

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**Envolvimento da proteína prion celular em
processos de aprendizado, memória e
outros parâmetros comportamentais**

Adriana Simon Coitinho
Orientador: Dr. Ivan Izquierdo

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas Bioquímica

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Porto Alegre, março 2004

"Toda experiência histórica confirma esta verdade: o homem não teria alcançado o possível se, repetidas vezes, não tivesse tentado o impossível. "

Max Weber

Lista de Abreviaturas

BSE – encefalopatia espongiforme bovina

CJD – Doença de Creutzfeldt-Jakob

EET - encefalopatia espongiforme transmissível

LN - laminina

LTM – memória de longa-duração

MAPK - proteína quinase ativada por mitógeno

PC – peptídeo complementar

PKA – proteína quinase dependente de cAMP

Prnp^{0/0} – camundongo que não expressa a proteína prion celular

Prnp^{+/+} - camundongo que expressa a proteína prion celular

PrP^c – proteína prion celular

PrP^{sc} – forma infecciosa da proteína prion celular

STI1 – stress-inducible protein 1

STM – memória de curta-duração

vCDJ – nova variante da doença de Creutzfeldt-Jakob

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Vilson e Ana, pelo constante incentivo, carinho e apoio.

Ao querido mestre, Ivan Izquierdo, pela oportunidade de trabalhar no grupo e de compartilhar seus grandes ensinamentos.

À Vilma Martins pela incansável orientação (mesmo à distância), dedicação, apoio, paciência e atenção que foram fundamentais no desenvolvimento deste trabalho.

À Adriana Freitas pela grande interação e amizade que criamos durante este período.

Ao Dr. Ricardo Brentani pela oportunidade de colaborar e interagir com seu grupo de pesquisa.

A todos do Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer (SP) pelo ótimo acolhimento durante os períodos em que lá estive.

Ao Cris e sua família por toda a força, carinho e ajuda em todos os momentos.

A todos da minha família que sempre me incentivaram e acreditaram em mim.

Aos colegas do centro de memória, em especial Mônica Vianna, Cibele Castro e Janine Rossato.

Às minhas queridas amigas pelo constante incentivo.

Ao Roger Walz e Rafael Roesler pelo incentivo de trabalhar no assunto desenvolvido.

Ao Diogo Lara e seus bolsistas pelo trabalho que realizamos juntos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRGS.

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida.

À UFRGS por propiciar toda a minha formação profissional.

ÍNDICE

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	9
INTRODUÇÃO.....	10
OBJETIVOS.....	26
CAPÍTULO I	
Interação da proteína prion celular com a laminina está envolvida na formação da memória através das vias da PKA e da MAPK.....	27
CAPÍTULO II	
A interação PrP ^c -STI1 está envolvida na consolidação da memória.....	60
CAPÍTULO III	
A exclusão da proteína prion celular leva a prejuízos comportamentais em função da idade.....	74
CAPÍTULO IV	
Hiperlocomoção induzida por MK-801, mas não por anfetamina e cafeína está diminuída em camundongos que não expressam a proteína prion celular.....	81
DISCUSSÃO.....	88
CONCLUSÕES.....	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

RESUMO

Prion é o agente infeccioso responsável por doenças neurodegenerativas conhecidas como encefalopatias espongiformes transmissíveis (EET), que atingem tanto o homem quanto outros animais. A partícula infecciosa é composta por PrP^{Sc} que é uma isoforma anormal de uma proteína celular normal, PrP^C, ligada a superfície celular por uma âncora de glicosilfosfatidil inositol que é expressa na maioria das células, mas principalmente nos neurônios. As doenças causadas por prions tem sido associadas com o acúmulo da forma anormal da proteína e seus efeitos tóxicos, porém não se sabe se a perda da função de PrP^C é um componente importante. O objetivo principal desta tese foi caracterizar o envolvimento de PrP^C nos eventos celulares e moleculares necessários para a formação da memória da tarefa de esquiva inibitória no hipocampo. Além disso, também investigamos o efeito da administração de MK-801, anfetamina e cafeína na atividade locomotora de camundongos *knockout* para PrP^C (*Prnp*^{0/0}) e controles. Os resultados demonstram que PrP^C é crucial para a consolidação da memória de curta (STM) e longa duração (LTM). Demonstramos que a interação PrP^C-laminina exerce um papel fundamental na formação da memória através da ativação de duas vias sinalizadoras clássicas, da proteína quinase A (PKA) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Além disso, a interação entre PrP^C e a proteína STI1 (stress inducible protein I)

também exerce um papel importante na memória. Adicionalmente, mostramos que camundongos Prnp^{0/0} e ratos com 9 meses de idade infundidos com um anticorpo anti-PrP^c apresentaram prejuízo na STM e LTM. O entendimento da função do PrP^c na memória pode ajudar a caracterização de aspectos biológicos das EET e identificar candidatos a fármacos para terapia.

Palavras-chave: memória, proteína prion celular, STI1, laminina, MK-801, anfetamina, cafeína

ABSTRACT

Prions are the infectious agent responsible for neurodegenerative diseases named transmissible spongiform encephalopathies (TSE), which affect both humans and animals. The infectious particle is composed by PrP^{Sc}, an abnormal isoform of a normal cellular glycosyl-phosphatidylinositol anchored protein, PrP^C, expressed in most cell types but mainly in neurons. Prion diseases have been associated with the accumulation of the abnormal folded protein and its neurotoxic effects; however, it is not known if PrP^C loss of function is an important component. This thesis aimed to characterize the involvement of PrP^C on cellular and molecular events necessary for memory formation of the inhibitory avoidance task in the hippocampus. Moreover, we also investigated the effect of psychotropic drugs in locomotor activity of PrP^C knockout (Prnp^{0/0}) and wild-type mice. Taken together the results demonstrate that PrP^C is crucial to consolidation of short (STM) and long-term memory (LTM). We demonstrated that PrP^C-laminin interaction plays a pivotal role in memory formation through activation of classical signaling pathways, protein kinase A (PKA) and mitogen-activated protein kinases (MAPK). Furthermore, a PrP^C-STI1 (stress inducible protein 1) interaction also plays an important role on memory. Additionally, we show that 9 month-old Prnp^{0/0} mice and rats infused

with anti-PrP^c antibody showed an important impairment of STM and LTM. The understanding of the PrP^c function on memory formation can help the characterization of the biological aspects of TSE and identify candidate drugs for its therapy.

Key-words: memory, cellular prion protein, laminin, STI-1, MK-801, amphetamine, caffeine

I. INTRODUÇÃO

1.1 MEMÓRIA

A capacidade de aprender e recordar eventos depende de modificações induzidas no sistema nervoso pela percepção destes eventos. Definimos como aprendizado o processo pelo qual adquirimos conhecimentos, enquanto memória é o processo pelo qual o conhecimento é adquirido, consolidado e evocado. Além de sua importância biológica evolutiva, a memória representa a base de nossa identidade.

Existem várias classificações para as memórias. De acordo com seu conteúdo são classificadas em declarativas ou explícitas e procedurais ou implícitas (Squire & Zola, 1996; Thompson & Kim, 1996; Markowitsch *et al.*, 1997). As memórias declarativas ou explícitas são adquiridas e evocadas conscientemente e muitas vezes com grande rapidez, e dependem da integridade funcional das estruturas do lobo temporal medial, especialmente do hipocampo. Já as memórias ditas procedurais ou implícitas são adquiridas gradativamente e, além disso, evocadas de modo inconsciente; envolvem habilidades motoras e/ou sensoriais, também chamadas "hábitos" (Eichenbaum, 1996; Moser & Moser, 1998; Lorenzini *et al.*, 1996).

As memórias também são classificadas de acordo com o tempo durante o qual são armazenadas em: a) memórias de curta-duração (STM), que duram no máximo 3-6 horas após o aprendizado; b) memórias de longa-duração (LTM), que permanecem dias, anos ou mesmo uma vida inteira, passando a ser denominadas nesse último caso de memórias remotas (Izquierdo *et al.*, 1999; Rosenzweig *et al.*, 1993; Fuster, 1998). Existe um terceiro tipo de memória, a memória de trabalho ou operacional, que dura segundos ou, no máximo poucos minutos; é processada pelo córtex prefrontal e suas conexões e serve para poder formar e evocar STMs e LTMs (Fuster, 1998). Estudos farmacológicos realizados por nosso grupo demonstraram que a STM e a LTM são processos independentes (Izquierdo *et al.*, 1998 a,b,c, 1999).

Algumas das estruturas envolvidas na STM e LTM já foram identificadas; a área CA1 do hipocampo, o córtex entorrinal necessários para ambas e o córtex prefrontal, parietal e cingulado são fundamentais para a formação de LTMs (Izquierdo & Medina, 1997, Izquierdo *et al.*, 1998 a,b,c). A amígdala é responsável pela modulação de memórias de longa duração que apresentam conteúdo emocional (Bianchin *et al.*, 1999; Cahill & McGaugh, 1998). Estas estruturas estão todas interconetadas entre si através do córtex entorrinal (Hyman *et al.*, 1990) e a interconexão é funcionalmente ativa (Iijima *et al.*, 1996).

Vários sistemas de neurotransmissores além de mecanismos bioquímicos e moleculares participam dos processos de aquisição, consolidação e evocação tanto da STM quanto da LTM. Entretanto, no que diz respeito a cascatas de transdução de sinal, sabe-se que a participação das vias cAMP/PKA/MAPK/CREB ocorre em momentos bastante específicos. A proteína quinase A (PKA) hipocampal é crucial na STM entre 0 e 90 minutos após o treino na tarefa de esquivas inibitória, enquanto que para a LTM da mesma tarefa, é requerida duas vezes: 0-5 e 180-360 minutos após o treino (Bernabeu *et al.*, 1997; Izquierdo & McGaugh, 2000; Vianna *et al.*, 2000). Além da PKA, a cascata da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) também é ativada em momentos específicos para a formação da memória de curta e longa duração. No hipocampo essa enzima é ativada imediatamente após o treino para a STM, enquanto que na LTM a ativação ocorre 3-6 horas após (Vianna *et al.*, 2000).

1.2 Prions e a proteína prion celular

1.2.1. Histórico

Stanley Prusiner e seus colaboradores isolaram partículas infecciosas presentes no cérebro de hamsters experimentalmente infectados e de pacientes com a doença de Creutzfeldt-Jakob (Gibbs *et*

al., 1968; Prusiner *et al.* 1982, 1983). A partícula purificada mostrou-se resistente a agentes que degradavam ácidos nucléicos e ao mesmo tempo sensível a outros que desnaturavam proteínas, o que levou Prusiner, em 1982, a chamá-lo de "proteinaceous infectious particles" ou prions.

Anticorpos monoclonais foram obtidos a partir de partículas infecciosas purificadas. Curiosamente, estes anticorpos reconheceram uma proteína presente tanto no cérebro de animais normais como nos infectados (Oesch *et al.*, 1985; Barry & Prusiner, 1986). Este fato levou a conclusão de que existia uma isoforma celular normal da proteína infecciosa.

1.2.2. O prion

O prion é o agente de doenças conhecidas como encefalopatias espongiformes transmissíveis (EET) que podem afetar o homem e outros animais. A partícula infecciosa é uma isoforma de uma proteína normal presente na superfície celular ligada por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol. A proteína que é expressa constitutivamente e em altas concentrações no sistema nervoso central foi denominada de prion celular (PrP^C), enquanto a forma infecciosa foi chamada de prion *scrapie* (PrP^{Sc}) (Martins, 1999).

A natureza físico-química dos prions tem sido intensamente estudada. Observou-se sua resistência a altas temperaturas, a tratamentos desnaturantes e a radiações ultravioleta e raios X, o que levou muitos pesquisadores a propor que era composto apenas por proteína, sem nenhum ácido nucléico. Tal característica o distingue de todos os agentes patogênicos conhecidos até o momento (Martins *et al.*, 2000).

Não existe diferença na seqüência de aminoácidos que codifica PrP^{Sc} e PrP^C, mas estes diferem na conformação espacial. A isoforma celular apresenta-se predominantemente sob a forma de α -hélice, enquanto a patológica sob a forma de folha β -pregueada (Pan *et al.*, 1993).

Os genes que codificam a proteína prion celular do homem e de hamster, camundongo, rato, cabra e galinha já foram seqüenciados (Kretzchmar *et al.*, 1986; Basler *et al.*, 1986; Lochter *et al.*, 1986; Westaway *et al.*, 1987; Liao *et al.*, 1987; Harris *et al.*, 1991). Estes codificam proteínas de aproximadamente 250 aminoácidos, com um peptídeo sinalizador de 22 aminoácidos na extremidade amino terminal e um peptídeo hidrofóbico de 23 aminoácidos na porção carboxi-terminal, o qual é removido durante a adição da âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Martins *et al.*, 2000).

Stanley Prusiner (1989) propôs que o prion, ao ser introduzido em células normais, converteria moléculas de PrP^c em PrP^{sc} através da formação de dímeros. Neste estudo, sugere-se que a ligação do PrP^{sc} ao PrP^c poderia impor uma mudança de conformação neste último, transformando-o em outra molécula de PrP^{sc}. Portanto, este modelo sugere que novas moléculas de PrP^{sc} são exponencialmente geradas a partir de PrP^c. Uma das hipóteses é que a morte neuronal provavelmente ocorre devido ao acúmulo de PrP^{sc} insolúvel, que é altamente tóxica (Prusiner, 1989).

A participação de PrP^c na infecção é absolutamente necessária uma vez que estudos demonstraram que animais nos quais seu gene foi deletado e, portanto, que não expressavam a proteína, eram totalmente resistentes à infecção por prions. Além disso, a re-introdução do gene de PrP^c nestes animais permitiu o desenvolvimento da infecção (Büeler *et al.*, 1993).

As moléculas de prion não apresentam sempre o mesmo comportamento, podendo diferir no tempo de incubação necessário para produzir a doença e na distribuição das lesões no cérebro. Devido a isto, postulou-se que existam diferentes "cepas" de prions e questionou-se como uma única proteína poderia ser responsável por uma grande variedade fenotípica (Martins *et al.*, 2000). A hipótese conformacional postula que cada "cepa" está associada a uma diferente conformação de

PrP^{Sc} e cada uma delas pode converter PrP^C a uma conformação semelhante à sua (Aguzzi & Weissmann, 1997). Trabalhos mais recentes mostram ainda que o padrão de glicosilação da proteína pode ser um determinante das "cepas" (Wechselberger *et al.*, 2002).

O Prp^C é uma proteína extremamente conservada evolutivamente sugerindo, desta forma, que possua uma função celular importante, fato que promove uma série de investigações a respeito de suas propriedades fisiológicas.

1.2.3 Mecanismo de infecção por PrP^{Sc}

A conversão conformacional de PrP^C em PrP^{Sc} é o evento molecular fundamental da etiologia das doenças causadas por prions. De acordo com a hipótese corrente, os prions são compostos de PrP^{Sc} que se auto-propaga por induzir sua conformação anormal a PrP^C, gerando novas moléculas infecciosas em uma reação auto-catalítica (Cohen & Prusiner, 1998).

Modelos animais de infecção por prions indicam um envolvimento das células linforeticulares no processo, uma vez que nelas ocorre uma fase precoce de replicação de PrP^{Sc} antes que este atinja o sistema nervoso central através de células periféricas (Glatzel & Aguzzi, 2001; Wechselberger *et al.*, 2002).

