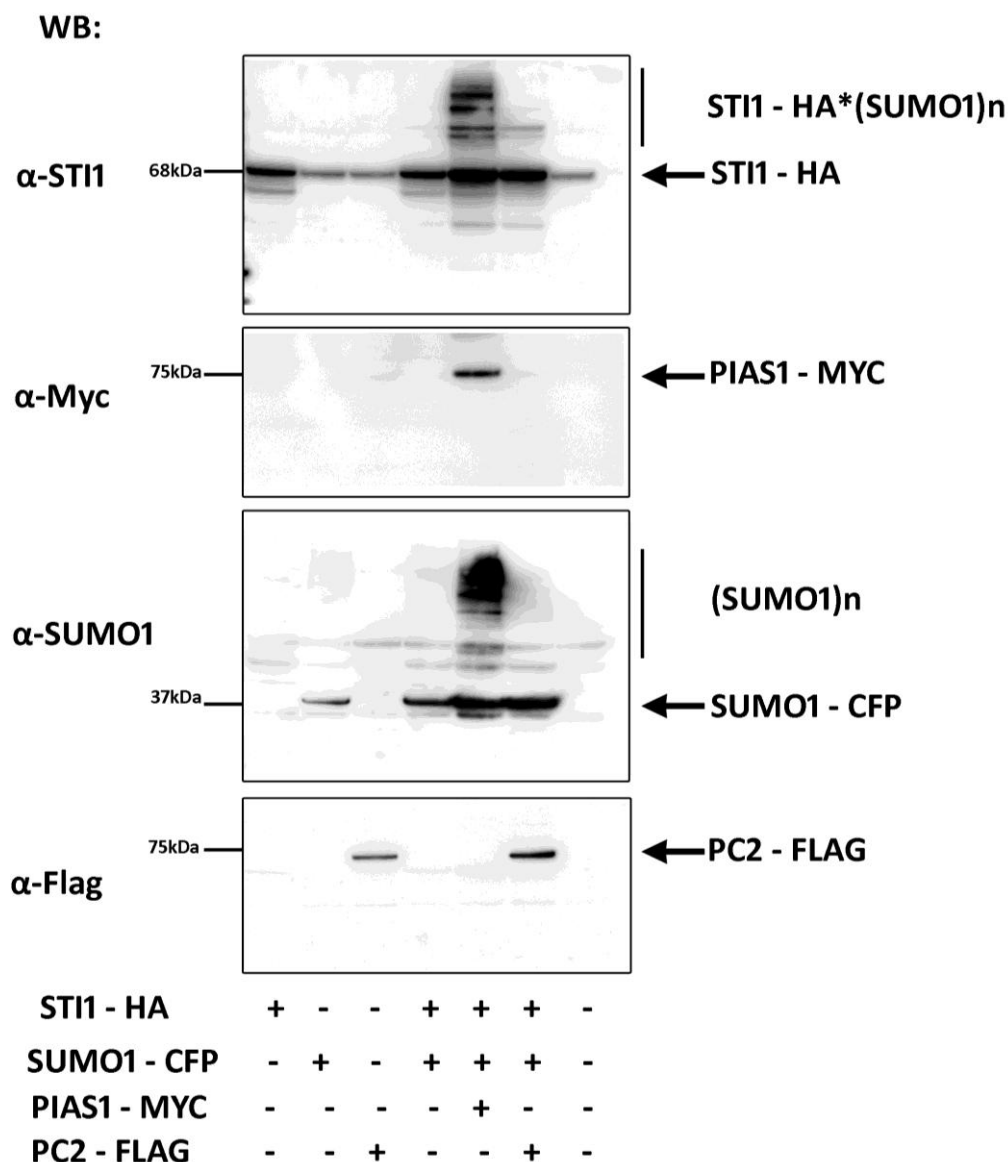
Anexo 1 – SUMOilação *in vitro* de ST11. ST11 recombinante foi submetida a ensaio de SUMOilação *in vitro* na presença de SUMO1, SUMO2/3 e Ubc9 recombinantes. As bandas de alto peso molecular representam a ST11 SUMOilada. Note que ST11 é SUMOilada tanto por SUMO1 quanto por SUMO2/3 em um processo dependente de ATP.

ANEXO 2 – SUMOilação de STI1 em células de mamíferos



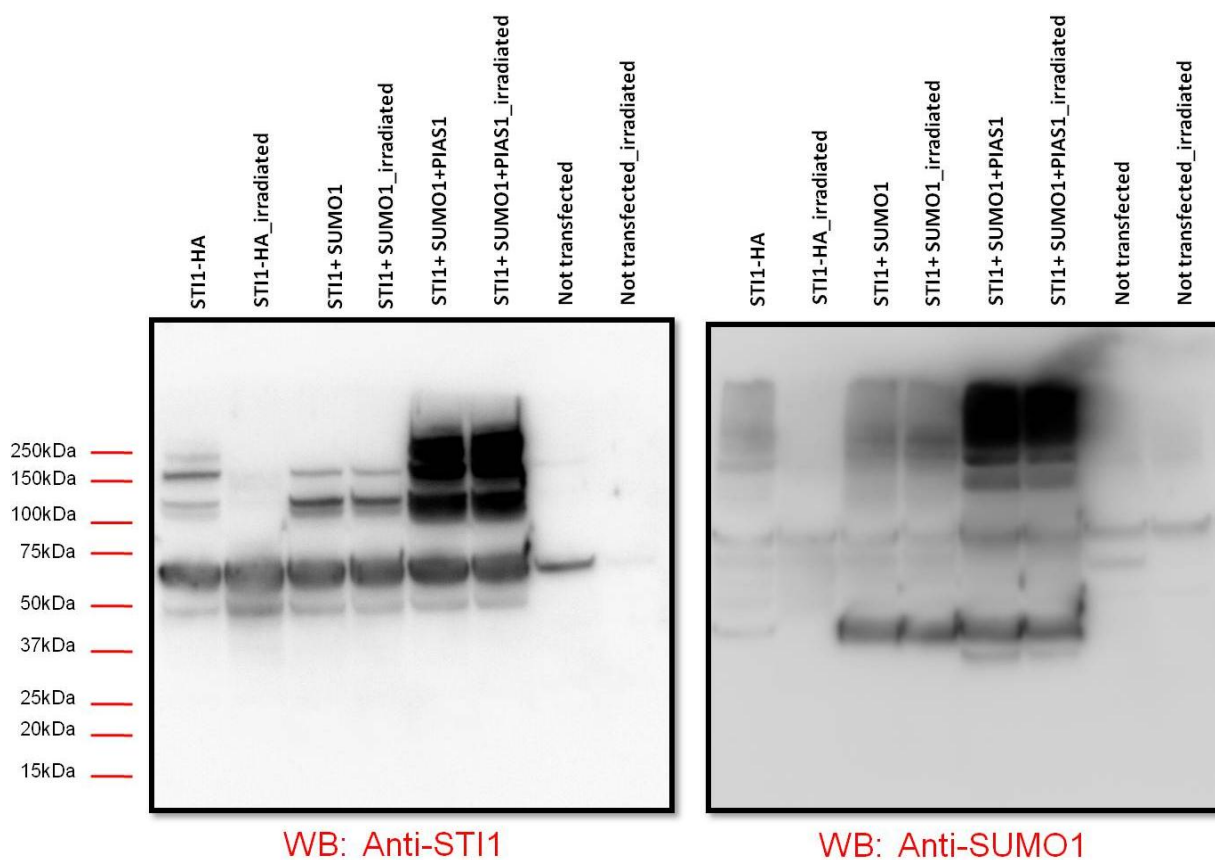
Anexo 2 – SUMOilação de STI1 em células de mamíferos. Células HEK 293 foram co-transfectadas com STI1-HA e as proteínas da via da SUMOilação, imunoprecipitadas com beads de HA e analisadas por *Western Blotting* (WB). STI1 foi SUMOilada por SUMO1 (A) e por SUMO3 (B) na presença da E3 ligase PIAS1. Foram utilizados os anticorpos anti-STI1 (Instituto Ludwig, 1:5000), anti-Myc (Sigma, 1:1000), anti-SUMO1 (Zymed, 1:1000) e anti-SUMO3 (Zymed, 1:1000). IP representa as proteínas co-imunoprecipitadas e Lysates representa a expressão das proteínas nos lisados.