As doenças por prions que apresentam caráter hereditário devem-se a mutações no gene de PrP^c que favorecem a conversão conformacional de uma molécula mutante de PrP^c a PrP^{sc}, sem a necessidade de contato com prions exógenos. Os casos esporádicos devem-se a conversão espontânea e muito rara de moléculas de PrP^c a PrP^{sc} ou, alternativamente, a mutações somáticas muito pouco freqüentes no gene PrP^c (Chiesa & Harris, 2001).

1.2.4. Principais doenças causadas por prions em animais

A mais antiga das doenças causadas por prions em animais é o *scrapie*, doença neurodegenerativa que afeta ovelhas e cabras. Os sintomas observados nestes animais incluem ataxia, excitabilidade, prurido, paralisia e morte dentro de pouco tempo.

A encefalopatia espongiforme bovina (BSE), popularmente conhecida como "doença da vaca louca", é uma doença do sistema nervoso central de bovinos provocada por prions. O primeiro caso relatado de BSE ocorreu no Reino Unido em 1986. No final de 1994 já haviam sido registrados 138.359 casos (Wells & Wilesmith, 1995). O período de incubação está em torno de cinco anos (Prusiner, 1998). A introdução de vísceras de carneiros e ovelhas na ração do gado britânico provavelmente originou esta epidemia (DeArmond & Bouzamondo, 2002). Estudos demonstraram, experimentalmente, a transmissão de

BSE para camundongos e também para o gado bovino através da alimentação (Prusiner, 1991). Alterações microscópicas no sistema nervoso central como vacuolização da substância cinzenta, resposta astrocitária e acúmulo de prion detectáveis através de imunohistoquímica são observados (Wells & Wilesmith, 1995).

1.2.5. Doenças causadas por prions em humanos

O Kuru, doença que atingiu nativos da tribo dos Fore em Papua na Nova Guiné na década de 1950, foi a primeira EET humana descrita. A doença foi disseminada através da prática de rituais canibalísticos e foi gradualmente desaparecendo com a sua extinção (Gajdusek & Zigas, 1957; Mathews *et al.*, 1968).

O curso clínico do kuru é rápido, caracterizando-se inicialmente por ataxia progressiva acompanhada de tremores no tronco, cabeça e extremidades que se intensificam durante a atividade física e desaparecem durante o sono. Histopatologicamente observam-se alterações espongiiformes, astrogliose e deposição de placas amilóides na maioria dos casos, principalmente no cerebelo e no sistema extrapiramidal (Gajdusek & Zigas, 1957; Klatzo *et al.*, 1959).

A doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD) foi relatada primeiramente em 1920 por H.G. Creutzfeldt e, em 1921, por A. Jakob (Richardson & Masters, 1995). A CJD apresenta caráter hereditário (15% dos casos

tem caráter autossômico dominante), infeccioso e esporádico (Masters *et al.*, 1981). A incidência da doença é de 0.5 a 1.5 casos por milhão de pessoas ao ano (Johnson & Gibbs, 1998).

Diversos estudos demonstram que a CJD pode ser transmitida a animais (Gibbs *et al.*, 1968; Manuelidis *et al.*, 1975; Tateishi *et al.* 1979). Duffi e colaboradores (1974) relataram a infecção de uma paciente com 55 anos de idade através de um transplante de córnea proveniente de um doador com CJD apresentando, após dezoito meses, ataxia, letargia e deterioração neurológica. A transmissão desta doença já foi relacionada ao uso de hormônio de crescimento derivado de pituitárias de cadáveres, a implantação de eletrodos cerebrais e a enxertos de dura-mater (Prusiner, 1993).

Homens e mulheres com idade média de 60 anos são igualmente afetados pela CJD e apresentam, como sintomas mais comuns, desordens visuais, perda de memória e movimentos mioclônicos. A maioria dos pacientes morre até 12 meses após o aparecimento dos primeiros sintomas, enquanto os demais exibem um curso clínico de vários anos (Richardson & Masters, 1995).

Em meados dos anos 90 surgiu o que se denominou de nova variante da doença de Creutzfeldt-Jakob (vCJD), ao observar-se 22 casos de pacientes jovens com manifestações comportamentais e psiquiátricas precoces, além de ataxia cerebelar. Todos apresentaram

placas de PrP^{Sc} difusas no cérebro. A ingestão de carne bovina ou de seus derivados contaminados com BSE foi proposto como a origem destes casos (Johnson & Gibbs, 1998).

O diagnóstico definitivo destas doenças é o exame anatomopatológico do cérebro *pós-mortem* que identifica os depósitos de prions e o aspecto esponjoso. É possível ainda diagnosticar a doença nos casos de vCJD por biópsia da amígdala palatina (Hil *et al.*, 1997)

Além do kuru e da CJD, existem outras doenças causadas por prions em humanos, como a doença de Gerstmann-Straussler-Scheinker (Ghetti *et al.*, 1995) e a insônia familiar fatal (Lugaresi *et al.*, 1986). Mais recentemente, levantou-se a hipótese de que alterações no gene que codifica o PrP^C estivessem associadas a etiologia de doenças psiquiátricas (Samaia *et al.*, 1997). Além disso, um polimorfismo raro neste gene está associado à epilepsia do lobo-temporal-mesial refratária (Walz *et al.*, 2003) e a malformações do desenvolvimento cortical (Walz *et al.*, 2004).

1.2.6 Funções fisiológicas da proteína prion celular

As funções fisiológicas de PrP^C começam a ser desvendadas. Animais que não possuem o gene que codifica o PrP^C (Prnp^{0/0}) desenvolveram-se normalmente (Büeler *et al.*, 1992). Entretanto, foi observado que estes animais apresentam prejuízo na inibição rápida

mediada pelo receptor do ácido γ -aminobutírico A (GABA_A), uma diminuição na potenciação de longa-duração no hipocampo (Collinge *et al.*, 1994)) e alteração no ritmo circadiano (Tobler *et al.*, 1996).

Um segundo grupo de animais "knockout" para PrP^c, apresentou uma importante perda das células de Purkinje do cerebelo e sinais progressivos de ataxia que levaram a morte prematura (Sakagushi *et al.*, 1996). Moore e colaboradores (1999) analisaram genes relacionados a PrP^c e encontraram um gene no mesmo *locus* que o de PrP^c denominado de "doppel". Curiosamente este gene é muito expresso nesta cepa de animais (Ngs) que desenvolveram ataxia, mas não naquelas com fenótipo normal. Desta forma, a degeneração não foi causada pela falta de PrP^c, mas pelas altas concentrações de "doppel".

A ativação de linfócitos mediada por mitógenos (Cashman *et al.*, 1990) e a regulação do cálcio intracelular em células neuronais também estão relacionadas a PrP^c (Whatley *et al.*, 1995). Estudos de excitotoxicidade demonstraram que camundongos Prnp^{0/0} são mais susceptíveis a convulsões agudas e ao abrasamento (*kindling*) induzidos por vários protocolos (Walz *et al.*, 1999). Além disso, estes animais demonstraram alterações na atividade de ectonucleotidasas de sinaptossomas o que poderia resultar em níveis diminuídos de adenosina, um anticonvulsivante endógeno na fenda sináptica (Pereira *et al.*, 2001).

O PrP^c associa-se a íons de cobre no seu domínio N-terminal e parece ter um papel na homeostasia deste metal (Miura *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1997a). Brown e colaboradores (1997a) demonstraram que extratos cerebrais de camundongos Prnp^{0/0} apresentam de 10 a 15 vezes menos cobre do que aqueles de animais controle. O mesmo grupo demonstrou, em cultura de células cerebelares de camundongos expressando diferentes concentrações de PrP^c, que células que super-expressam o PrP^c apresentam uma resistência maior ao estresse oxidativo quando comparadas a células de animais Prnp^{0/0} (Brown & Besinger, 1998). Os neurônios cerebelares e astrócitos de animais Prnp^{0/0} são mais sensíveis a toxicidade do superóxido (Brown *et al.*, 1997b). Além disto, a depleção de PrP^c de extratos cerebrais causa uma diminuição na atividade total da superóxido dismutase (Wong *et al.*, 2000). O mecanismo exato pelo qual o cobre e o PrP^c estão associados não é conhecido até o momento. Na superfície celular, o PrP^c pode funcionar como um quelante extracelular de íons cobre ou como um carreador de proteínas para captação e liberação destes cátions para alvos intracelulares (Martins *et al.*, 2001).

Trabalhos demonstram que o PrP^c interage com outras moléculas como a heparina (Gabison *et al.*, 1993), a proteína GFAP (glial fibrillary acidic protein) (Oesch *et al.*, 1990) e a Bcl-2 (Kurschner & Morgan,

1996). Entretanto, as funções celulares relacionadas aos vários ligantes já caracterizados ainda não foram identificadas (Lee *et al.*, 2003).

1.2.6.1 PrP^C, ligantes celulares, memória e doenças psiquiátricas

Graner e colaboradores (2000) caracterizaram a ligação específica entre o PrP^C e a laminina. O sítio de ligação ocorre no peptídeo RNIAEIIKDI, localizado na porção carboxi-terminal da cadeia γ -1 da laminina (Graner *et al.*, 2000). As lamininas são moléculas heterotriméricas compostas pela combinação de cadeias α , β e γ (Cognato & Yuchanco, 2000). Sabe-se que a laminina-10 (α 5 β 1 γ) é a isoforma mais abundante expressa no hipocampo (Indyk *et al.*, 2003) e a cadeia γ -1 exerce um papel importante na regeneração axonal desta região (Grimpe *et al.*, 2002). A laminina tem ainda um papel importante na proliferação, diferenciação, migração e morte celular (Luckenbill-Edds, 1997).

Este grupo também demonstrou que a extensão de neuritos promovida pela laminina era parcialmente inibida por anticorpos anti-PrP^C, enquanto que a mediada pelo peptídeo da cadeia γ -1 foi completamente abolida. A neuritogênese de células de camundongos Prnp^{0/0} é muito menor sobre laminina do que aquela de neurônios provenientes de animais controle (Graner *et al.*, 2000). Finalmente,

quando crescidos somente sobre o peptídeo da cadeia γ -1 da laminina, a neuritogênese é praticamente inexistente em animais $\text{Prnp}^{0/0}$ e normal em células de animais do tipo selvagem (Graner *et al.*, 2000).

Outro ligante de PrP^c foi descoberto através da técnica de hidropaticidade complementar, que foi usada para deduzir um peptídeo complementar à seqüência de aminoácidos 114-126 de PrP^c . Os anticorpos gerados contra este peptídeo foram capazes de reconhecer uma proteína de membrana de 66 KDa que se liga a PrP^c tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Martins *et al.*, 1997). Esta proteína foi recentemente identificada como sendo STI1 (stress-inducible protein 1) (Zanata *et al.*, 2002).

A interação PrP^c -STI1 ativou as vias da proteína quinase A (PKA) e da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e preveniu a morte celular induzida por anisomicina em neurônios retinianos pós-mitóticos obtidos de animais normais, mas não daqueles $\text{Prnp}^{0/0}$. A neuroproteção observada foi abolida com um inibidor de PKA, mas não de MAPK (Chiarini *et al.*, 2002).

A interação PrP^c -laminina está envolvida na neuritogênese (Graner *et al.*, 2000) e a de PrP^c -STI1, na neuroproteção (Zanata *et al.*, 2002), eventos importantes para a plasticidade e a formação da memória.

Samaia e colaboradores (1997) levantaram a possibilidade de que alterações no gene que codifica o PrP^c estivessem associadas a etiologia

de doenças psiquiátricas como a esquizofrenia. A partir disso, investigou-se a relevância de PrP^C em mecanismos de neurotransmissão associados a alterações comportamentais relacionadas a doenças psicóticas.

OBJETIVOS

O objetivo desta tese é demonstrar o envolvimento da proteína prion celular e seus ligantes, laminina e STI1, em processos de aprendizado e memória bem como em outros parâmetros comportamentais.

Objetivos específicos:

1) Investigar o papel da interação PrP^c-laminina no processo de consolidação das memórias de curta e longa duração, bem como na atividade de vias sinalizadoras imprescindíveis a estes eventos.

2) Determinar o papel da interação PrP^c-STI1 no processo de consolidação das memórias de curta e longa duração.

3) Avaliar e comparar os padrões comportamentais (STM, LTM, atividade locomotora e exploratória) em camundongos normais e *knockout* para PrP^c com diferentes idades.

4) Determinar a influência de MK-801, anfetamina e cafeína sobre a atividade locomotora de animais *knockout* para PrP^c.

Nesta tese, serão apresentados os resultados de quatro trabalhos dispostos em capítulos específicos sob a forma de artigos. Previamente aos trabalhos anexados, será discutido o objetivo e a relevância dos estudos em questão.

CAPÍTULO I

A interação da proteína prion celular com a laminina está envolvida na formação da memória através das vias PKA e MAPK

A laminina é uma glicoproteína de matriz extracelular envolvida em diversas funções importantes como proliferação, adesão, migração e morte celular (Timpl & Brown, 1994). As respostas celulares disparadas pela laminina são mediadas por sua interação com receptores celulares de membrana, sendo que os mais conhecidos são as integrinas (Mercúrio, 1995).

No sistema nervoso central, a interação laminina-integrinas media a diferenciação neuronal caracterizada pela formação e extensão de neuritos (Tomaselli *et al.*, 1988), migração de neurônios *in vivo* e *in vitro* (Liese *et al.*, 1992; Rivas *et al.*, 1995) e regeneração axonal (Salonen *et al.*, 1997). Além disso, Chen e Strickland (1997) demonstraram que a degradação de laminina via ativador de plasminogênio/plasmina promovia a morte de neurônios hipocampais. Esses resultados indicam um possível papel da laminina na sobrevivência e manutenção de neurônios.

Nosso grupo demonstrou que camundongos *Prnp^{0/0}* são mais sensíveis a convulsões causadas por agentes epileptogênicos como o

ácido caínico (Walz *et al.*, 1999), sugerindo que a ausência de PrP^c torna o animal mais susceptível a morte neuronal devido a degradação da laminina. Graner e colaboradores (2000) demonstraram a interação PrP^c-laminina mostrando que o PrP^c é um receptor para laminina específico, saturável e de alta afinidade. Esta interação ocorre no resíduo carboxi-terminal da cadeia γ -1 da laminina.

O PrP^c é expresso em vários tipos celulares, mas principalmente em neurônios e sinapses (Sales *et al.*, 1998) enquanto que a laminina é expressa em altas concentrações na região CA1 do hipocampo atuando, provavelmente, na regulação da plasticidade sináptica (Nakagami *et al.*, 2000).

Neste trabalho, a relevância da interação PrP^c-laminina na consolidação da memória foi investigada através da administração de anticorpos e peptídeos específicos para estas proteínas a ratos Wistar. Os animais receberam infusões intra-hipocampais dos diferentes reagentes e foram, após, submetidos à tarefa de esquiva inibitória para a avaliação da memória de curta e longa duração. Paralelamente, estudamos a influência da interação PrP^c-laminina sobre os mecanismos bioquímicos clássicos para a consolidação da memória como as vias PKA e de MAPK.

O manuscrito "Cellular prion interaction with laminin mediates memory consolidation through PKA and MAPK pathways" está em processo de submissão à revista especializada.

Cellular prion interaction with laminin mediates memory consolidation through PKA and MAPK pathways

Adriana S. Coitinho^{1,7}, Adriana R. O. Freitas^{2,3,7}, Marilene H. Lopes^{4,7}, Glaucia Hajj^{2,3,7}, Rafael Roesler⁵, Roger Walz⁶, Janine I. Rossato¹, Liane Rotta¹, Kil S. Lee², Rosa MP Castro⁴, Martin Cammarota¹, Vilma R. Martins^{2,4}, Ivan Izquierdo¹ and Ricardo R. Brentani^{2,4}

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Avenida Ramiro Barcelos 2600, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

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

³Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Lineu Prestes, 748 -05599-970, S.P. Brazil

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

⁵ CIREP, Centro de Cirurgia de Epilepsia, Hospital de Clínicas de Ribeirão Preto, FMRP-USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

⁶ Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Avenida Ramiro Barcelos 2600, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁷ - These authors contributed equally to this work

Correspondence should be addressed to Ricardo R. Brentani [rbrentani@ludwig.org.br] or Vilma R. Martins [vmartins@ludwig.org.br], Rua Prof Antonio Prudente 109, 4A 01509-010, São Paulo, SP, Brazil

Abbreviations: cAMP-dependent Protein kinase A (PKA), cAMP-response element binding protein (CREB), Celular prion protein (PrP^c), laminin (LN), Long-term memory (LTM), Mitogen-activated protein kinase (MAPK), and Short-term memory (STM).

ABSTRACT

Cellular prion (PrP^c) is a specific receptor for a laminin (LN) γ -1 domain and their abundance in hippocampus suggests a role in memory. PrP^c domain from aminoacids 173 to 182 contains the LN binding site and intra-hippocampal infusion of this peptide or antibodies against interacting domains in both molecules block short (STM) and long-term memory (LTM). The inhibitory effects of anti-PrP^c antibodies or PrP^c peptide 173-182 are abolished by LN γ -1 peptide and corresponding to their accomplishment on PKA and MAPK activities involved with STM and LTM. These data indicate that PrP^c-LN interaction plays a role in memory consolidation.

Keywords: cellular prion protein, laminin, short- and long-term memory

INTRODUCTION

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

LNs are heterotrimeric molecules composed by combinations of α , β and γ chains (Colognato & Yurchenco, 2000). LN-10 ($\alpha5\beta1\gamma$) is the most abundant isoform expressed in hippocampus (Indyk *et al.*, 2003) and γ -1 chain has a critical role in axonal regeneration in this brain region (Grimpe *et al.*, 2002). Although, no integrin has been mapped to bind to laminin γ -1 chain we have shown that the cellular prion protein (PrP^c) is a specific, high affinity, saturable receptor for a decapeptide (RNIAEIIKDI) at the carboxyterminal of this chain (Graner *et al.*, 2000). Thus, neurite extension by primary hippocampal neuron cultures in the presence of the LN γ -1 decapeptide was completely inhibited by anti-PrP^c antibodies. Furthermore, no neuritogenesis was elicited by the peptide from neurons obtained from PrP^c null mice, indicating that PrP^c-LN association is involved in neuronal plasticity.

We therefore decided to investigate whether the interaction between PrP^c and LN could participate in memory consolidation. Constitutively PrP^c deleted mice (Zrch-1) have normal development and behavior (Büeler *et al.*, 1992), despite a slight impairment in synaptic function (Collinge *et al.*, 1994) which was not confirmed by another group (Lledo *et al.*, 1996) and higher sensitivity to kainate-induced seizure (Walz *et al.*, 1999). Conversely, another strain of PrP^c deleted mice with impairment on memory formation has been described (Nishida *et al.*, 1997), but this and other phenotypes observed in the last animals were associated to higher levels of the Doppel protein rather than to the absence of PrP^c (Moore *et al.*, 1999). In fact, the use of any constitutively knockout animal, particularly in behavioral tests, has been receiving a lot of criticism since the

gene deletion approach, genetic background and compensatory mechanisms may influence the results (Büeler *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 1997). Then, learning and memory results obtained with any of the different strains of PrP^c ablated animals are questionable unless it could be reproduced in a non-transgenic animal. We have recently showed (Coitinho *et al.*, 2003) that Prnp^{0/0} animals (Zch-1) (Büeler *et al.*, 1993) presented an age-dependent impairment in memory consolidation, which can be detected only in 9 month-old animals. These results were replicated in rats at the same age when PrP^c was blocked by hippocampal infusion of a specific antagonist antibody (Coitinho *et al.*, 2003). Therefore, an experimental approach in which a protein can be directly blocked in a non-genetically manipulated animal is a desirable way to evaluate cognitive parameters such as learning and memory.

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

Herein, the relevance of the PrP^c-LN interaction in memory formation was evaluated in normal rats by blocking the proteins *in locus* using specific antagonist antibodies (Chiarini *et al.*, 2002; Giordano *et al.*, 1994) or peptides and measure STM and LTM for an aversively motivated learning task (Izquierdo *et al.*, 1998).

RESULTS

PrP^c and laminin are involved in STM and LTM

Polyclonal antibodies against recombinant mouse PrP^c (0.90µg/side) or laminin-1 from EHS tumor (0.09µg/side), previously demonstrated as antagonists (Chiarini *et al.*, 2002; Giordano *et al.*, 1994), impaired retention of inhibitory avoidance measured 90 minutes (short-term memory) or 24 h (long-term memory) (Izquierdo *et al.*, 1998) when infused bilaterally into the CA1 area of the hippocampus immediately after training (Fig. 1). The differences in antibody concentrations able to produce an effect when injected in the hippocampus are due to their titer differences. Hippocampal infusion of a control IgG at the highest concentration used in this experiment (0.90 µg/side) as well as saline did not affect memory consolidation. These results suggest that both PrP^c and LN, in the dorsal hippocampus, are involved in short and long-term memory consolidation.

LN γ -1 chain decapeptide binds PrP^c and is associated to memory consolidation

We have previously demonstrated that PrP^c is a high affinity cellular ligand for LN with a Kd of 10^{-8} M and using competition assays we also showed that PrP^c binding site resides at the decapeptide RNIAEIIKDI localized at the carboxyterminal of LN γ -1 chain (Graner *et al.*, 2000). In order to confirm that this peptide associates to PrP^c we conducted binding assays using ¹²⁵I labeled peptide and demonstrated its specific interaction with PrP^c (Fig. 2a). An antibody against this peptide was raised in rabbits and proved to recognize laminin γ -1 chain both from EHS tumor and mice hippocampus by western blot and immunohistochemistry (data not shown). When this antibody was bilaterally infused in hippocampus it was able to block both short and long-term memory in a dose dependent manner (Fig. 2b). Note that the infusion of 0.002µg of the anti γ -1 peptide IgG completely impaired memory retention while non immune rabbit IgG at a concentration 100 times higher have no effect. Therefore, the laminin domain which is the binding site for the PrP^c molecule is related to STM and LTM.

PrP^c domain 173 to 182 binds LN and is responsible for STM and LTM.

We conducted competition assays using a series of 20 mer peptides with 10 overlapping residues covering the entire PrP^c molecule in order to map the LN γ -1 peptide binding site at PrP^c (Fig. 3a). Two peptides corresponding to amino acids 163 to 182 and 173 to 192 were able to inhibit ¹²⁵I γ -1 peptide interaction with recombinant PrP^c. Hence both peptides that equally compete for the PrP^c- γ -1 peptide binding have overlapping sequences we conclude that the domain shared among them, 173 to 182, correspond to the LN binding site at PrP^c. Furthermore, a PrP^c deletion mutant was also constructed in order to confirm the importance of this region for laminin binding. Nevertheless, when fused to the green fluorescent protein (GFP) the mutant PrP^c (Δ 173-182) was trapped inside of the cells and never get to the surface, probably because an altered protein folding. So, the recombinant construction was unsuitable for binding assays.

The importance of PrP^c domain 173-182 in memory consolidation was initially addressed by hippocampal infusion of PrP^c peptides 163 to 182 and 173 to 192 which presented inhibitory effects both in STM and LTM (Fig. 3b). This result suggests that, through the interaction with the peptide RNIAEIIKDI at LN γ -1 chain in hippocampus these PrP^c peptides impair PrP^c-LN binding necessary for memory consolidation. This argument is stretched by data showing that a PrP^c peptide (73 to 92) that does not compete for PrP^c-LN γ -1 interaction (Fig 3a) is innocuous in memory formation (Fig. 3b).

In a second approach monoclonal antibodies against linear epitopes at PrP^c molecule were infused in the hippocampus. STM and LTM were inhibited by the antibody 8H4 (Fig 3c) which recognizes PrP^c domain comprehending amino acids 175 to 185 (Cui *et al.*, 2003). Nonetheless, 8B4, a monoclonal antibody against PrP^c residues 34 to 45 (Cui *et al.*, 2003) was unable to block memory consolidation even in a concentration 1,000 times higher than 8H4. Thus, these data indicate that PrP^c domain containing the laminin binding site is involved in STM and LTM. In addition, the lack of effect observed for 8B4 antibody points for the specificity of the PrP^c region related to this event and rules out an artifact due to an antibody interaction to any surface protein. Likewise to what has been previously proposed for PrP^c peptides, we speculate that 8H4

antibody binds to PrP^c in the hippocampus and impairs its interaction with laminin and memory consolidation.

PrP^c interaction with laminin mediates STM and LTM consolidation

It was still necessary, however, to demonstrate that the involvement of both macromolecules in memory depends on their binding one another. Infusion of the LN γ -1 chain derived peptide (0.08 μ g/ μ l) alone did not affect memory retention (Fig 4a). Although this peptide is able to bind PrP^c (Fig 2a) we predict that its additive effects on memory formation were not detected due to ligand (PrP^c) saturation by the LN present in the system. In fact, we have results showing that this peptide induces cell signaling in hippocampal neurons (unpublished data). Nonetheless, stoichiometric amounts of laminin γ -1 peptide co-infusion with PrP^c peptide 163-182, which represents its binding site at the PrP^c molecule, reverts memory consolidation inhibition caused by the latter (Fig 4a). This result indicates that peptides representing PrP^c and laminin interacting domains are able to associate in the hippocampus milieu. Furthermore, we predict that when LN γ -1 chain derived peptide binds to the PrP^c peptide 163-182 it discloses the latter's interaction with endogenous laminin leading this molecule accessible to bind to endogenous PrP^c promoting memory consolidation.

Notwithstanding, co-infusion of the LN γ -1 chain derived peptide was also able to prevent the impairing effect of the anti-PrP^c antibody infusion on memory retention (Fig. 4b). A control scrambled γ -1 peptide was incapable to modify either the normal memory retention or the impairment effect of anti-PrP^c antibody. Since the antibody used in this experiment (same utilized in Fig.1) is a polyclonal against the entire PrP^c molecule, we conduct competition experiments and proved that this antibody is able to dissociate PrP^c LN γ -1 binding (Fig. 4c). In addition, STM and LTM consolidation were also rescued when LN γ -1 peptide, but not a scrambled one, is associated to the 8H4 antibody (Fig. 4d), which is against the LN binding site at the PrP^c molecule and also blocks memory retention (Fig. 3c).

Together, these data indicate that the effect of the anti PrP^c antibodies in memory consolidation is due to their impairment on PrP^c-LN interaction in the dorsal

hippocampus. This effect is reversed when more LN- γ -1 peptide is added to the system leading to antibody dissociation from PrP^c and conducting STM and LTM consolidation.

Recently, Chen and co-workers (Chen *et al.*, 2003) observed that intrahippocampal infusion of antibodies against LN or LN peptides for 7 days disrupts laminin matrix and affects neuronal survival. Although our infusion time and reagents concentrations were lower than those used by this group, we tested neuronal viability in hippocampus, where the reagents were infused, using cresyl violet staining. None of the antibodies or peptides used in our experiments affected neuronal viability (data not shown). Furthermore, animals that received these reagents were evaluated again 48 hours after the test session and all of them behaved like naive animals and when trained again they were able to consolidate STM and LTM (data not shown). These data indicate that 2 days after the experiments, antibodies and peptides were washed out, so their effects are reversible and nontoxic to the hippocampal structures responsible for memory consolidation.

PrP^c-LN interaction induces memory formation by cAMP/PKA and MAPK pathways

Hippocampal cAMP/PKA and Ras/MEK/MAPK pathway cascade are required for the formation of inhibitory avoidance memory (Izquierdo & Medina, 1997; Bernabeu *et al.*, 1997; Bevilaqua *et al.*, 1997) and for the normal acquisition of different forms of associative learning (Walz *et al.*, 2000; Atkins *et al.*, 1998; Berman *et al.*, 1998). Thus, we decided to determine whether the observed changes in STM and LTM were accompanied by a modification in the PKA and MAPK activity in hippocampus. As it was previously demonstrated, trained animals have higher PKA (Izquierdo & Medina, 1997, Bernabeu *et al.*, 1997; Bevilaqua *et al.*, 1997) and MAPK activity (Walz *et al.*, 2000; Atkins *et al.*, 1998; Berman *et al.*, 1998) than naïve ones (Figs. 5a and 5b). Interestingly, both anti-PrP^c and anti-LN antibodies impair PKA activity induction both at 10 min. and 2 h after training (Fig. 5a). Infusion of the LN γ -1 peptide or control scrambled γ -1 peptide did not affect PKA activity induction after training. Nevertheless, when LN γ -1 peptide is combined with anti-PrP^c antibody it reverts the latter's impairment on PKA activation while the co-infusion of anti-PrP^c antibody plus a control

scrambled peptide did not, indicating that the inhibition of PKA activation after training is due to PrP^c-LN interaction impairment.

Likewise to PKA, MAPK activation observed 10 min. after training was impaired when anti-PrP^c and anti-LN antibodies were infused (Fig 5b). Furthermore, the infusion of LN γ -1 chain derived peptide or control scrambled γ -1 peptide did not affect MAPK activation immediately after training. However, the co-infusion of the LN γ -1 chain derived peptide with anti-PrP^c antibody reverted the latter's inhibitory activity while association of a control scrambled peptide with anti-PrP^c antibody did not. Conversely, 2 hours after training no effect on MAPK activation was observed by any of the antibodies or peptides (Fig. 5b).

Finally, our results pointed that PrP^c-LN interaction induces STM and LTM via PKA and MAPK signaling which are classic pathways for memory consolidation.

MATERIAL AND METHODS

Step-down inhibitory avoidance task

We used both non-implanted and surgically implanted male Wistar rats (2-3 months old; body weight, 180-210 g). The surgical procedure was carried out under thionembatal anesthesia (30 mg/Kg, i.p.) and consisted in the bilateral implantation of a 30-g cannula aimed 1 mm above the CA1 area of the dorsal hippocampus at coordinates A 4.3 mm, L 4.0 mm, V 3.4 mm of the atlas of Paxinos and Watson. After recovering from surgery, rats were trained in a one-trial step-down inhibitory avoidance task as previously described (Izquierdo *et al.*, 1998; Bernabeu *et al.*, 1997; Izquierdo *et al.*, 1997). The latency to step down was recorded and, immediately after training, animals received a bilateral infusion of saline, rabbit anti-PrP^c IgG (Chiarini *et al.*, 2002), rabbit anti-laminin IgG (Giordano *et al.*, 1994), rabbit anti-laminin γ -1 chain derived peptide (RNIAEIIKDI) IgG, monoclonal antibodies against PrP^c 8H4 or 8B4 (Cui *et al.*, 2003), rabbit non-immune IgG and mouse non-immune IgG. PrP^c peptides (Zanata *et al.*, 2002), laminin γ -1 chain derived peptide (RNIAEIIKDI) and laminin γ -1 scrambled peptide (IRANIEIKIDGC) in a total volume of 0.5 μ l/side. The first group of these animals (300 rats) was tested for retention 90 minutes or 24 hours later, as described elsewhere (Izquierdo *et al.*, 1998, Bernabeu *et al.*, 1997) and test minus training session step-down latencies were taken as a measure of retention. Postmortem histological controls of the cannula placements was done in order to evaluate if the injection tips were within 1.5 mm² of the intended site and only behavioral data from animals with the cannula located in the intended site were used.