ANEXO 3 – Caracterização de PIAS1 como E3 ligase para STI1



Anexo 3 – PIAS1 é a E3 ligase para SUMOilação de STI1. Células HEK 293 foram co-transfectadas com STI1-HA e as proteínas da via da SUMOilação de acordo com o indicado na figura, e analisadas por *Western Blotting* (WB). A SUMOilação de STI1 por SUMO1 foi aumentada pela E3 ligase PIAS1 mas não por PC2. Foram utilizados os anticorpos anti-STI1 (Instituto Ludwig, 1:5000), anti-Myc (Sigma, 1:1000), anti-SUMO1 (Zymed, 1:1000) e anti-Flag (Sigma, 1:1000) para detecção das proteínas.

ANEXO 4 – Avaliação da SUMOilação de STI1 após estresse genotóxico



Anexo 4 – Estresse genotóxico reduz a SUMOilação de STI1. Células HEK 293 foram co-transfectadas com STI1-HA e as proteínas da via da SUMOilação. Após 48 horas de transfecção as células foram submetidas à irradiação por raios X e analisadas por *Western Blotting* (WB). O stress genotóxico diminuiu a SUMOilação de STI1. Na presença de SUMO1 ou PIAS1, a SUMOilação de STI1 não foi alterada. Foram utilizados os anticorpos anti-STI1 (Instituto Ludwig, 1:5000) e anti-SUMO1 (Zymed, 1:1000) para detecção das proteínas.

ANEXO 5 – Lista do material disponível no cd que acompanha a tese

- 1- Artigos: artigo publicado no Journal of Neuroscience e o artigo recentemente submetido.
- 2- Figuras: pasta com todas as imagens de microscopia confocal deste trabalho, exceto as que estão nos artigos.
- 3- Filmes do artigo submetido:
 - Movie 1B = GFP-PrP^C tratado com 500µM de solução de sulfato de cobre.
 - Movie 2 = Alexa Fluor 488-PrP^C + mCherry-Rab5 em tampão Krebs.
 - Movie 3 = Aumento na fluorescência de Alexa Fluor 488-PrP^C na membrana durante o tratamento com oligômeros Aβ.
 - Movie 4 = Aumento na fluorescência de Alexa Fluor 488-PrP^C na membrana durante o tratamento com monômero Aβ.
 - Movie 5 = Alexa Fluor 488-PrP^C após tratamento com oligômeros Aβ.Todos os filmes foram feitos em células HEK, mantendo-se a temperatura a 37°C, utilizando-se o microscópio TIRF da Leica DMI6000 B MC.
- 4- Filmes diversos: internalização de STI1-AF568, perfusão de células transfectadas com GFP-PrP^C com STI1-AF568 ou com ΔSTI1-AF568, perfusão de células co-transfectadas com GFP-PrP^C e AP180-C com STI1-AF568. Todos os filmes foram realizados em células SN56, mantendo-se a temperatura a 37°C no microscópio confocal da BioRad MCR 1024.

Reference List

- Aguzzi A, Baumann F, Bremer J (2008) The prion's elusive reason for being. *Annu Rev Neurosci* 31:439-477.
- Allen JA, Halverson-Tamboli RA, Rasenick MM (2007) Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat Rev Neurosci* 8:128-140.
- Americo TA, Chiarini LB, Linden R (2007) Signaling induced by hop/STI-1 depends on endocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* 358:620-625.
- Aranes C, Nomizo R, Lopes MH, Hajj GN, Lima FR, Martins VR (2009) Prion protein and its ligand stress inducible protein 1 regulate astrocyte development. *Glia* 57:1439-1449.
- Balducci C, Beeg M, Stravalaci M, Bastone A, Scip A, Biasini E, Tapella L, Colombo L, Manzoni C, Borsello T, Chiesa R, Gobbi M, Salmona M, Forloni G (2010) Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:2295-2300.
- Baldwin MA, Pan KM, Nguyen J, Huang Z, Groth D, Serban A, Gasset M, Mehlhorn I, Fletterick RJ, Cohen FE, . (1994) Spectroscopic characterization of conformational differences between PrPC and PrPSc: an alpha-helix to beta-sheet transition. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 343:435-441.
- Bannykh SI, Rowe T, Balch WE (1996) The organization of endoplasmic reticulum export complexes. *J Cell Biol* 135:19-35.
- Barman HK, Takami Y, Nishijima H, Shibahara K, Sanematsu F, Nakayama T (2008) Histone acetyltransferase-1 regulates integrity of cytosolic histone H3-H4 containing complex. *Biochem Biophys Res Commun* 373:624-630.
- Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C (1986) Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46:417-428.
- Baumann F, Tolnay M, Brabeck C, Pahnke J, Kloz U, Niemann HH, Heikenwalder M, Rulicke T, Burkle A, Aguzzi A (2007) Lethal recessive myelin toxicity of prion protein lacking its central domain. *EMBO J* 26:538-547.
- Bayer P, Arndt A, Metzger S, Mahajan R, Melchior F, Jaenicke R, Becker J (1998) Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol* 280:275-286.
- Benson MD, Li QJ, Kieckhafer K, Dudek D, Whorton MR, Sunahara RK, Iniguez-Lluhi JA, Martens JR (2007) SUMO modification regulates inactivation of the voltage-gated potassium channel Kv1.5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:1805-1810.
- Bernardi R, Pandolfi PP (2007) Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:1006-1016.
- Blatch GL, Lassle M (1999) The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* 21:932-939.