The second group of animals (80 rats) was sacrificed immediately or 2 h after training plus reagents infusion and used for the enzymatic assays. The third group consisted of 20 implanted animals which were bilaterally infused with saline into the CA1 region and killed 0 or 2 h later, without receiving any specific behavioral training, was used as control for the enzymatic assays (naive). These animals were also sacrificed by decapitation 0 or 2h after each behavioral procedure. The ICBS Ethics Committee approved this work.

Expression and purification of recombinant PrP^c

The expression vector containing the cDNA fragment encoding amino acids 23-231 of the mouse PrP^c protein cloned in the *Bam*H1-*Eco*R1 restriction sites of pRSET (Invitrogen™) was kindly provided by Ralph Zahn (Institut für Molekularbiologie und Biophysik, Eidgenössische Technische Hochschule, Switzerland). The expression and purification of His₆-PrP^c were performed as previously described (Zahn *et al.*, 1997).

PrP^c- γ 1 binding and competition assays

His₆-PrP^c (4 μ g) was immobilized in Polystyrene wells (Immulon 2) and non-specific sites blocked with 1% BSA (Bovine Serum Albumin) for 2 h at room temperature. Increasing concentrations of ¹²⁵I- γ 1 peptide (RNIAEIIKDI)-BSA (labeled as described in Martins *et al.*, 1997) with specific activity of 7x10⁵cpm/ μ g were added to the wells and incubated for 16 h at 4°C. After extensive washing, incorporated radioactivity was measured and originated the total binding curve. In parallel His₆-PrP^c (4 μ g) was incubated with ¹²⁵I- γ 1-BSA plus 5 fold excess unlabeled γ 1-BSA, generating non-specific binding. Specific binding was obtained by the subtraction of non-specific from total values.

Competition assays were performed using PrP^c synthetic peptides and antibodies. Synthetic mouse PrP^c peptides, 1.2 x 10⁻⁴ M, covering the amino acids sequence from 23 to 230 were previously described (Zanata *et al.*, 2002), specific IgGs raised against GST-PrP^c (Zanata *et al.*, 2002), monoclonal antibody against PrP^c, 8H4 (Cui *et al.*, 2003) or non-immune serum IgG were pre-incubated with 1.2x10⁻⁶ M ¹²⁵I- γ 1-BSA for 3 h at room temperature. Then, the reagents were added to the wells containing 4 μ g adsorbed His₆-PrP^c and incubated for 16 h at 4°C. After an extensive washing, incorporated radioactivity was determined using a gamma counter. The PrP^c -¹²⁵I- γ 1-BSA total binding was considered 100% and that in the presence of peptides or antibodies (IgGs) was relative to it.

Sample preparation and kinase assays

After sacrifice, brains were immediately removed and maintained at 4°C throughout the procedure. Hippocampi were dissected out and homogenized in ice-

chilled buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.32 M sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinin, 15 µg/ml leupeptin, 50 mM NaF and 1 mM sodium orthovanadate). Homogenates were centrifuged for 10 min at 900 x g and the obtained nuclear pellet resuspended in a buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM PMSF, 50 mM NaF and 1 mM sodium orthovanadate. Samples were stored at -70°C until used.

PKA activity of each sample was determined using an assay system (GIBCO BRL) according to the manufacture's instructions.

Approximately 200 µg of total protein from each sample were used to immunoprecipitate the active MAPK in the nuclear extract using an immobilized phospho-p44/42 MAP kinase monoclonal antibody (Cell Signaling non-radioactive kit). MAPK activity was evaluated by incubation with Elk-1 substrate, followed by electrophoresis and western-blotting with anti-phospho Elk-1 antibody (1:1,000, Cell Signaling). Densitometric analyses were performed using a MCID Image Analysis System (5.02 v, Image Research, Ontario, Canada). Enzymes activities of each treatment were expressed as relative levels compared to the value obtained for the treatment with irrelevant IgG (considered equal 1).

Cresyl violet staining

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

Statistical analyses

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

DISCUSSION

Previous work has shown that memory is not disrupted in mice devoid of the PrP^c coding gene which can be explained by the obvious redundancy that must exist in order to preserve such an important phenotype (Büeler *et al.*, 1992). Alterations in important cellular signaling pathways such higher PKA and MAPK have been described in two strains of PrP^c ablated animals with different genetic backgrounds, Zrch-1 and Npu, (Brown *et al.*, 2002; Chiarini *et al.*, 2002). Since both enzymes activities are important in memory consolidation (Izquierdo & Medina, 1997), it is plausible to speculate that these modifications may participate in compensatory mechanisms. Furthermore, the compensation can be age dependent since we have observed that 9 month-old Prnp^{0/0} mice present impairment in STM and LTM that is undetectable in 3 month-old animals. In addition, intrahippocampal infusion of anti-PrP^c antibody in rats in a dose 10 times lower than that used here (Fig. 1) impaired memory consolidation in 9 month but not in 3 month-old animals (Coitinho *et al.*, 2003). Thus, systems related in memory formation became more susceptible to the PrP^c expression in older animals. Therefore, since a great number of alterations can be generated when PrP^c gene is ablated and the transgenic mice genetic background may influence behavior, the approach presented here is a clever choice to establish the PrP^c roles in cognition.

Another point to be clarified is the addition of PrP^c to the range of LN receptors thought to be involved in memory consolidation. Although, the variety of LNs trimers that can be formed between the 5 α , 3 β and 3 γ chains already described (Colognato & Yurchenco, 2000), LN-10 ($\alpha 5\beta 1\gamma 1$) seems to be the major isoform present in hippocampus (Indyk *et al.*, 2003).

Previously, we have demonstrated (Graner *et al.*, 2000) that PrP^c is the only cell receptor for the gama-1 LN chain, since no neurites are formed upon plating neurons derived from PrP null mice on the LN γ -1 peptide. It was however clear that neurons display other receptors for other domains in LN since Prnp^{0/0} neurons do extend neurites when plated on LN (albeit to a smaller extent than wild type neurons), which are not inhabitable by anti PrP^c antibodies. While the findings displayed in Fig 1 indicate that both PrP^c and Ln are involved in memory formation they do not constitute formal proof that involvement of both proteins is a consequence of their mutual interaction. On the

other hand, the observation that only those reagents which actually react with the binding sites of PrP^c or LN, respectively, are amnesic (Figs 2 and 3) is a strong indication that indeed they act because they bind one another. Further confirmation is clearly provided by the experiments in which the LN γ -1 peptide reverses the amnesic effect of anti-PrP^c antibodies, in particularly that mediated by 8H4, which epitope at the PrP^c molecule maps within the LN binding site. The absence of additive effects on memory formation in the presence of LN γ -1 chain peptide alone may indicate ligand (PrP^c) saturation by the LN present in the system. However, as evidenced in Fig 4 and 5 LN γ -1 chain is able to re-establish the signaling pathways which were silenced by the antibody infusion.

While it has not been shown that anti-integrin antibodies have any effect on memory models in mammals, their effect on long-term potentiation (LTP) (Kramar *et al.*, 2002) and the discovery of the *Drosophila* memory mutant encoding a new integrin involved with short-term memory (Grotewiel *et al.*, 1998) indicate that integrins are participants in plastic events such as memory formation (Lynch, 1998). Since no integrin has hitherto been shown to bind anywhere but the alpha chain of laminins (Giancotti, 2000), it is possible to speculate, to the extent that preventing PrP^c binding to LN is completely amnesic, that docking of PrP^c to the LN γ -1 chain is the nucleating event which must be followed by integrin binding elsewhere in the LN trimer. This model would thus resemble the multimolecular dystrophin complex, also shown to bind laminin at the neuromuscular junction (Tinsley *et al.*, 1994).

There is an increasing amount of evidence, arising from studies in invertebrates, pointing to the participation of cAMP/PKA/CREB and RAS/MEK/MAPK/Elk-1 signaling pathways during the formation of new memories (Martin *et al.*, 1997; Yin *et al.*, 1994). Since our previous studies (Bernabeu *et al.*, 1997) and those from others (Atkins *et al.*, 1998; Berman *et al.*, 1998; Impey *et al.*, 1998a, Impey *et al.* 1998b), demonstrating involvement of the PKA/CREB and MAPK/Elk-1 signaling pathways in mammalian memory formation were performed in total extracts, they were unable to determine whether learning-associated changes in the phosphorylation of CREB, MAPK and Elk-1 are due to changes in nuclear-localized protein kinases and transcription factors. Thus, we used purified nuclear extracts because now it is well known that hippocampal-dependent

one-trial avoidance learning is accompanied by the activation of both pathways in the nucleus (Cammarota *et al.*, 2000).

Effective consolidation of STM of one-trial inhibitory avoidance requires the continued activity of PKA during the first 90 min (Vianna *et al.*, 1999), while in the case of LTM, the cAMP/PKA pathway is crucial in CA1 at two different times: first, immediately after induction or training, and then again 3-6 h later (Vianna *et al.*, 2000). Therefore, the decreased PKA activity at 0 and 2h after training mediated by PrP^c and LN blockage may be responsible for impairment of both STM and LTM consolidation (McGaugh & Izquierdo, 2000; Vianna *et al.*, 2000). Moreover, since the LN γ -1 chain derived peptide association with anti-PrP^c antibodies reverts the latter's inhibitory activity in STM and LTM through PKA signaling we can argue that these events are mediated by PrP^c-LN interaction.

Furthermore, we observed a reduction in MAPK after anti-PrP^c and anti-LN antibodies infusion immediately after training but not after 2 hours post-training. The MAPK cascade was proposed as a key pathway of memory formation, based on observations on LTP in transgenic mice mutants expressing altered members of this pathway (English & Sweatt, 1997). The MAPK pathway is required immediately after training for STM consolidation and 3h post-training for LTM consolidation of inhibitory avoidance (McGaugh & Izquierdo, 2000). Thus, the decreased MAPK activity observed in our experiments may be related to the amnesic effect of anti-PrP^c and anti-LN antibodies on STM but not on LTM consolidation. Similarly to what has been previously observed for PKA activity, LN γ -1 chain derived peptide was able to revert the inhibitory effects of anti PrP^c antibody, indicating the participation of PrP^c-LN binding on STM mediated by MAPK signaling.

In conclusion, the present findings demonstrate that LN-PrP^c interaction is involved in aversive memory consolidation and that these processes require a close interaction between signaling pathways as PKA and MAPK for STM and PKA for LTM.

REFERENCES

1. Luckenbill-Edds, L. (1997) *Brain Res. Brain Res. Rev.* **23**, 1-27.
2. Lynch, G. (1998) *Neurobiol. Learn. Mem.* **70**, 82-100.
3. Grotewiel, M. S., Beck, C. D., Wu, K. H., Zhu, X. R. & Davis, R. L. (1998) *Nature* **391**, 455-460.
4. Colognato, H. & Yurchenco, P.D. (2000) *Dev. Dynamics*, **218**, 213-234.
5. Indyk, J.A., Chen, Z.L., Strickland, S. (2003) *Neuroscience*, **116**, 359-371.
6. Grimpe, B., Dong, S., Doller, C., Temple, K., Malouf, A.T., Silver, J. (2002) *J. Neurosci.* **22**, 3144-3160.
7. 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. *et al.* (2000) *Brain Res. Mol. Brain Res.* **76**, 85-92.
8. Büeler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M. & Weissmann, C. (1992) *Nature* **356**, 577-582.
9. Collinge, J., Whittington, M. A., Sidle, K. C., Smith, C. J., Palmer, M. S., Clarke, A. R. & Jefferys, J. G. (1994) *Nature* **370**, 295-297
10. Lledo, P. M., Tremblay, P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. & Nicoll, R. A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 2403-2407.
11. Walz, R., Amaral, O. B., Rockenbach, I. C., Roesler, R., Izquierdo, I., Cavalheiro, E. A., Martins, V. R. & Brentani, R. R. (1999) *Epilepsia* **40**, 1679-1682.
12. Nishida, N., Katamine, S., Shigematsu, K., Nakatani, A., Sakamoto, N., Hasegawa, S., Nakaoka, R., Atarashi, R., Kataoka, Y. & Miyamoto, T. (1997) *Cell Mol. Neurobiol.* **17**, 537-545.

13. Moore, R. C., Lee, I. Y., Silverman, G. L., Harrison, P. M., Strome, R., Heinrich, C., Karunaratne, A., Pasternak, S. H., Chishti, M. A., Liang, Y. *et al.* (1999) *J. Mol. Biol.* **292**, 797-817.
14. Silva, A.J., Simpson, E.M., Takahashi J.S., Lipp H.P., Nakanishi, S., Wehner, J.M., Giese, K.P., Tully, T., Abel, T., Chapman, P.F., *et al.* (1997) *Neuron* **19**, 755-759.
15. Büeler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguet, M., Weissmann, C. (1993) *Cell* **73**,1339-1347
16. Coitinho, A.S., Roesler, R., Martins, V.R., Brentani, R.R., Izquierdo, I. (2003) *Neuroreport* **14**, 1375-1379..
17. Izquierdo, I., Barros, D. M., Mello e Souza, de Souza, M. M., Izquierdo, L. A. & Medina, J. H. (1998) *Nature* **393**, 635-636.
18. Davis, H. P. & Squire, L. R. (1984) *Psychol. Bull.* **96**, 518-559.
19. Izquierdo, I. & Medina, J. H. (1997) *Neurobiol. Learn. Mem.* **68**, 285-316.
20. McGaugh, J. L. (1966) *Science* **153**, 1351-1358.
21. McGaugh, J. L. & Izquierdo, I. (2000) *Trends Pharmacol. Sci.* **21**, 208-210.
22. Bernabeu, R., Bevilaqua, L., Ardenghi, P., Bromberg, E., Schmitz, P., Bianchin, M., Izquierdo, I. & Medina, J. H. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 7041-7046.
23. Cammarota, M., Bevilaqua, L. R., Ardenghi, P., Paratcha, G., Levi, D. S., Izquierdo, I. & Medina, J. H. (2000) *Brain Res. Mol. Brain Res.* **76**, 36-46.
24. Huang, Y. Y., Li, X. C. & Kandel, E. R. (1994) *Cell* **79**, 69-79.
25. Taubenfeld, S. M., Milekic, M. H., Monti, B. & Alberini, C. M. (2001) *Nat. Neurosci.* **4**, 813-818.

26. Vianna, M. R., Izquierdo, L. A., Barros, D. M., Ardenghi, P., Pereira, P., Rodrigues, C., Moletta, B., Medina, J. H. & Izquierdo, I. (2000) *Neurochem. Res.* **25**, 621-626.
27. Walz, R., Roesler, R., Quevedo, J., Sant'Anna, M. K., Madruga, M., Rodrigues, C., Gottfried, C., Medina, J. H. & Izquierdo, I. (2000) *Neurobiol. Learn. Mem.* **73**, 11-20.
28. Chiarini, L. B., Freitas, A. R., Zanata, S. M., Brentani, R. R., Martins, V. R. & Linden, R. (2002) *The EMBO Journal* **21**, 3317-3326.
29. Giordano, R., Chammas, R., Veiga, S. S., Colli, W. & Alves, M. J. (1994) *Mol. Biochem. Parasitol.* **65**, 85-94.
30. Cui, T., Daniels, M., Wong, B.S., Li, R., Sy, M-S & Sasson, J. (2003) *Eur. J. Biochem.* **270**, 3368-3376.
31. Chen, Z-L., Indyk, J.A., Strickland, S. (2003) *Mol Biol Cell* **14**, 2665-2676.
32. Atkins, C. M., Selcher, J. C., Petraitis, J. J., Trzaskos, J. M. & Sweatt, J. D. (1998) *Nat. Neurosci.* **1**, 602-609.
33. Berman, D. E., Hazvi, S., Rosenblum, K., Seger, R. & Dudai, Y. (1998) *J. Neurosci.* **18**, 10037-10044.
34. Bevilaqua, L., Ardenghi, P., Schroder, N., Bromberg, E., Schmitz, P. K., Schaeffer, E., Quevedo, J., Bianchin, M., Walz, R., Medina, J. H. *et al.* (1997) *Behav Pharmacol* **8**, 331-338.
35. Izquierdo, I., Quillfeldt, J. A., Zanatta, M. S., Quevedo, J., Schaeffer, E., Schmitz, P. K. & Medina, J. H. (1997) *Eur J Neurosci* **9**, 786-793.
36. Zahn, R., von Schroetter, C. & Wuthrich, K. (1997) *FEBS Lett.* **417**, 400-404.
37. Zanata, S.M., Lopes, M.H., Mercadante, A.F., Hajj, G.N.M., Chiarini, L.B., Nomizo, R., Freitas, A.R.O., Cabral, A.L.B., Lee, K.S., Juliano, M.A. *et al.* (2002) *The EMBO Journal* **21**, 3307-3316.

38. Brown, D.R., Nicholas, R.S. & Canevari, L. (2002) *J. Neurosc. Res.* **67**, 211-224.
39. Kramar, E. A., Bernard, J. A., Gall, C. M. & Lynch, G. (2002) *Neuroscience* **110**, 29-39.
40. Giancotti, F. G. (2000) *Nat. Cell Biol.* **2**, E13-E14.
41. Tinsley, J. M., Blake, D. J., Zuellig, R. A. & Davies, K. E. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 8307-8313.
42. Impey, S., Smith, D. M., Obrietan, K., Donahue, R., Wade, C. & Storm, D. R. (1998) *Nat. Neurosci.* **1**, 595-601.
43. Impey, S., Obrietan, K., Wong, S. T., Poser, S., Yano, S., Wayman, G., Deloulme, J. C., Chan, G. & Storm, D. R. (1998) *Neuron* **21**, 869-883.
44. Vianna, M. R., Izquierdo, L. A., Barros, D. M., Medina, J. H. & Izquierdo, I. (1999) *Behav Pharmacol* **10**, 223-227.
45. English, J. D. & Sweatt, J. D. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 19103-19106.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Anti PrP^c and anti LN antibodies impair short and long-term memory consolidation.

Effect of anti-PrP^c IgG (1.8 µg/µl), anti-LN IgG (0.18 µg/µl) or purified rabbit pre-immune IgG (1.8 µg/µl) infusions into CA1 area of the hippocampus on memory retention of the step-down inhibitory avoidance task measured 90 minutes after training (STM) or 24 hours after training (LTM). Data are median (interquartile range) of retention test step-down latencies, in seconds. *Significantly different from purified pre-immune serum IgG group (n = 9-10 animals per group, Mann-Whitney test, P < 0.01). Bars indicate the minimum and maximum latencies for each group of animals.

Figure 2: LN domain that interacts with PrP^c is involved in short and long-term memory

a) LN γ1 carboxyterminal peptide (RNIAEIIKDI) binds PrP^c in a specific high affinity manner: ¹²⁵I- LN γ1 peptide coupled to BSA was incubated with adsorbed His₆-PrP^c in the absence (total) or presence of unlabeled LN γ1 peptide-BSA (non-specific). Non-specific binding (Δ-Δ) was subtracted from the total binding (■-■) to yield His₆-PrP^c specific binding to ¹²⁵I- LN γ1 peptide (×-×).

b) Antibodies against LN γ1 peptide inhibited memory retention: purified rabbit IgG anti-LN γ1 peptide at the indicated concentrations or rabbit pre-immune IgG (0.2 µg/µl) were infused into CA1 area of the hippocampus. Memory retention of the step-down inhibitory avoidance task was measured 90 minutes after training (STM) or 24 hours after training (LTM). Data are median (interquartile range) of retention test step-down latencies, in seconds. *Significantly different from purified pre-immune serum IgG group (n = 9 - 10 animals per group, Mann-Whitney test, P < 0.01). Bars indicate the minimum and maximum latencies for each group of animals.

Figure 3: PrP^c domain that interacts with LN is involved in short and long-term memory

- a) Mapping LN binding site at PrP^c 173 – 182 domain using competition assay with synthetic PrP^c peptides: Twenty peptides covering the mouse PrP^c (23-231) sequence were chemically synthesized as a 20-mer with 10 overlapping residues, numbers indicate the corresponding aminoacids. The synthetic peptides were pre-incubated with ¹²⁵I-LN-γ1 peptide coupled to BSA followed by incubation with adsorbed His₆-PrP^c. Total binding between His₆-PrP^c and ¹²⁵I- Ln γ1 peptide was set as 100% and the results are expressed as the relative percentage of the binding produced by competition with each peptide. * = significantly different from control (single mean Student's t test, mean ± SD, p<0.01).
- b) PrP^c peptides representing the LN binding site inhibited memory retention: PrP^c peptides 73-92, 163-182 or 173-192 (0.2 µg/µl) were infused into CA1 area of the hippocampus. Memory retention of the step-down inhibitory avoidance task was measured 90 minutes after training (STM) or 24 hours after training (LTM). Data are median (interquartile range) of retention test step-down latencies, in seconds. *Significantly different from purified pre-immune serum IgG group (n = 9 - 10 animals per group, Mann-Whitney test, P< 0.01). Bars indicate the minimum and maximum latencies for each group of animals.
- c) Monoclonal antibodies against the PrP^c domain which interacts with LN blocked memory retention: Purified monoclonal antibodies 8H4 (epitope 175-185 at PrP^c) and 8B4 (epitope 34-45 at PrP^c) at the concentrations indicated and mouse non-immune purified IgG (10⁻³ µg/µl) were infused into CA1 area of the hippocampus. Memory retention was measured as described in part b.

Figure 4: PrP^c interaction with laminin is responsible for STM and LTM

- a) LN γ-1 peptide reverses PrP^c peptide 163-182 inhibition: LN γ1 1 peptide (RNIAEIIKDI) (0.08 µg/µl), PrP^c 163-182 (0.16 µg/µl) or LN γ1 peptide (0.08 µg/µl) plus PrP^c 163-182 (0.16 µg/µl) were infused into CA1 area of the hippocampus. Memory retention of the step-down inhibitory avoidance task was measured 90 minutes after training (STM) or 24 hours after training (LTM). Data are median (interquartile range) of retention test step-down latencies, in seconds. *Significantly different from purified pre-immune serum IgG group (n = 9 - 10 animals per group, Mann-Whitney test, P< 0.01). Bars indicate the minimum and maximum latencies for each group of animals

b) LN γ -1 peptide reverses anti-PrP^c antibody inhibition on STM and LTM consolidation: rabbit pre-immune IgG (1.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), anti-PrP^c IgG (1.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), LN γ -1 peptide (0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), LN γ -1 scrambled peptide (0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (scra γ -1), anti-PrP^c IgG (1.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) plus LN γ -1 peptide (0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (anti-PrP^c + LN γ -1) or anti-PrP^c IgG (1.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) plus LN γ -1 scrambled peptide (0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (anti-PrP^c + scra LN γ -1) were infused into CA1 area of the hippocampus. Memory retention was measured as described in part a.

c) LN γ 1 peptide binding to PrP^c is impaired by anti-PrP^c antibodies: ¹²⁵I- LN γ 1 peptide coupled to BSA was incubated with adsorbed His₆-PrP^c in the presence of non-immune rabbit IgG (■ - ■) or rabbit anti anti PrP^c IgG (◇ - ◇) at the indicated amounts. Total binding between His₆-PrP^c and ¹²⁵I- LN γ 1 peptide was set as 100% and the results are expressed as the relative percentage of the binding produced by competition with each IgG. * = significantly different from control (single mean Student's t test, mean \pm SD, $p < 0.01$).

d) LN γ -1 peptide reverses anti-PrP^c monoclonal antibody 8H4 inhibition on STM and LTM consolidation: mouse pre-immune IgG (10^{-3} $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), monoclonal antibody anti-PrP^c 8H4 (10^{-5} $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) plus LN γ -1 peptide (0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) or monoclonal antibody anti-PrP^c 8H4 (10^{-5} $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) plus LN γ -1 scrambled peptide (0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) were infused into CA1 area of the hippocampus. Memory retention was measured as described in part a

Figure 5: PrP^c-LN interaction triggers signal through the cAMP/PKA and MAPK

Rats received immediately post-training bilateral infusions of the following reagents in the hippocampus CA1 area: saline, rabbit pre-immune IgG (1.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (IgG), rabbit anti-PrP^c IgG (1.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (anti-PrP^c), rabbit anti-LN IgG (0.18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (anti-LN), LN γ -1 peptide (0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (γ -1), LN γ -1 scrambled peptide (0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (scra γ -1), anti-PrP^c IgG (1.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) plus LN γ -1 peptide (0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (anti-PrP^c + γ -1) and anti-PrP^c IgG (1.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) plus LN γ -1 scrambled peptide (0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (anti-PrP^c + scra γ -1). The PKA (a) and MAPK (b) activities of each group were measured in nuclear extracts prepared 10 min. or 2 hours after training procedures. The basal levels of each enzyme activity were also measured in naive animals (naive). Figures bellow the graphic show representative experiments of the active MAPK immunoprecipitated material reacted with Elk-1

substrate, followed by electrophoresis and western-blotting with anti-phospho Elk-1 antibody. * Significantly different from purified pre-immune serum IgG group (single mean Student's t test, mean \pm SD, $P < 0.05$).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from FAPESP (99/07124-8), CNPq and PRONEX, A.R.O.F., MHL, GH are supported by FAPESP fellowships. 8H4 and 8B4 monoclonal antibodies were kindly provided by Dr. Man-Sun Sy (Case Western Reserve University).

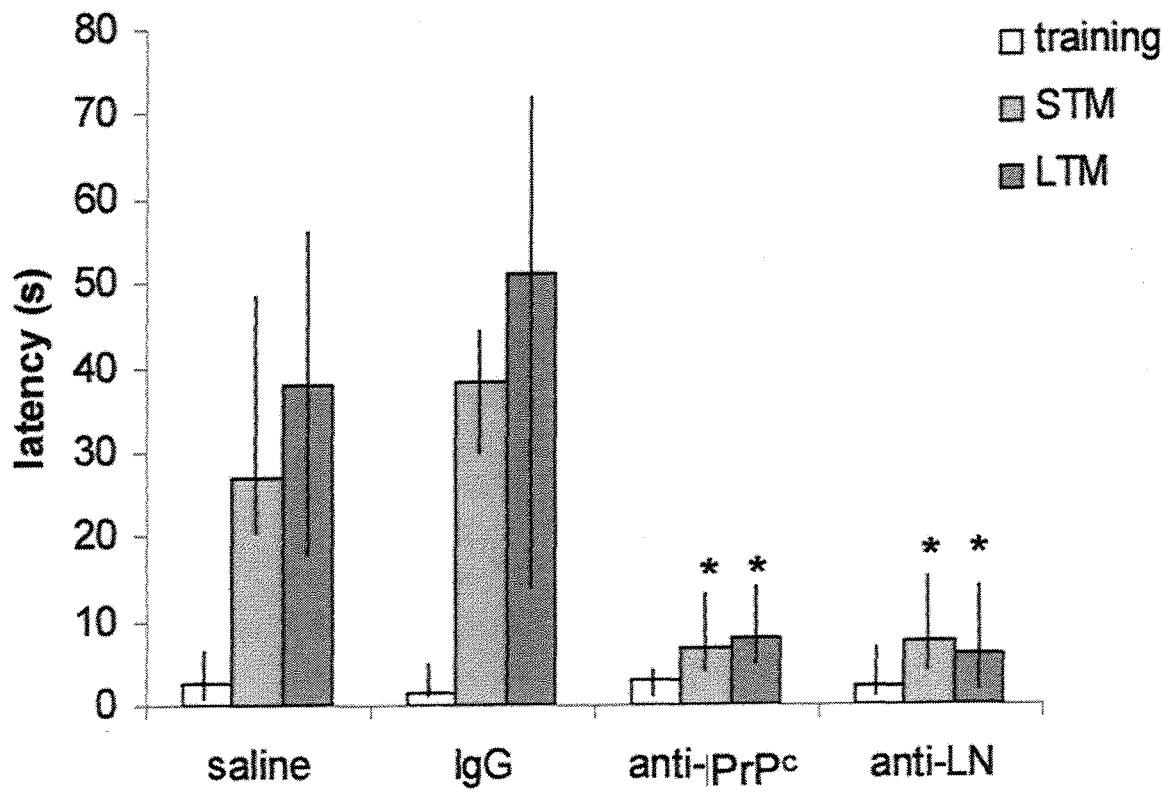


Figure 1

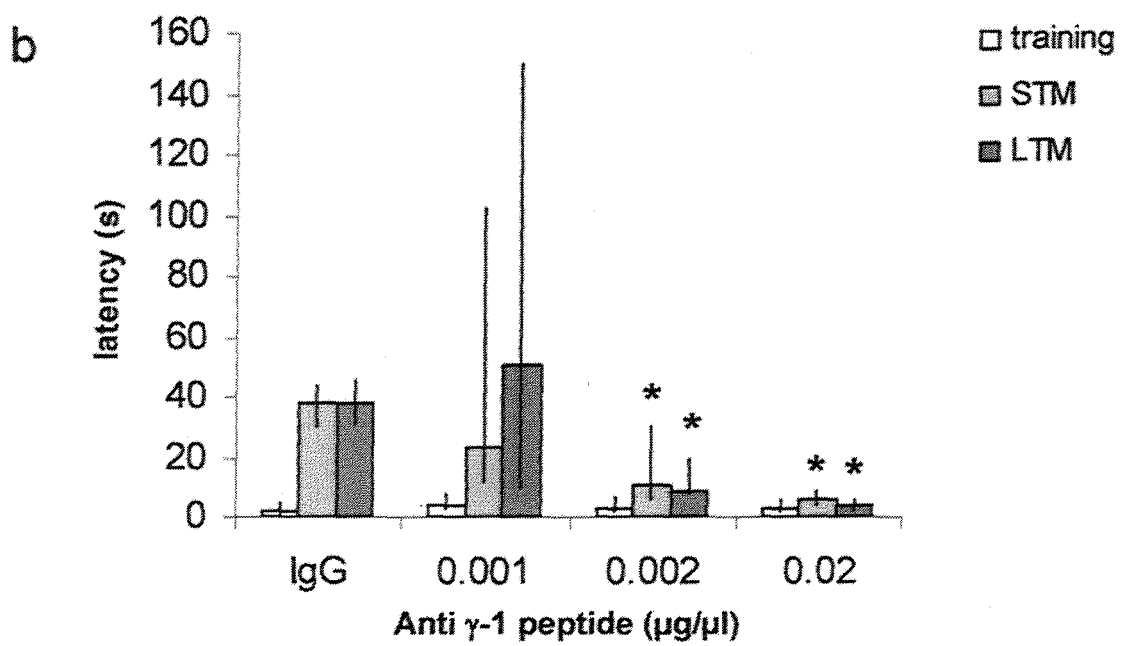
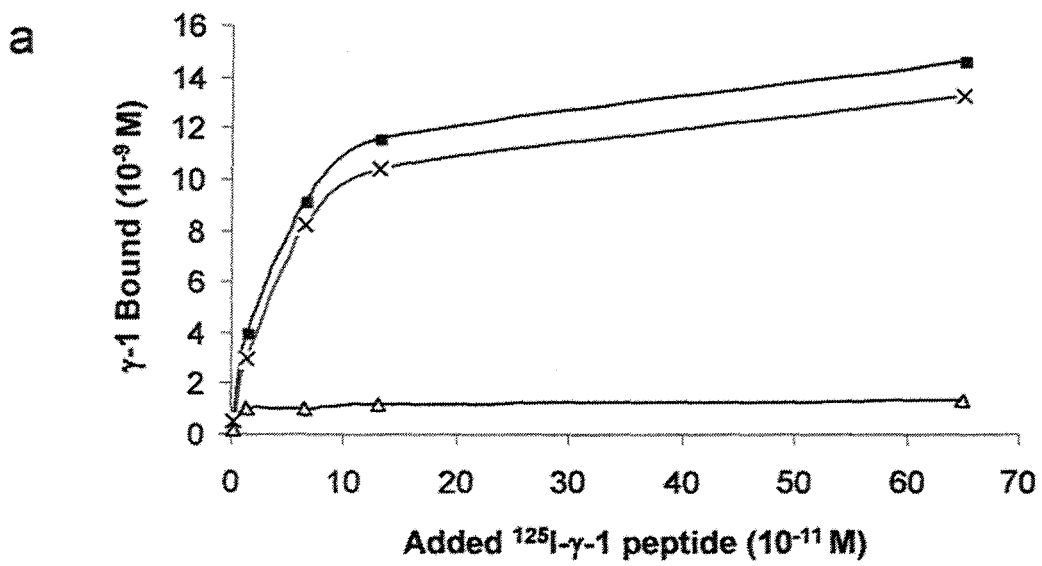