- Bohren KM, Nadkarni V, Song JH, Gabbay KH, Owerbach D (2004) A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. *J Biol Chem* 279:27233-27238.
- Bonacci GR, Caceres LC, Sanchez MC, Chiabrando GA (2007) Activated alpha(2)-macroglobulin induces cell proliferation and mitogen-activated protein kinase activation by LRP-1 in the J774 macrophage-derived cell line. *Arch Biochem Biophys* 460:100-106.
- Borchelt DR, Taraboulos A, Prusiner SB (1992) Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J Biol Chem* 267:16188-16199.
- Brandner S, Isenmann S, Raeber A, Fischer M, Sailer A, Kobayashi Y, Marino S, Weissmann C, Aguzzi A (1996) Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* 379:339-343.
- Brown DA, Rose JK (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68:533-544.
- Brown DR (2001) Prion and prejudice: normal protein and the synapse. *Trends Neurosci* 24:85-90.
- Bu G, Maksymovitch EA, Geuze H, Schwartz AL (1994a) Subcellular localization and endocytic function of low density lipoprotein receptor-related protein in human glioblastoma cells. *J Biol Chem* 269:29874-29882.
- Bu G, Maksymovitch EA, Nerbonne JM, Schwartz AL (1994b) Expression and function of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) in mammalian central neurons. *J Biol Chem* 269:18521-18528.
- Bucci C, Thomsen P, Nicoziani P, McCarthy J, van Deurs B (2000) Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell* 11:467-480.
- Buckingham SD, Jones AK, Brown LA, Sattelle DB (2009) Nicotinic acetylcholine receptor signalling: roles in Alzheimer's disease and amyloid neuroprotection. *Pharmacol Rev* 61:39-61.
- 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.
- Caceres LC, Bonacci GR, Sanchez MC, Chiabrando GA (2010) Activated alpha2 macroglobulin induces matrix metalloproteinase 9 expression by low density lipoprotein receptor-related protein 1 through MAPK-ERK1/2 and NF-kappaB activation in macrophage derived cell lines. *J Cell Biochem*.
- Caetano FA, Lopes MH, Hajj GN, Machado CF, Pinto AC, Magalhaes AC, Vieira MP, Americo TA, Massensini AR, Priola SA, Vorberg I, Gomez MV, Linden R, Prado VF, Martins VR, Prado MA (2008) Endocytosis of prion protein is required for ERK1/2 signaling induced by stress-inducible protein 1. *J Neurosci* 28:6691-6702.

- Callella AM, Farinelli M, Nuvolone M, Mirante O, Moos R, Falsig J, Mansuy IM, Aguzzi A (2010) Prion protein and Abeta-related synaptic toxicity impairment. *EMBO Mol Med*.
- Cann KL, Hicks GG (2007) Regulation of the cellular DNA double-strand break response. *Biochem Cell Biol* 85:663-674.
- Carvou N, Norden AG, Unwin RJ, Cockcroft S (2007) Signalling through phospholipase C interferes with clathrin-mediated endocytosis. *Cell Signal* 19:42-51.
- Castilla J, Saa P, Hetz C, Soto C (2005) In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* 121:195-206.
- Caughey B, Raymond GJ (1991) The Scrapie-Associated Form of Prp Is Made from A Cell-Surface Precursor That Is Both Protease-Sensitive and Phospholipase-Sensitive. *Journal of Biological Chemistry* 266:18217-18223.
- Caughey B, Raymond GJ, Ernst D, Race RE (1991) N-Terminal Truncation of the Scrapie-Associated Form of Prp by Lysosomal Protease(S) - Implications Regarding the Site of Conversion of Prp to the Protease-Resistant State. *Journal of Virology* 65:6597-6603.
- Chang HC, Nathan DF, Lindquist S (1997) In vivo analysis of the Hsp90 cochaperone Sti1 (p60). *Mol Cell Biol* 17:318-325.
- Chen S, Yadav SP, Surewicz WK (2010) Interaction between human prion protein and A{beta} oligomers: the role of N-terminal residues. *J Biol Chem*.
- Chen ZY, Ieraci A, Tanowitz M, Lee FS (2005) A novel endocytic recycling signal distinguishes biological responses of Trk neurotrophin receptors. *Mol Biol Cell* 16:5761-5772.
- Chesebro B, Race B, Meade-White K, LaCasse R, Race R, Klingeborn M, Striebel J, Dorward D, McGovern G, Jeffrey M (2010) Fatal transmissible amyloid encephalopathy: a new type of prion disease associated with lack of prion protein membrane anchoring. *PLoS Pathog* 6:e1000800.
- Chesebro B, Trifilo M, Race R, Meade-White K, Teng C, LaCasse R, Raymond L, Favara C, Baron G, Priola S, Caughey B, Masliah E, Oldstone M (2005) Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science* 308:1435-1439.
- Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R (2002) Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J* 21:3317-3326.
- Chong YH, Shin YJ, Lee EO, Kaye R, Glabe CG, Tenner AJ (2006) ERK1/2 activation mediates Abeta oligomer-induced neurotoxicity via caspase-3 activation and tau cleavage in rat organotypic hippocampal slice cultures. *J Biol Chem* 281:20315-20325.
- Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K (1997) Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278:1803-1805.
- Coitinho AS, Freitas AR, Lopes MH, Hajj GN, Roesler R, Walz R, Rossato JI, Cammarota M, Izquierdo I, Martins VR, Brentani RR (2006) The interaction between prion protein and laminin modulates memory consolidation. *Eur J Neurosci* 24:3255-3264.

- Coitinho AS, Lopes MH, Hajj GN, Rossato JI, Freitas AR, Castro CC, Cammarota M, Brentani RR, Izquierdo I, Martins VR (2007) Short-term memory formation and long-term memory consolidation are enhanced by cellular prion association to stress-inducible protein 1. *Neurobiol Dis* 26:282-290.
- 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, Palmer MS (1994) Molecular genetics of human prion diseases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 343:371-378.
- 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.
- Conner SD, Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422:37-44.
- Dancourt J, Barlowe C (2010) Protein sorting receptors in the early secretory pathway. *Annu Rev Biochem* 79:777-802.
- Daniel S, Bradley G, Longshaw VM, Soti C, Csermely P, Blatch GL (2008) Nuclear translocation of the phosphoprotein Hop (Hsp70/Hsp90 organizing protein) occurs under heat shock, and its proposed nuclear localization signal is involved in Hsp90 binding. *Biochim Biophys Acta* 1783:1003-1014.
- Das AK, Cohen PW, Barford D (1998) The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J* 17:1192-1199.
- de Almeida CJ, Chiarini LB, da Silva JP, PM ES, Martins MA, Linden R (2005) The cellular prion protein modulates phagocytosis and inflammatory response. *J Leukoc Biol* 77:238-246.
- Deane R, Wu Z, Sagare A, Davis J, Du YS, Hamm K, Xu F, Parisi M, LaRue B, Hu HW, Spijkers P, Guo H, Song X, Lenting PJ, Van Nostrand WE, Zlokovic BV (2004) LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms. *Neuron* 43:333-344.
- Dellaire G, Farrall R, Bickmore WA (2003) The Nuclear Protein Database (NPD): sub-nuclear localisation and functional annotation of the nuclear proteome. *Nucleic Acids Res* 31:328-330.
- Desterro JM, Rodriguez MS, Kemp GD, Hay RT (1999) Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1. *J Biol Chem* 274:10618-10624.
- Doepfner TR, Nagel F, Dietz GP, Weise J, Tonges L, Schwarting S, Bahr M (2009) TAT-Hsp70-mediated neuroprotection and increased survival of neuronal precursor cells after focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 29:1187-1196.
- Dorval V, Fraser PE (2007) SUMO on the road to neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 1773:694-706.