Figure 2

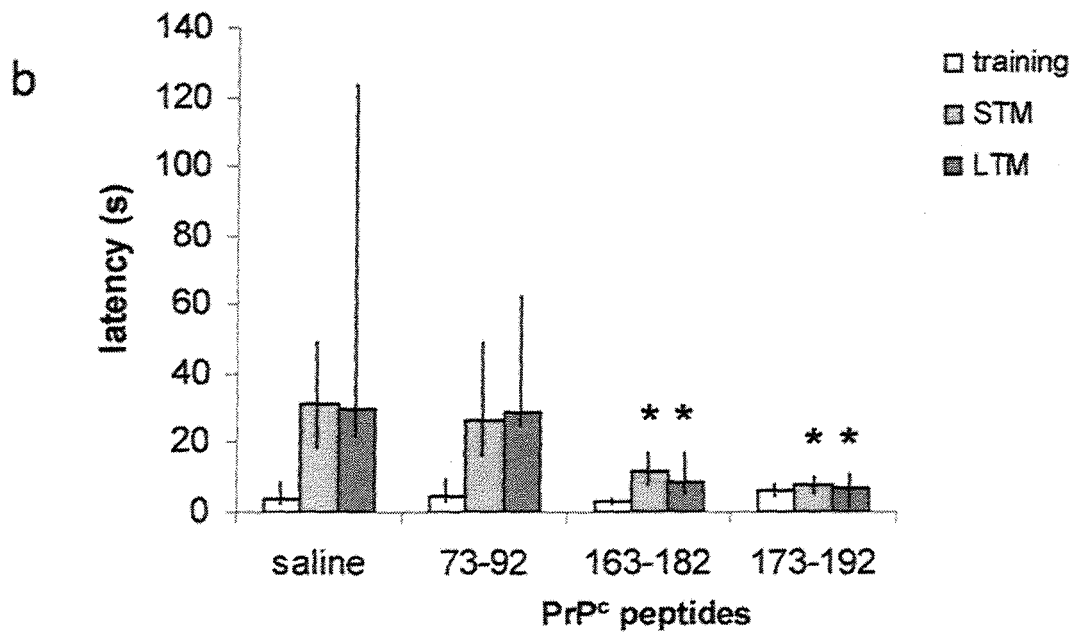
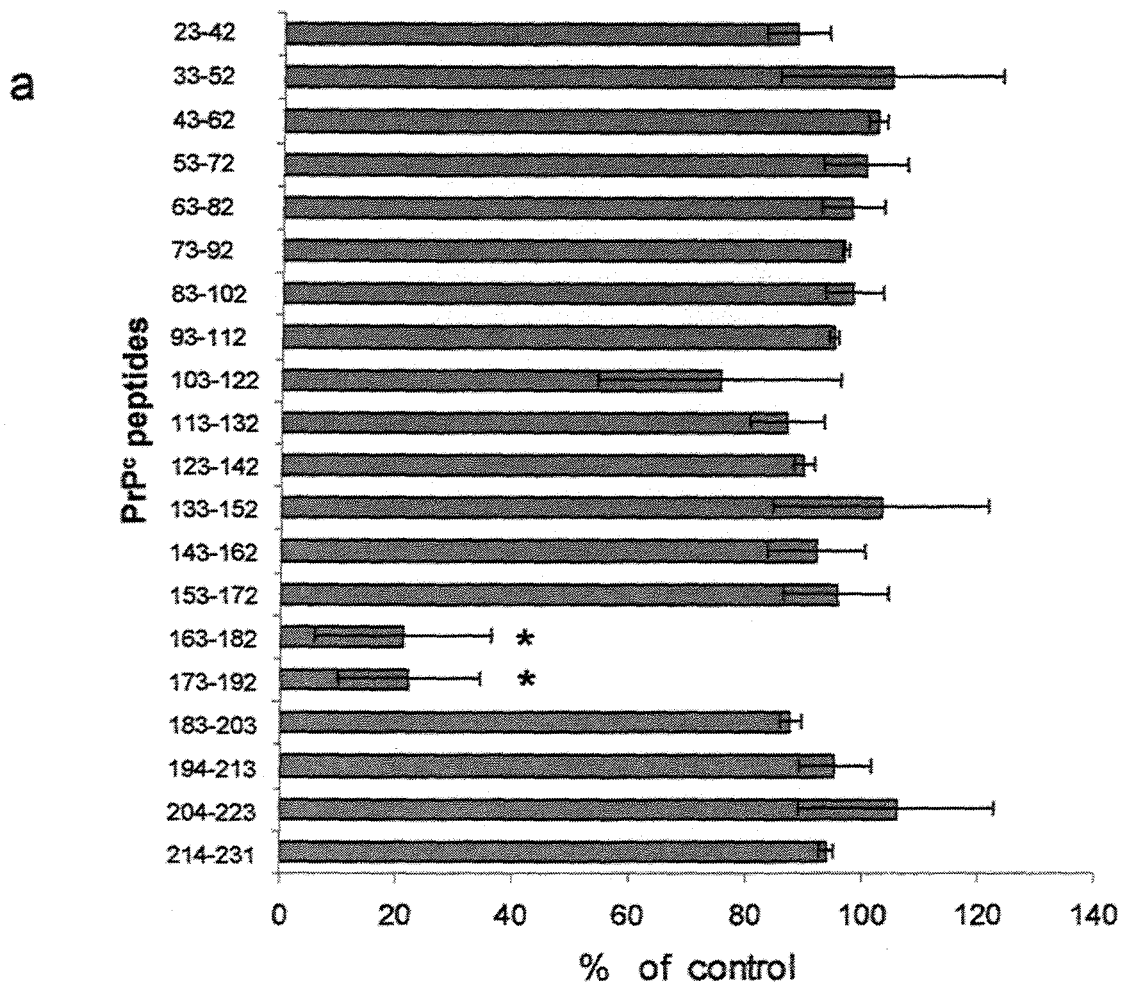


Figure 3

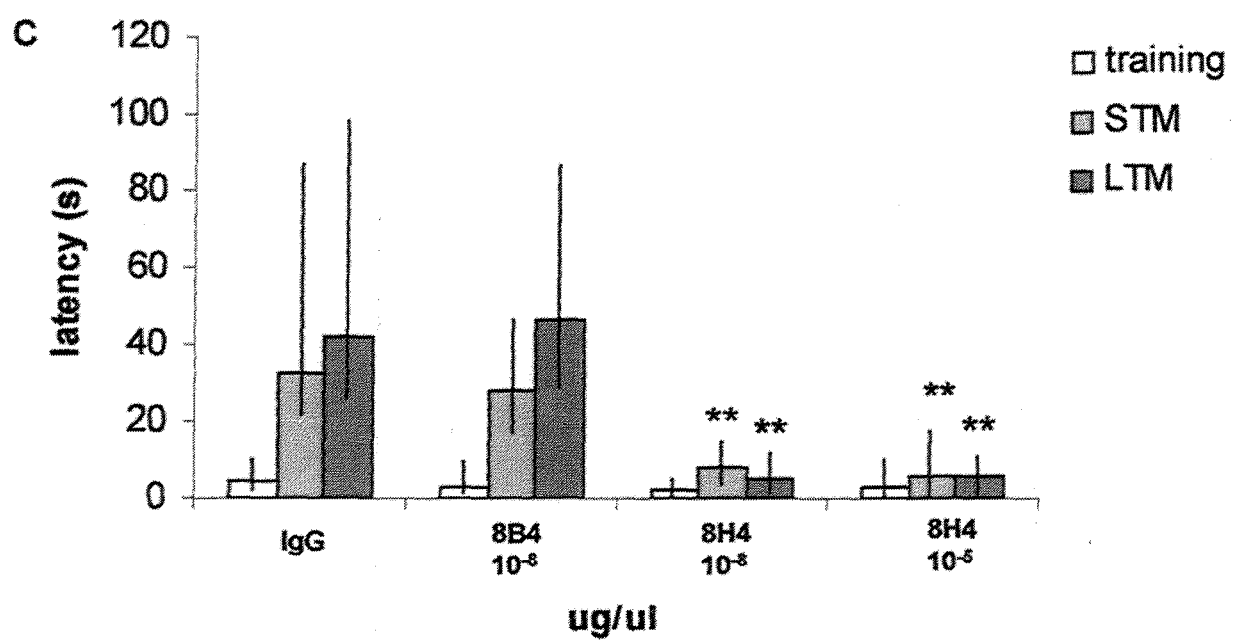


Figure 3

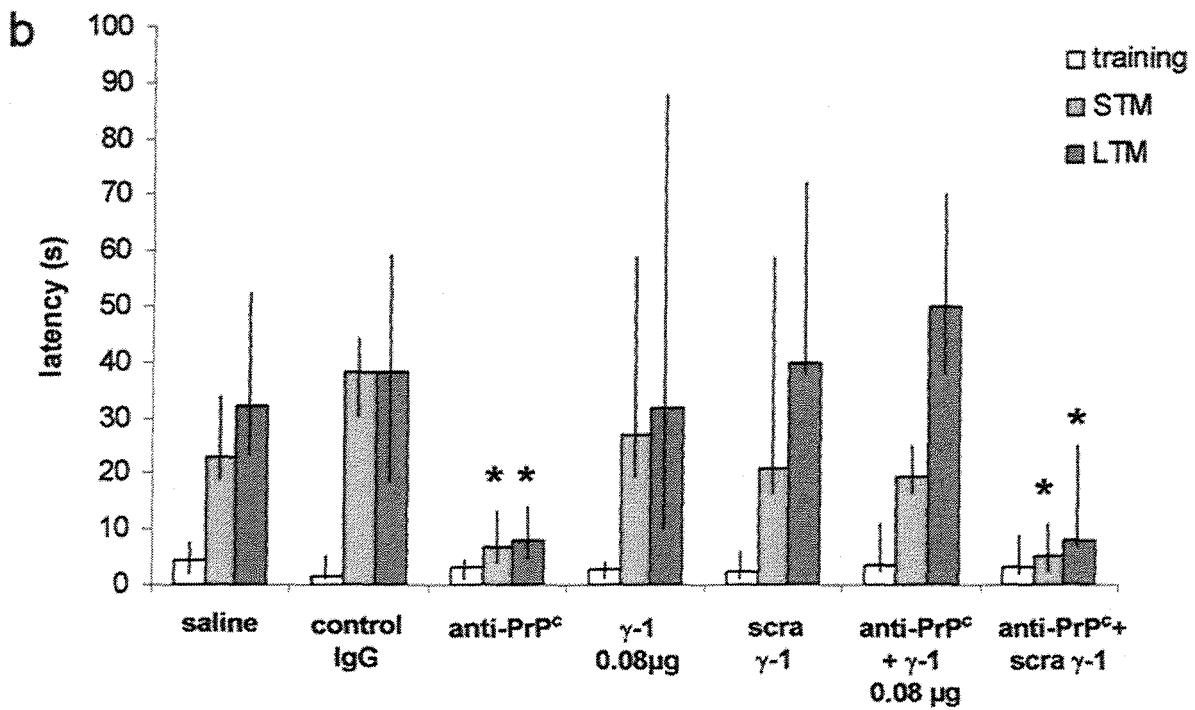
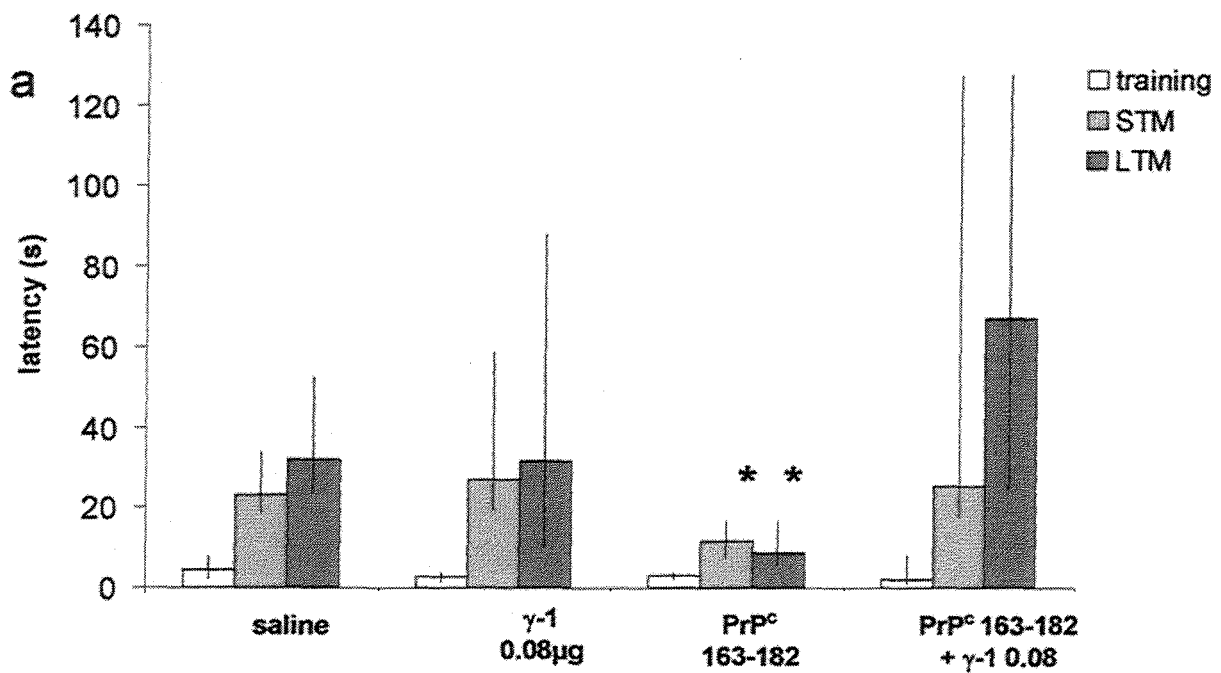


Figure 4

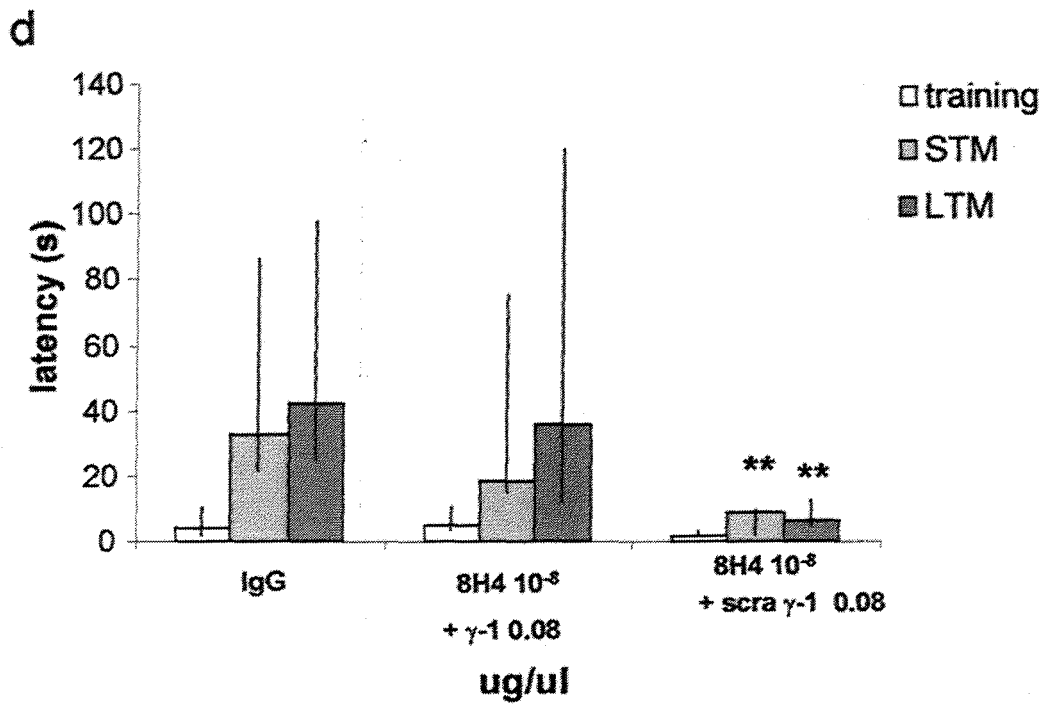
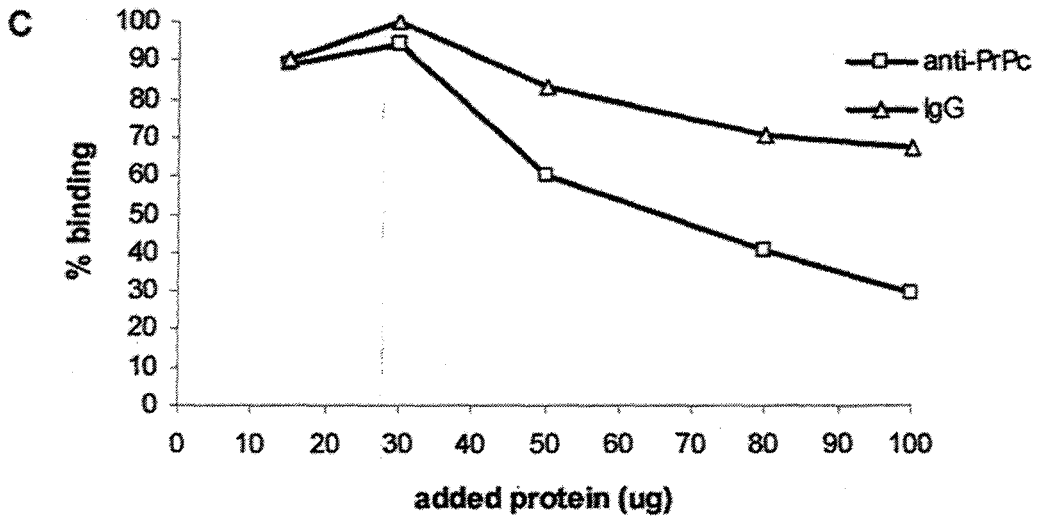


Figure 4

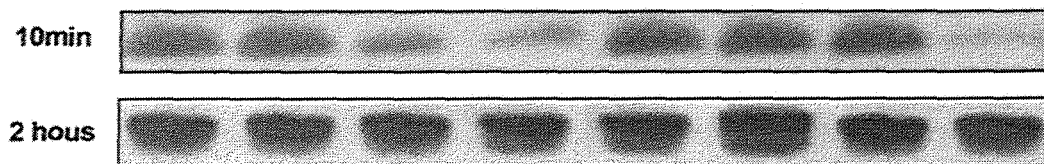
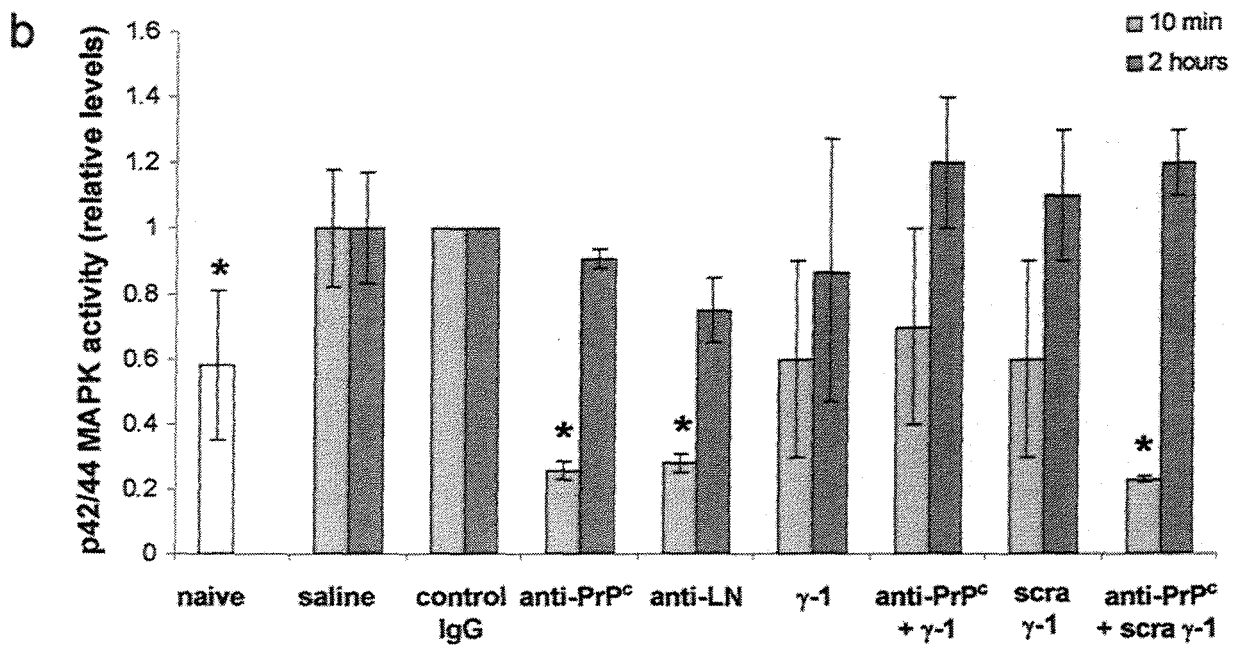
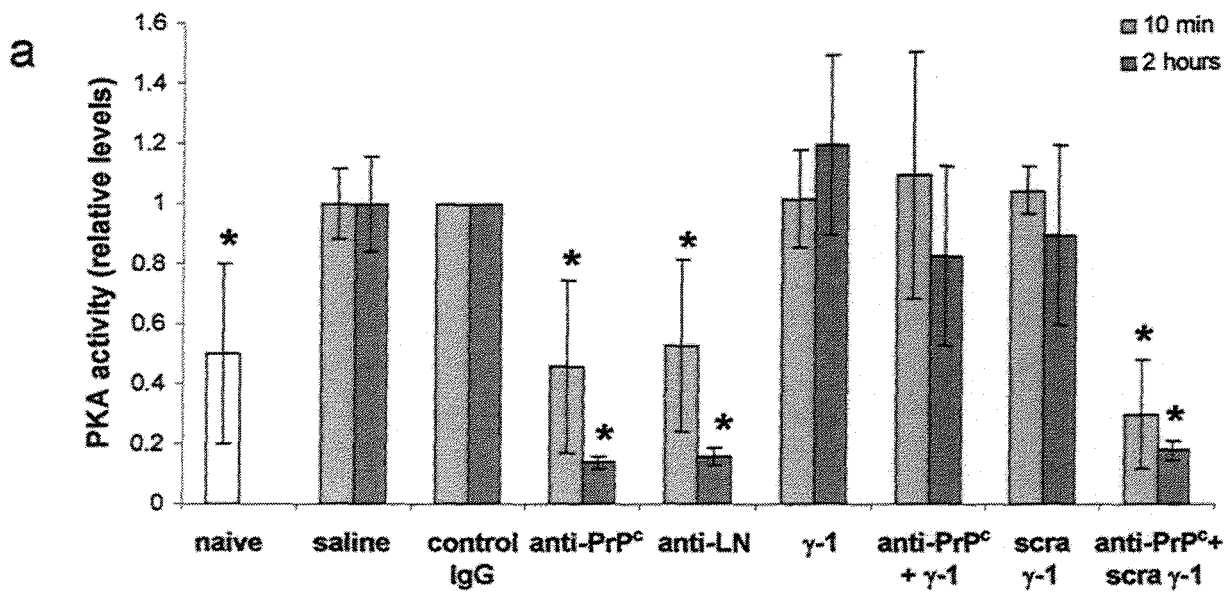


Figure 5

CAPÍTULO II

A interação PrP^c-STI1 está envolvida na consolidação da memória

Zanata e colaboradores (2002) identificaram a proteína STI1 (stress inducible protein 1), uma proteína de membrana que liga-se a PrP^c. A STI1 é uma co-chaperonina que foi descrita como participante de um complexo macromolecular com a família das proteínas Hsp 70 e Hsp 90 (Blatch *et al.*, 1997; Lässle *et al.*, 1997).

A interação PrP^c-STI1 promove neuroproteção através da via sinalizadora cAMP/PKA (Chiarini *et al.*, 2002). A interação entre PrP^c e STI1 ocorre no domínio hidrofóbico de PrP^c, aminoácidos 113-128 (Zanata *et al.*, 2002) que está envolvido nas interações que levam a formação de PrP^{sc} (Chabry *et al.*, 1998). Além disso, como STI1 também é encontrada em complexo com certas chaperonas (Lassle *et al.*, 1997) é possível que possa participar na conversão de PrP^c.

Tendo em vista que a ligação de PrP^c a STI1 apresenta importantes efeitos fisiológicos descritos em experimentos *in vitro* (Chiarini *et al.*, 2002), neste trabalho, investigamos a relevância desta interação *in vivo*. Para tanto, estudamos o efeito de diferentes anticorpos e peptídeos relacionados a STI1 e PrP^c infundidos na região

CA1 do hipocampo de ratos Wistar, sobre a consolidação da STM e LTM na tarefa de esquiva inibitória.

Os resultados demonstrados neste capítulo estão sendo processados para submissão a uma revista especializada.

A interação PrP^c-STI1 está envolvida na consolidação da memória

1. Introdução

Diferentes ligantes e receptores para a proteína prion celular já foram descritos. Estudos propuseram que PrP^c pode requerer uma proteína transmembrana para conectar-se com o meio intracelular e, ainda, recrutar componentes das vesículas encapadas por clatrina (Shyng *et al.*, 1994; Shyng *et al.*, 1995). Alguns grupos têm tentado caracterizar a proteína celular que está associada com PrP^c ou PrP^{sc} e que seria responsável pela internalização e conversão destas proteínas. No entanto, a complexidade destes mecanismos, dificulta a aplicação do conceito de receptor de prion (Lee *et al.*, 2003).

Em 1997, Martins e colaboradores identificaram e caracterizaram um ligante de PrP^c usando a teoria da hidropaticidade complementar. O grupo sintetizou um peptídeo complementar a região do prion humano localizada entre os aminoácidos 114 a 126, previamente descrita como neurotóxica em cultura de células (Forloni *et al.*, 1993) e responsável pela internalização de PrP^c (Shyng *et al.*, 1995). Este domínio de PrP^c deveria ser o sítio de interação com um provável receptor. Anticorpos contra este peptídeo reconheceram uma proteína de membrana de 66 kDa que liga-se a PrP^c tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Além disso, o

peptídeo complementar e seu anticorpo inibiram a toxicidade de um peptídeo derivado de prion em células neuronais em cultura.

Zanata e colaboradores (2002) identificaram este ligante de 66 kDa como sendo a proteína STI1 (stress inducible protein 1), uma proteína de membrana que liga-se a PrP^c. A interação PrP^c-STI1 promove neuroproteção através da via sinalizadora cAMP/PKA (Chiarini *et al.*, 2002).

A região compreendendo os aminoácidos 113-128 do PrP^c de camundongos é o único sítio de ligação para STI1 e esta interação é independente de cobre (Zanata *et al.*, 2002). Previamente foi mostrado que a STI1 é igualmente distribuída no citoplasma entre o complexo de Golgi e pequenas vesículas (Honoré *et al.*, 1992; Lassle *et al.*, 1997). Martins e colaboradores (1997) demonstraram que além da localização citoplasmática, uma pequena fração de STI1 apresenta-se na superfície celular.

Neste trabalho, investigamos o papel da interação de PrP^c a STI1 sobre a consolidação da STM e LTM na tarefa de esQUIVA inibitória uma vez que esta associação apresenta importantes efeitos fisiológicos (Chiarini *et al.*, 2002). Desta forma, avaliamos o efeito de diferentes anticorpos e peptídeos relacionados a STI1 e PrP^c infundidos na região CA1 do hipocampo de ratos Wistar.

2. Material e Métodos

2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (3-4 meses de idade) pesando entre 200 e 300 gramas. Os animais eram provenientes do biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS. O acondicionamento dos animais ocorreu em caixas moradias com no mínimo três e no máximo cinco animais que recebiam água e comida à vontade e submetidos a ciclos de claro-escuro de 12 h com luzes sendo acesas às 7:00.

2.2. Procedimento cirúrgico

Os animais foram previamente submetidos à cirurgia estereotáxica para colocação de cânulas na região CA1 do hipocampo dorsal, através das quais foram feitas as infusões. As coordenadas para a cirurgia estereotáxica foram adaptadas do Atlas de Paxinos e Watson (1986) para que as infusões atingissem a região CA1 do hipocampo dorsal (A 4,3 mm, L 4,0 mm, V 3,4 mm).