- Driscaldi B, Coomaraswamy J, Mastrangelo P, Strome B, Yang J, Watts JC, Chishti MA, Marvi M, Windl O, Ahrens R, Major F, Sy MS, Kretzschmar H, Fraser PE, Mount HT, Westaway D (2004) Genetic mapping of activity determinants within cellular prion proteins: N-terminal modules in PrPC offset pro-apoptotic activity of the Doppel helix B/B' region. *J Biol Chem* 279:55443-55454.
- Edeling MA, Smith C, Owen D (2006) Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:32-44.
- Eustace BK, Jay DG (2004) Extracellular roles for the molecular chaperone, hsp90. *Cell Cycle* 3:1098-1100.
- Farsad K, Ringstad N, Takei K, Floyd SR, Rose K, De CP (2001) Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *J Cell Biol* 155:193-200.
- Faure J, Lachenal G, Court M, Hirrlinger J, Chatellard-Causse C, Blot B, Grange J, Schoehn G, Goldberg Y, Boyer V, Kirchhoff F, Raposo G, Garin J, Sadoul R (2006) Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol Cell Neurosci* 31:642-648.
- Ferguson SS, Caron MG (2004) Green fluorescent protein-tagged beta-arrestin translocation as a measure of G protein-coupled receptor activation. *Methods Mol Biol* 237:121-126.
- Fevrier B, Raposo G (2004) Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol* 16:415-421.
- Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, Laude H, Raposo G (2004) Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9683-9688.
- Fevrier B, Vilette D, Laude H, Raposo G (2005) Exosomes: a bubble ride for prions? *Traffic* 6:10-17.
- Filesi I, Cardinale A, Mattei S, Biocca S (2007) Selective re-routing of prion protein to proteasomes and alteration of its vesicular secretion prevent PrP(Sc) formation. *J Neurochem* 101:1516-1526.
- Fischer M, Rulicke T, Raeber A, Sailer A, Moser M, Oesch B, Brandner S, Aguzzi A, Weissmann C (1996) Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J* 15:1255-1264.
- Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG (1995) De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8655-8659.
- Frick M, Bright NA, Riento K, Bray A, Merrified C, Nichols BJ (2007) Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane curvature, and vesicle budding. *Curr Biol* 17:1151-1156.
- Gaidarov I, Santini F, Warren RA, Keen JH (1999) Spatial control of coated-pit dynamics in living cells. *Nat Cell Biol* 1:1-7.

- Galanty Y, Belotserkovskaya R, Coates J, Polo S, Miller KM, Jackson SP (2009) Mammalian SUMO E3-ligases PIAS1 and PIAS4 promote responses to DNA double-strand breaks. *Nature* 462:935-939.
- Geiss-Friedlander R, Melchior F (2007) Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:947-956.
- Gilch S, Winklhofer KF, Groschup MH, Nunziante M, Lucassen R, Spielhauer C, Muranyi W, Riesner D, Tatzelt J, Schatzl HM (2001) Intracellular re-routing of prion protein prevents propagation of PrP(Sc) and delays onset of prion disease. *EMBO J* 20:3957-3966.
- Gimbel DA, Nygaard HB, Coffey EE, Gunther EC, Lauren J, Gimbel ZA, Strittmatter SM (2010) Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein. *J Neurosci* 30:6367-6374.
- Glebov OO, Bright NA, Nichols BJ (2006) Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 8:46-54.
- Golebiowski F, Matic I, Tatham MH, Cole C, Yin Y, Nakamura A, Cox J, Barton GJ, Mann M, Hay RT (2009) System-wide changes to SUMO modifications in response to heat shock. *Sci Signal* 2:ra24.
- Gong L, Li B, Millas S, Yeh ET (1999) Molecular cloning and characterization of human AOS1 and UBA2, components of the sentrin-activating enzyme complex. *FEBS Lett* 448:185-189.
- Gonzalez-Gaitan M (2003) Signal dispersal and transduction through the endocytic pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:213-224.
- Gonzalez-Gaitan M, Stenmark H (2003) Endocytosis and signaling: a relationship under development. *Cell* 115:513-521.
- 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 (2000a) Cellular prion protein binds laminin and mediates neuriteogenesis. *Brain Res Mol Brain Res* 76:85-92.
- Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Martins VR, Jay DG, Brentani RR (2000b) Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. *FEBS Lett* 482:257-260.
- Hajj GN, Lopes MH, Mercadante AF, Veiga SS, da Silveira RB, Santos TG, Ribeiro KC, Juliano MA, Jacchieri SG, Zanata SM, Martins VR (2007) Cellular prion protein interaction with vitronectin supports axonal growth and is compensated by integrins. *J Cell Sci* 120:1915-1926.
- Hajj GN, Santos TG, Cook ZS, Martins VR (2009) Developmental expression of prion protein and its ligands stress-inducible protein 1 and vitronectin. *J Comp Neurol* 517:371-384.
- Haraguchi T, Fisher S, Olofsson S, Endo T, Groth D, Tarentino A, Borchelt DR, Teplow D, Hood L, Burlingame A, . (1989) Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch Biochem Biophys* 274:1-13.

- Harmey JH, Doyle D, Brown V, Rogers MS (1995) The cellular isoform of the prion protein, PrP^c, is associated with caveolae in mouse neuroblastoma (N2a) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 210:753-759.
- Harper JW, Elledge SJ (2007) The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* 28:739-745.
- Harris DA (1999) Cellular biology of prion diseases. *Clinical Microbiology Reviews* 12:429-+.
- Harris DA, Falls DL, Johnson FA, Fischbach GD (1991) A Prion-Like Protein from Chicken Brain Copurifies with An Acetylcholine Receptor-Inducing Activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:7664-7668.
- Henley JR, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA (1998) Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol* 141:85-99.
- Herskovits JS, Burgess CC, Obar RA, Vallee RB (1993) Effects of mutant rat dynamin on endocytosis. *J Cell Biol* 122:565-578.
- Herz J, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepohl H, Stanley KK (1988) Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J* 7:4119-4127.
- Heske J, Heller U, Winklhofer KF, Tatzelt J (2004) The C-terminal globular domain of the prion protein is necessary and sufficient for import into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 279:5435-5443.
- Heun P (2007) SUMO organization of the nucleus. *Curr Opin Cell Biol* 19:350-355.
- Hill AF, Joiner S, Linehan J, Desbruslais M, Lantos PL, Collinge J (2000) Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10248-10253.
- Horn IR, van den Berg BM, Moestrup SK, Pannekoek H, van Zonneveld AJ (1998) Plasminogen activator inhibitor 1 contains a cryptic high affinity receptor binding site that is exposed upon complex formation with tissue-type plasminogen activator. *Thromb Haemost* 80:822-828.
- Howe CL, Valletta JS, Rusnak AS, Mobley WC (2001) NGF signaling from clathrin-coated vesicles: evidence that signaling endosomes serve as a platform for the Ras-MAPK pathway. *Neuron* 32:801-814.
- Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72:609-642.
- Ihara M, Yamamoto H, Kikuchi A (2005) SUMO-1 modification of PIASy, an E3 ligase, is necessary for PIASy-dependent activation of Tcf-4. *Mol Cell Biol* 25:3506-3518.
- Jeggio P, Lavin MF (2009) Cellular radiosensitivity: how much better do we understand it? *Int J Radiat Biol* 85:1061-1081.

- Jen A, Parkyn CJ, Mootoosamy RC, Ford MJ, Warley A, Liu Q, Bu G, Baskakov IV, Moestrup S, McGuinness L, Emptage N, Morris RJ (2010) Neuronal low-density lipoprotein receptor-related protein 1 binds and endocytoses prion fibrils via receptor cluster 4. *J Cell Sci* 123:246-255.
- Johnson ES (2004) Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* 73:355-382.
- Johnson ES, Schwienhorst I, Dohmen RJ, Blobel G (1997) The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. *EMBO J* 16:5509-5519.
- Johnson LS, Dunn KW, Pytowski B, McGraw TE (1993) Endosome acidification and receptor trafficking: bafilomycin A1 slows receptor externalization by a mechanism involving the receptor's internalization motif. *Mol Biol Cell* 4:1251-1266.
- Juanes ME, Elvira G, Garcia-Grande A, Calero M, Gasset M (2009) Biosynthesis of prion protein nucleocytoplasmic isoforms by alternative initiation of translation. *J Biol Chem* 284:2787-2794.
- Kagey MH, Melhuish TA, Wotton D (2003) The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* 113:127-137.
- Kaneko H, Igarashi K, Kataoka K, Miura M (2005) Heat shock induces phosphorylation of histone H2AX in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 328:1101-1106.
- Kang YS, Zhao X, Lovaas J, Eisenberg E, Greene LE (2009) Clathrin-independent internalization of normal cellular prion protein in neuroblastoma cells is associated with the Arf6 pathway. *J Cell Sci* 122:4062-4069.
- Katzmann DJ, Babst M, Emr SD (2001) Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 106:145-155.
- Kerppola TK (2009) Polycomb group complexes--many combinations, many functions. *Trends Cell Biol* 19:692-704.
- Khosravani H, Zhang Y, Tsutsui S, Hameed S, Altier C, Hamid J, Chen L, Villemare M, Ali Z, Jirik FR, Zamponi GW (2008a) Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. *J Gen Physiol* 131:i5.
- Khosravani H, Zhang Y, Zamponi GW (2008b) Cellular prion protein null mice display normal AMPA receptor mediated long term depression. *Prion* 2:48-50.
- Kirkham M, Parton RG (2005) Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim Biophys Acta* 1745:273-286.
- Klein WL (2002a) Aβ toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int* 41:345-352.
- Klein WL (2002b) ADDLs & protofibrils--the missing links? *Neurobiol Aging* 23:231-235.

- Kobayashi T, Stang E, Fang KS, de MP, Parton RG, Gruenberg J (1998) A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* 392:193-197.
- Kolli N, Mikolajczyk J, Drag M, Mukhopadhyay D, Moffatt N, Dasso M, Salvesen G, Wilkinson KD (2010) Distribution and paralogue specificity of mammalian deSUMOylating enzymes. *Biochem J* 430:335-344.
- Kotaja N, Karvonen U, Janne OA, Palvimo JJ (2002) PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. *Mol Cell Biol* 22:5222-5234.
- Lakadamyali M, Rust MJ, Zhuang X (2006) Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes. *Cell* 124:997-1009.
- Lakhan SE, Sabharanjak S, De A (2009) Endocytosis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *J Biomed Sci* 16:93.
- Lauren J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW, Strittmatter SM (2009) Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* 457:1128-1132.
- Le RC, Wrana JL (2005) Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:112-126.
- Lee KS, Martins VR, Zanata SM, Brentani RR, Prado MAM (2001) Internalization of a mammalian fluorescent prion protein involves classical endocytic organelles. *Journal of Neurochemistry* 78:19.
- Lee PS, Chang C, Liu D, Derynck R (2003) Sumoylation of Smad4, the common Smad mediator of transforming growth factor-beta family signaling. *J Biol Chem* 278:27853-27863.
- Lemere CA, Spooner ET, Leverone JF, Mori C, Clements JD (2002) Intranasal immunotherapy for the treatment of Alzheimer's disease: *Escherichia coli* LT and LT(R192G) as mucosal adjuvants. *Neurobiol Aging* 23:991-1000.
- Li A, Christensen HM, Stewart LR, Roth KA, Chiesa R, Harris DA (2007a) Neonatal lethality in transgenic mice expressing prion protein with a deletion of residues 105-125. *EMBO J* 26:548-558.
- Li B, Zhou J, Liu P, Hu J, Jin H, Shimono Y, Takahashi M, Xu G (2007b) Polycomb protein Cbx4 promotes SUMO modification of de novo DNA methyltransferase Dnmt3a. *Biochem J* 405:369-378.
- Liao DF, Jin ZG, Baas AS, Daum G, Gygi SP, Aebersold R, Berk BC (2000) Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 275:189-196.
- Lima FR, Arantes CP, Muras AG, Nomizo R, Brentani RR, Martins VR (2007) Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. *J Neurochem* 103:2164-2176.

- Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR (2008) Physiology of the prion protein. *Physiol Rev* 88:673-728.
- Lindquist S (1986) The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 55:1151-1191.
- Liu B, Liao J, Rao X, Kushner SA, Chung CD, Chang DD, Shuai K (1998) Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10626-10631.
- Longshaw VM, Chapple JP, Balda MS, Cheetham ME, Blatch GL (2004) Nuclear translocation of the Hsp70/Hsp90 organizing protein mSTI1 is regulated by cell cycle kinases. *J Cell Sci* 117:701-710.
- Longshaw VM, Dirr HW, Blatch GL, Lassle M (2000) The in vitro phosphorylation of the co-chaperone mSTI1 by cell cycle kinases substantiates a predicted casein kinase II-p34cdc2-NLS (CcN) motif. *Biol Chem* 381:1133-1138.
- Lopes MH, Hajj GN, Muras AG, Mancini GL, Castro RM, Ribeiro KC, Brentani RR, Linden R, Martins VR (2005) Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neurogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *J Neurosci* 25:11330-11339.
- Lorenzo A, Yankner BA (1996) Amyloid fibril toxicity in Alzheimer's disease and diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 777:89-95.
- Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J (1999) Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 155:853-862.
- Luzio JP, Rous BA, Bright NA, Pryor PR, Mullock BM, Piper RC (2000) Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J Cell Sci* 113 (Pt 9):1515-1524.
- Magalhaes AC, Baron GS, Lee KS, Steele-Mortimer O, Dorward D, Prado MA, Caughey B (2005) Uptake and neuritic transport of scrapie prion protein coincident with infection of neuronal cells. *J Neurosci* 25:5207-5216.
- Magalhaes AC, Silva JA, Lee KS, Martins VR, Prado VF, Ferguson SSG, Gomez MV, Brentani RR, Prado MAM (2002) Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. *Journal of Biological Chemistry* 277:33311-33318.
- Maglio LE, Perez MF, Martins VR, Brentani RR, Ramirez OA (2004) Hippocampal synaptic plasticity in mice devoid of cellular prion protein. *Brain Res Mol Brain Res* 131:58-64.
- Mahajan R, Delphin C, Guan T, Gerace L, Melchior F (1997) A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88:97-107.
- Mallucci G, Dickinson A, Linehan J, Klohn PC, Brandner S, Collinge J (2003) Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science* 302:871-874.

- Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J (1994) 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol* 8:121-127.
- Marella M, Lehmann S, Grassi J, Chabry J (2002) Filipin prevents pathological prion protein accumulation by reducing endocytosis and inducing cellular PrP release. *J Biol Chem* 277:25457-25464.
- Martin N, Schwamborn K, Urlaub H, Gan B, Guan JL, Dejean A (2008) Spatial interplay between PIASy and FIP200 in the regulation of signal transduction and transcriptional activity. *Mol Cell Biol* 28:2771-2781.
- Martin S, Nishimune A, Mellor JR, Henley JM (2007a) SUMOylation regulates kainate-receptor-mediated synaptic transmission. *Nature* 447:321-325.
- Martin S, Wilkinson KA, Nishimune A, Henley JM (2007b) Emerging extranuclear roles of protein SUMOylation in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci* 8:948-959.
- Martins VR, Beraldo FH, Hajj GN, Lopes MH, Lee KS, Prado MM, Linden R (2009) Prion Protein: Orchestrating Neurotrophic Activities. *Curr Issues Mol Biol* 12:63-86.
- Martins VR, Graner E, Garcia-Abreu J, de Souza SJ, Mercadante AF, Veiga SS, Zanata SM, Neto VM, Brentani RR (1997) Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. *Nat Med* 3:1376-1382.
- Matsuura T, Shimono Y, Kawai K, Murakami H, Urano T, Niwa Y, Goto H, Takahashi M (2005) PIAS proteins are involved in the SUMO-1 modification, intracellular translocation and transcriptional repressive activity of RET finger protein. *Exp Cell Res* 308:65-77.
- Maxfield FR, McGraw TE (2004) Endocytic recycling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5:121-132.
- Mayor S, Riezman H (2004) Sorting GPI-anchored proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:110-120.
- McClellan AJ, Tam S, Kaganovich D, Frydman J (2005) Protein quality control: chaperones culling corrupt conformations. *Nat Cell Biol* 7:736-741.
- McKinley MP, Taraboulos A, Kenaga L, Serban D, Stieber A, DeArmond SJ, Prusiner SB, Gonas N (1991) Ultrastructural localization of scrapie prion proteins in cytoplasmic vesicles of infected cultured cells. *Lab Invest* 65:622-630.
- McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL (1999) Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 46:860-866.
- McMahon HT (1999) Endocytosis: an assembly protein for clathrin cages. *Curr Biol* 9:R332-R335.
- Mellman I (1996) Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:575-625.

- Merrill JC, Melhuish TA, Kagey MH, Yang SH, Sharrocks AD, Wotton D (2010) A role for non-covalent SUMO interaction motifs in Pc2/CBX4 E3 activity. *PLoS ONE* 5:e8794.
- Moilanen AM, Karvonen U, Poukka H, Yan W, Toppari J, Janne OA, Palvimo JJ (1999) A testis-specific androgen receptor coregulator that belongs to a novel family of nuclear proteins. *J Biol Chem* 274:3700-3704.
- Morris JR (2010) SUMO in the mammalian response to DNA damage. *Biochem Soc Trans* 38:92-97.
- Morris JR, Boutell C, Keppler M, Densham R, Weekes D, Alamshah A, Butler L, Galanty Y, Pangon L, Kiuchi T, Ng T, Solomon E (2009) The SUMO modification pathway is involved in the BRCA1 response to genotoxic stress. *Nature* 462:886-890.
- Morris RJ, Parkyn CJ, Jen A (2006) Traffic of prion protein between different compartments on the neuronal surface, and the propagation of prion disease. *FEBS Lett* 580:5565-5571.
- Moschos SJ, Jukic DM, Athanassiou C, Bhargava R, Dacic S, Wang X, Kuan SF, Fayewicz SL, Galambos C, Acquafondata M, Dhir R, Becker D (2010) Expression analysis of Ubc9, the single small ubiquitin-like modifier (SUMO) E2 conjugating enzyme, in normal and malignant tissues. *Hum Pathol*.
- Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, Laplanche JL, Lehmann S, Launay JM, Kellermann O (2000) Signal transduction through prion protein. *Science* 289:1925-1928.
- Mousavi SA, Malerod L, Berg T, Kjekken R (2004) Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J* 377:1-16.
- Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR (1997) Endocytosis. *Physiol Rev* 77:759-803.
- Mullins C, Bonifacino JS (2001) The molecular machinery for lysosome biogenesis. *Bioessays* 23:333-343.
- Muramoto T, DeArmond SJ, Scott M, Telling GC, Cohen FE, Prusiner SB (1997) Heritable disorder resembling neuronal storage disease in mice expressing prion protein with deletion of an alpha-helix. *Nat Med* 3:750-755.
- Muratoglu SC, Mikhailenko I, Newton C, Migliorini M, Strickland DK (2010) Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) forms a signaling complex with platelet-derived growth factor receptor-beta in endosomes and regulates activation of the MAPK pathway. *J Biol Chem* 285:14308-14317.
- Nacerddine K, Lehembre F, Bhaumik M, Artus J, Cohen-Tannoudji M, Babinet C, Pandolfi PP, Dejean A (2005) The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. *Dev Cell* 9:769-779.
- Nichols BJ (2002) A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex. *Nat Cell Biol* 4:374-378.
- Nichols BJ, Lippincott-Schwartz J (2001) Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol* 11:406-412.

- Nickel W, Rabouille C (2009) Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:148-155.
- Nickel W, Seedorf M (2008) Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24:287-308.
- Nicolet CM, Craig EA (1989) Isolation and characterization of STII, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 9:3638-3646.
- Ondrejcek T, Klyubin I, Hu NW, Barry AE, Cullen WK, Rowan MJ (2010) Alzheimer's disease amyloid beta-protein and synaptic function. *Neuromolecular Med* 12:13-26.
- Palvimo JJ (2007) PIAS proteins as regulators of small ubiquitin-related modifier (SUMO) modifications and transcription. *Biochem Soc Trans* 35:1405-1408.
- Parkyn CJ, Vermeulen EG, Mootoosamy RC, Sunyach C, Jacobsen C, Oxvig C, Moestrup S, Liu Q, Bu G, Jen A, Morris RJ (2008) LRP1 controls biosynthetic and endocytic trafficking of neuronal prion protein. *J Cell Sci* 121:773-783.
- Parkyn ET, Watt NT, Hussain I, Eckman EA, Eckman CB, Manson JC, Baybutt HN, Turner AJ, Hooper NM (2007) Cellular Prion Protein regulates β -secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *PNAS* 104 (26): 11062-11067.
- Parton RG, Richards AA (2003) Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic* 4:724-738.
- Pauly PC, Harris DA (1998) Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *Journal of Biological Chemistry* 273:33107-33110.
- Pelkmans L, Burli T, Zerial M, Helenius A (2004) Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell* 118:767-780.
- Pelkmans L, Helenius A (2003) Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 15:414-422.
- Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A (2001) Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* 3:473-483.
- Perera WS, Hooper NM (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 PJ, Mironov A, Jr., Peretz D, van Donselaar E, Leclerc E, Erpel S, DeArmond SJ, Burton DR, Williamson RA, Vey M, Prusiner SB (2003) Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J Cell Biol* 162:703-717.
- Pfeffer S, Aivazian D (2004) Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:886-896.
- Pfeffer SR (2001) Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function. *Trends Cell Biol* 11:487-491.

- Pimpinelli F, Lehmann S, Maridonneau-Parini I (2005) The scrapie prion protein is present in flotillin-1-positive vesicles in central- but not peripheral-derived neuronal cell lines. *Eur J Neurosci* 21:2063-2072.
- Pinheiro TJ (2006) The role of rafts in the fibrillization and aggregation of prions. *Chem Phys Lipids* 141:66-71.
- Piper RC, Luzio JP (2001) Late endosomes: sorting and partitioning in multivesicular bodies. *Traffic* 2:612-621.
- Pol A, Calvo M, Lu A, Enrich C (2000) EGF triggers caveolin redistribution from the plasma membrane to the early/sorting endocytic compartment of hepatocytes. *Cell Signal* 12:537-540.
- Prado MAM, Alves-Silva J, Magalhaes AC, Prado VF, Linden R, Martins VR, Brentani RR (2004) PrPc on the road: trafficking of the cellular prion protein. *Journal of Neurochemistry* 88:769-781.
- Pratt WB, Toft DO (1997) Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 18:306-360.
- Prestori F, Rossi P, Bearzatto B, Laine J, Necchi D, Diwakar S, Schiffmann SN, Axelrad H, D'Angelo E (2008) Altered neuron excitability and synaptic plasticity in the cerebellar granular layer of juvenile prion protein knock-out mice with impaired motor control. *J Neurosci* 28:7091-7103.
- Priola SA, McNally KL (2009) The role of the prion protein membrane anchor in prion infection. *Prion* 3:134-138.
- Prusiner SB (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216:136-144.
- Prusiner SB (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13363-13383.
- Rajendran L, Simons K (2005) Lipid rafts and membrane dynamics. *Journal of Cell Science* 118:1099-1102.
- Rebola N, Srikumar BN, Mulle C (2010) Activity-dependent synaptic plasticity of NMDA receptors. *J Physiol* 588:93-99.
- Renner F, Moreno R, Schmitz ML (2010a) SUMOylation-dependent localization of IKKepsilon in PML nuclear bodies is essential for protection against DNA-damage-triggered cell death. *Mol Cell* 37:503-515.
- Renner M, Lacor PN, Velasco PT, Xu J, Contractor A, Klein WL, Triller A (2010b) Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5. *Neuron* 66:739-754.
- Rieger R, Edenhofer F, Lasmezas CI, Weiss S (1997) The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat Med* 3:1383-1388.

- Robinson MB, Tidwell JL, Gould T, Taylor AR, Newbern JM, Graves J, Tytell M, Milligan CE (2005) Extracellular heat shock protein 70: a critical component for motoneuron survival. *J Neurosci* 25:9735-9745.
- Rodal SK, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van DB, Sandvig K (1999) Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell* 10:961-974.
- Roffe M, Beraldo FH, Bester R, Nunziante M, Bach C, Mancini G, Gilch S, Vorberg I, Castilho BA, Martins VR, Hajj GN (2010) Prion protein interaction with stress-inducible protein 1 enhances neuronal protein synthesis via mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:13147-13152.
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 146:905-916.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273:5858-5868.
- Roscic A, Moller A, Calzado MA, Renner F, Wimmer VC, Gresko E, Ludi KS, Schmitz ML (2006) Phosphorylation-dependent control of Pc2 SUMO E3 ligase activity by its substrate protein HIPK2. *Mol Cell* 24:77-89.
- Roth W, Sustmann C, Kieslinger M, Gilmozzi A, Irmer D, Kremmer E, Turck C, Grosschedl R (2004) PIASy-deficient mice display modest defects in IFN and Wnt signaling. *J Immunol* 173:6189-6199.
- Rudd PM, Wormald MR, Wing DR, Prusiner SB, Dwek RA (2001) Prion glycoprotein: structure, dynamics, and roles for the sugars. *Biochemistry* 40:3759-3766.
- Rytinki MM, Kaikkonen S, Pehkonen P, Jaaskelainen T, Palvimo JJ (2009) PIAS proteins: pleiotropic interactors associated with SUMO. *Cell Mol Life Sci* 66:3029-3041.
- Sabharanjak S, Sharma P, Parton RG, Mayor S (2002) GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Dev Cell* 2:411-423.
- Sachdev S, Bruhn L, Sieber H, Pichler A, Melchior F, Grosschedl R (2001) PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev* 15:3088-3103.
- Saitoh H, Hinchey J (2000) Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem* 275:6252-6258.
- Sakudo A, Lee DC, Li S, Nakamura T, Matsumoto Y, Saeki K, Itohara S, Ikuta K, Onodera T (2005) PrP cooperates with STII to regulate SOD activity in PrP-deficient neuronal cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 328:14-19.
- Sales N, Hassig R, Rodolfo K, Di GL, Traiffort E, Ruat M, Fretier P, Moya KL (2002) Developmental expression of the cellular prion protein in elongating axons. *Eur J Neurosci* 15:1163-1177.

- Santuccione A, Sytnyk V, Leshchyns'ka I, Schachner M (2005) Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59^{fyn} and to enhance neurite outgrowth. *J Cell Biol* 169:341-354.
- Sarge KD, Park-Sarge OK (2009) Sumoylation and human disease pathogenesis. *Trends Biochem Sci* 34:200-205.
- Scheufler C, Brinker A, Bourenkov G, Pegoraro S, Moroder L, Bartunik H, Hartl FU, Moarefi I (2000) Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* 101:199-210.
- Schimmoller F, Simon I, Pfeffer SR (1998) Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J Biol Chem* 273:22161-22164.
- Schmidt AA (2002) Membrane transport: the making of a vesicle. *Nature* 419:347-349.
- Schuettengruber B, Cavalli G (2009) Recruitment of polycomb group complexes and their role in the dynamic regulation of cell fate choice. *Development* 136:3531-3542.
- Shi Y, Mantuano E, Inoue G, Campana WM, Gonias SL (2009) Ligand binding to LRP1 transactivates Trk receptors by a Src family kinase-dependent pathway. *Sci Signal* 2:ra18.
- Shmerling D, Hegyi I, Fischer M, Blattler T, Brandner S, Gotz J, Rulicke T, Flechsig E, Cozzio A, von Mering C, Hangartner C, Aguzzi A, Weissmann C (1998) Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell* 93:203-214.
- Shyng SL, Heuser JE, Harris DA (1994) A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J Cell Biol* 125:1239-1250.
- Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572.
- Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1:31-39.
- Somsel RJ, Wandinger-Ness A (2000) Rab GTPases coordinate endocytosis. *J Cell Sci* 113 Pt 2:183-192.
- Song HO, Lee W, An K, Lee HS, Cho JH, Park ZY, Ahn J (2009) *C. elegans* STI-1, the homolog of Stt1/Hop, is involved in aging and stress response. *J Mol Biol* 390:604-617.
- Song Y, Masison DC (2005) Independent regulation of Hsp70 and Hsp90 chaperones by Hsp70/Hsp90-organizing protein Stt1 (Hop1). *J Biol Chem* 280:34178-34185.
- Stahl A, Mueller BM (1995) The urokinase-type plasminogen activator receptor, a GPI-linked protein, is localized in caveolae. *J Cell Biol* 129:335-344.
- Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB (1987) Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51:229-240.
- Stahl N, Prusiner SB (1991) Prions and prion proteins. *FASEB J* 5:2799-2807.

- Stehmeier P, Muller S (2009) Phospho-regulated SUMO interaction modules connect the SUMO system to CK2 signaling. *Mol Cell* 33:400-409.
- Stockel J, Safar J, Wallace AC, Cohen FE, Prusiner SB (1998) Prion protein selectively binds copper(II) ions. *Biochemistry* 37:7185-7193.
- Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ, Raposo G (2002) The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic* 3:321-330.
- Stuermer CA, Langhorst MF, Wiechers MF, Legler DF, Von Hanwehr SH, Guse AH, Plattner H (2004) PrPc capping in T cells promotes its association with the lipid raft proteins reggie-1 and reggie-2 and leads to signal transduction. *FASEB J* 18:1731-1733.
- Subtil A, Gaidarov I, Kobylarz K, Lampson MA, Keen JH, McGraw TE (1999) Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6775-6780.
- Sunyach C, Checler F (2005) Combined pharmacological, mutational and cell biology approaches indicate that p53-dependent caspase 3 activation triggered by cellular prion is dependent on its endocytosis. *J Neurochem* 92:1399-1407.
- Sunyach C, Jen A, Deng J, Fitzgerald KT, Frobert Y, Grassi J, McCaffrey MW, Morris R (2003) The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *Embo Journal* 22:3591-3601.
- Takahashi Y, Iwase M, Strunnikov AV, Kikuchi Y (2008) Cytoplasmic sumoylation by PIAS-type Siz1-SUMO ligase. *Cell Cycle* 7:1738-1744.
- Tan JA, Hall SH, Hamil KG, Grossman G, Petrusz P, French FS (2002) Protein inhibitors of activated STAT resemble scaffold attachment factors and function as interacting nuclear receptor coregulators. *J Biol Chem* 277:16993-17001.
- Tatham MH, Jaffray E, Vaughan OA, Desterro JM, Botting CH, Naismith JH, Hay RT (2001) Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem* 276:35368-35374.
- Taylor DR, Hooper NM (2007a) Role of lipid rafts in the processing of the pathogenic prion and Alzheimer's amyloid-beta proteins. *Semin Cell Dev Biol* 18:638-648.
- Taylor DR, Hooper NM (2007b) The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) mediates the endocytosis of the cellular prion protein. *Biochem J* 402:17-23.
- Taylor DR, Watt NT, Perera WS, Hooper NM (2005) Assigning functions to distinct regions of the N-terminus of the prion protein that are involved in its copper-stimulated, clathrin-dependent endocytosis. *J Cell Sci* 118:5141-5153.
- Terry RD (1996) The pathogenesis of Alzheimer disease: an alternative to the amyloid hypothesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:1023-1025.
- Thakar K, Niedenthal R, Okaz E, Franken S, Jakobs A, Gupta S, Kelm S, Dietz F (2008) SUMOylation of the hepatoma-derived growth factor negatively influences its binding to chromatin. *FEBS J* 275:1411-1426.

- Thery C, Zitvogel L, Amigorena S (2002) Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2:569-579.
- Torgersen ML, Skretting G, van DB, Sandvig K (2001) Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms. *J Cell Sci* 114:3737-3747.
- Trowbridge IS, Collawn JF, Hopkins CR (1993) Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu Rev Cell Biol* 9:129-161.
- Turk E, Teplow DB, Hood LE, Prusiner SB (1988) Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. *Eur J Biochem* 176:21-30.
- van der Blik AM, Redelmeier TE, Danke H, Tisdale EJ, Meyerowitz EM, Schmid SL (1993) Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *J Cell Biol* 122:553-563.
- van der SJ, Kana BD, Dirr HW, Blatch GL (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.
- Vertegaal AC, Andersen JS, Ogg SC, Hay RT, Mann M, Lamond AI (2006) Distinct and overlapping sets of SUMO-1 and SUMO-2 target proteins revealed by quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* 5:2298-2310.
- Wadsworth JD, Hill AF, Beck JA, Collinge J (2003) Molecular and clinical classification of human prion disease. *Br Med Bull* 66:241-254.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416:535-539.
- Wang F, Wang X, Yuan CG, Ma J (2010a) Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science* 327:1132-1135.
- Wang G, Zhou X, Bai Y, Zhang Z, Zhao D (2010b) Cellular prion protein released on exosomes from macrophages binds to Hsp70. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 42:345-350.
- Wang HY, Lee DH, D'Andrea MR, Peterson PA, Shank RP, Reitz AB (2000a) beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem* 275:5626-5632.
- Wang HY, Lee DH, Davis CB, Shank RP (2000b) Amyloid peptide Abeta(1-42) binds selectively and with picomolar affinity to alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurochem* 75:1155-1161.
- Wang HY, Stucky A, Liu J, Shen C, Trocme-Thibierge C, Morain P (2009) Dissociating beta-amyloid from alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor by a novel therapeutic agent, S 24795, normalizes alpha 7 nicotinic acetylcholine and NMDA receptor function in Alzheimer's disease brain. *J Neurosci* 29:10961-10973.

- Wang J, Dickson DW, Trojanowski JQ, Lee VM (1999) The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. *Exp Neurol* 158:328-337.
- Warner RG, Hundt C, Weiss S, Turnbull JE (2002) Identification of the heparan sulfate binding sites in the cellular prion protein. *J Biol Chem* 277:18421-18430.
- Welchman RL, Gordon C, Mayer RJ (2005) Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:599-609.
- Wible BA, Yang Q, Kuryshev YA, Accili EA, Brown AM (1998) Cloning and expression of a novel K⁺ channel regulatory protein, KChAP. *J Biol Chem* 273:11745-11751.
- Wilkinson KA, Henley JM (2010) Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem J* 428:133-145.
- Wotton D, Merrill JC (2007) Pc2 and SUMOylation. *Biochem Soc Trans* 35:1401-1404.
- Yamamoto H, Ihara M, Matsuura Y, Kikuchi A (2003) Sumoylation is involved in beta-catenin-dependent activation of Tcf-4. *EMBO J* 22:2047-2059.
- Yedidia Y, Horonchik L, Tzaban S, Yanai A, Taraboulos A (2001) Proteasomes and ubiquitin are involved in the turnover of the wild-type prion protein. *EMBO J* 20:5383-5391.
- Young JC, Agashe VR, Siegers K, Hartl FU (2004) Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:781-791.
- Young KF, Pasternak SH, Rylett RJ (2009) Oligomeric aggregates of amyloid beta peptide 1-42 activate ERK/MAPK in SH-SY5Y cells via the alpha7 nicotinic receptor. *Neurochem Int* 55:796-801.
- 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.
- Zhao X, Blobel G (2005) A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:4777-4782.
- Zhou S, Si J, Liu T, DeWille JW (2008) PIASy represses CCAAT/enhancer-binding protein delta (C/EBPdelta) transcriptional activity by sequestering C/EBPdelta to the nuclear periphery. *J Biol Chem* 283:20137-20148.