Primeiramente os animais foram anestesiados com tiopental (30-50 mg/Kg) e após, submetidos a esterotaxia. As cânulas medindo 0,9 cm foram fixadas na região cerebral desejada utilizando-se acrílico polimerizado. As cânulas utilizadas para a infusão dos tratamentos

mediam 1 cm, ou seja, 0,1 cm além das implantadas. Os animais recuperaram-se da cirurgia entre 3 e 5 dias quando foram submetidos aos experimentos comportamentais.

2.3 Esquiva inibitória

Os animais foram inicialmente submetidos a uma sessão de treinamento individual, na qual eram gentilmente colocados sobre a plataforma fixa na lateral esquerda da caixa de esquiva inibitória e permitidos a explorar o contexto do aparato. No momento em que desciam da plataforma com as quatro patas na grade de barras de bronze eletrificada que constituem o assoalho da caixa os animais recebiam um choque elétrico de 0,5 mA por 2-3 segundos. Os animais eram então retirados e recolocados em suas caixas moradias.

Na sessão de teste, realizada 1h30 após a sessão de treino para medida da STM e 24 após para a LTM, os animais eram recolocados sobre a plataforma da caixa de esquiva, mas não receberam choque. A latência para a descida da plataforma na sessão de teste foi utilizada para avaliar a memória.

2.4 Tratamentos farmacológicos

Os animais receberam, imediatamente após a sessão de treino, infusões bilaterais de 0,5 μ l através de suas cânulas. Os seguintes tratamentos foram administrados:

- IgG purificada de coelho não imunizado (Sigma)
- Peptídeo complementar - seqüência HVATKAPHHGPCRSSA, este peptídeo foi gerado a partir da hidropaticidade complementar e mimetiza o sítio de interação de PrP^c ao seu ligante (Martins *et al.*, 1997).
- Peptídeo scrambled do peptídeo complementar - seqüência KSRGHVHCHAPAPATS, usado como controle negativo.
- Peptídeo da STI1 - seqüência ELGNDAYKKKDFDKAL, equivalente ao sítio de STI1 que interage com PrP^c.
- Peptídeo da região amino terminal de ST1 - seqüência ELCEKAIEVGRENRED, (não liga PrP^c)
- Anti-STI1 (IgG purificada de soro de coelho anti-STI1 recombinante de camundongo)
- Anti-peptídeo de STI1 - IgG purificada de soro de coelho anti-peptídeo de STI1 (equivalente ao sítio de interação com PrP^c).
- Peptídeo de PrP^c 106-126 - seqüência TNMLHMAGAAAAGAVVGGL que corresponde a região dos

aminoácidos 106-126 de PrP^c que é o sítio de interação com STI1.

- Anti-peptídeo de PrP^c 106-126 - IgG purificada de soro de coelho anti-peptídeo de PrP^c (equivalente ao sítio de interação com STI1).
- Peptídeo de PrP^c equivalente aos aminoácidos 73-92 - seqüência GQPHGGSWGQPHGGGWQGG, (não liga STI1).

2.5 Análise estatística

Os dados da tarefa de esquiva inibitória são mostrados como mediana (intervalos interquartis) das latências para descida da plataforma. Comparações entre os grupos foram feitas pelo teste de Mann-Whitney U. Em todas as comparações, $p < 0,05$ foi considerado significativo.

3. Resultados e discussão

Nas figuras 1 e 2 observamos, respectivamente, o efeito da administração, imediatamente pós-treino, de um anticorpo produzido contra a proteína STI1 (anti-STI1) e de outro que se reconhece o peptídeo de STI1 que é o domínio de interação com PrP^c (anti-peptídeo STI1). Os resultados demonstraram que a infusão de ambos os

anticorpos promoveu amnésia tanto na STM quanto na LTM, indicando que STI1 está envolvida com a formação da memória e que isso é mediado por seu sítio de interação com PrP^c.

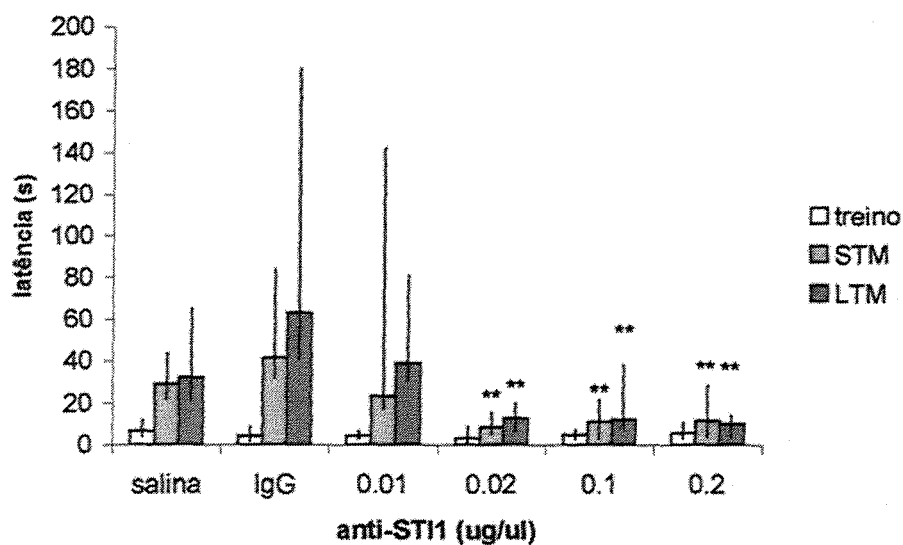


Figura 1: Efeito de administrações intra-hipocampais bilaterais de salina, IgG (1,0 μ g/ μ l) e IgG anti-STI1 (0,01; 0,02; 0,1 e 0,2 μ g/ μ l) sobre a consolidação da STM e LTM. Os valores representam a mediana no tempo de latência na plataforma de ratos submetidos ao teste de esquila inibitória. * significativamente diferente do grupo que recebeu salina ou IgG (teste de Mann-Whitney U, $p < 0,05$).

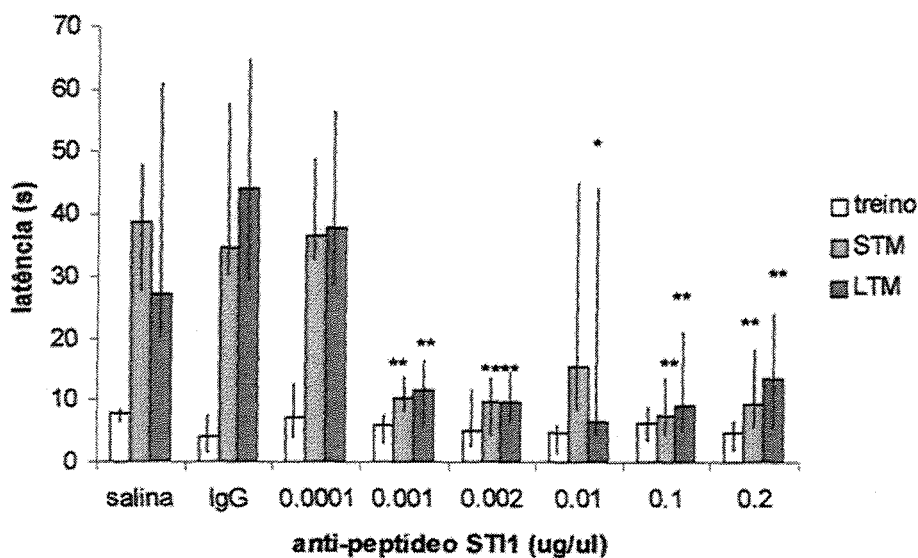


Figura 2: Efeito de administrações intra-hipocampais bilaterais de salina, IgG (1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) e IgG anti-peptídeo STI1 (0,0001; 0,001; 0,002; 0,01; 0,1 e 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) sobre a consolidação da STM e LTM. Os valores representam a mediana do tempo de latência na plataforma de ratos submetidos ao teste de esquivas inibitórias. * significativamente diferente do grupo que recebeu salina ou IgG (teste de Mann-Whitney U, $p < 0,05$).

Uma vez observado que o bloqueio da proteína STI1 promove déficit tanto na STM quanto na LTM, investigamos o efeito da administração do seu peptídeo que equivale ao sítio de interação com a molécula de PrP^C. Este peptídeo foi capaz de competir pela interação PrP^C-STI1 *in vitro* (Zanata *et al.*, 2002).

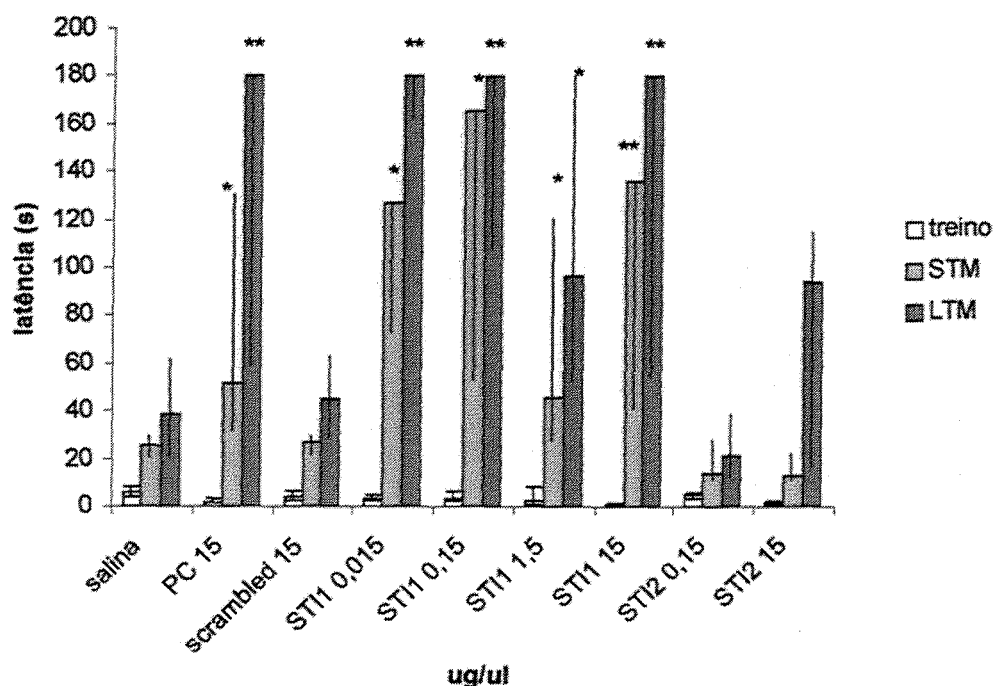


Figura 3. Efeito da administração intra-hipocampal bilateral de salina, peptídeo complementar (PC), scrambled, peptídeo da STI1 (STI1) e peptídeo amino da STI1 (STI2) sobre a consolidação da STM e LTM. Os valores representam a mediana do tempo de latência na plataforma de ratos submetidos ao teste de esquiiva inibitória. * significativamente diferente do grupo que recebeu salina (teste de Mann-Whitney U, $p < 0,05$).

Na figura 3, observamos o efeito da infusão do peptídeo de STI1 e do peptídeo complementar (Martins *et al.*, 1997) sobre a memória. Observamos que o peptídeo de STI1 quando infundido imediatamente após o treino, melhorou tanto a STM quanto a LTM em todas as concentrações estudadas. Paralelamente, o peptídeo complementar (PC) apresentou o mesmo efeito, só que em concentrações 10 vezes maiores.

Este mesmo resultado já havia sido observado anteriormente, quando a atividade destes reagentes de resgatar neurônios da morte celular programada foi caracterizada (Chiarini *et al.*, 2002). Isto se deve ao fato do peptídeo complementar ter o mesmo perfil de hidropaticidade do domínio de STI1, mas de não ser o ligante fisiológico de PrP^c. O peptídeo *scrambled* contém os mesmos aminoácidos do PC, mas numa seqüência diferente (usado como controle negativo) e o peptídeo de STI2 que representa outro domínio de STI1 que não liga a PrP^c, não produziram qualquer efeito sobre os parâmetros analisados. Estes dados sugerem que a ligação do peptídeo de STI1 a PrP^c é capaz de potencializar a formação tanto de STM quanto de LTM.

Por outro lado, os resultados da figura 4 demonstram que o peptídeo de PrP^c 106-126, nas duas concentrações estudadas, bloqueou tanto a STM quanto a LTM, enquanto o peptídeo de PrP^c 73-92, não apresentou qualquer efeito. Tendo em vista que o peptídeo 106-126 liga-se a região de PrP^c que é o sítio de ligação de STI1, este efeito indica que este pode ser devido a uma competição pela interação PrP^c-STI1. Este resultado demonstra, mais uma vez, a importância da interação PrP^c-STI1 no processo de consolidação da memória. Além disso, a falta de efeito observado pela infusão do peptídeo 73-92 mostra que o efeito não é aleatório e provocado pela adição de qualquer peptídeo em particular de PrP^c ao sistema.

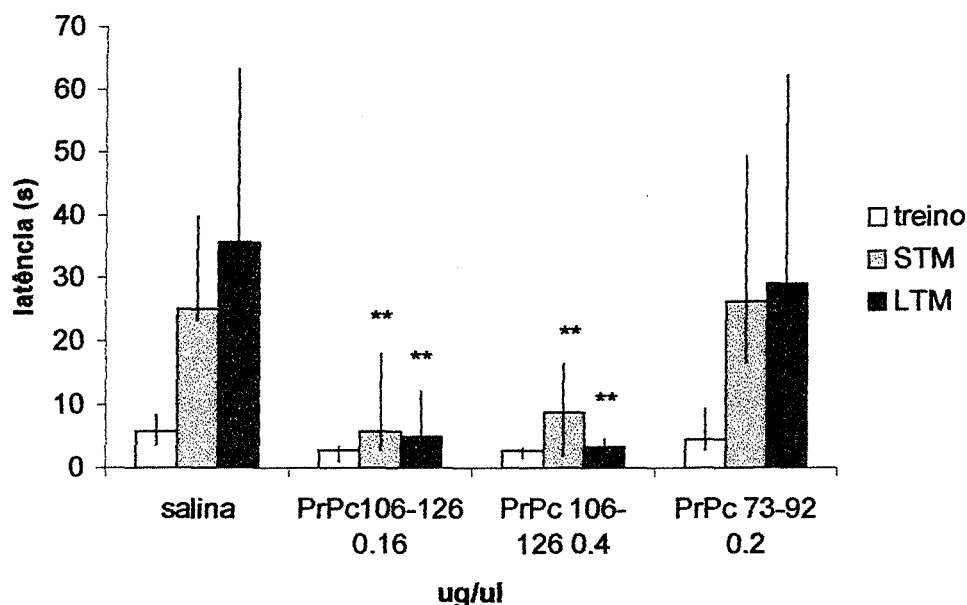


Figura 4. Efeito da administração intra-hipocampal bilateral de salina, peptídeo de PrP^c 106-126 (0,16 e 0,4 µg/µl) e peptídeo que corresponde aos aminoácidos 73-92 de PrP^c (0,2 µg/µl) sobre a consolidação da STM e LTM. Os valores representam a mediana do tempo de latência na plataforma de ratos submetidos ao teste de esquiwa inibitória. * significativamente diferente do grupo que recebeu salina (teste de Mann-Whitney U, p<0,05).

Na figura 5, observamos que a infusão do peptídeo de STI1 é capaz de reverter o efeito amnésico do anticorpo anti-PrP^c 106-126 indicando uma possível competição pelo sítio de ligação de STI1 em PrP^c. Esta hipótese é reforçada pelo resultado que mostra que a infusão de um peptídeo irrelevante de STI1, não foi capaz de modificar o efeito do anticorpo anti-PrP^c 106-126.

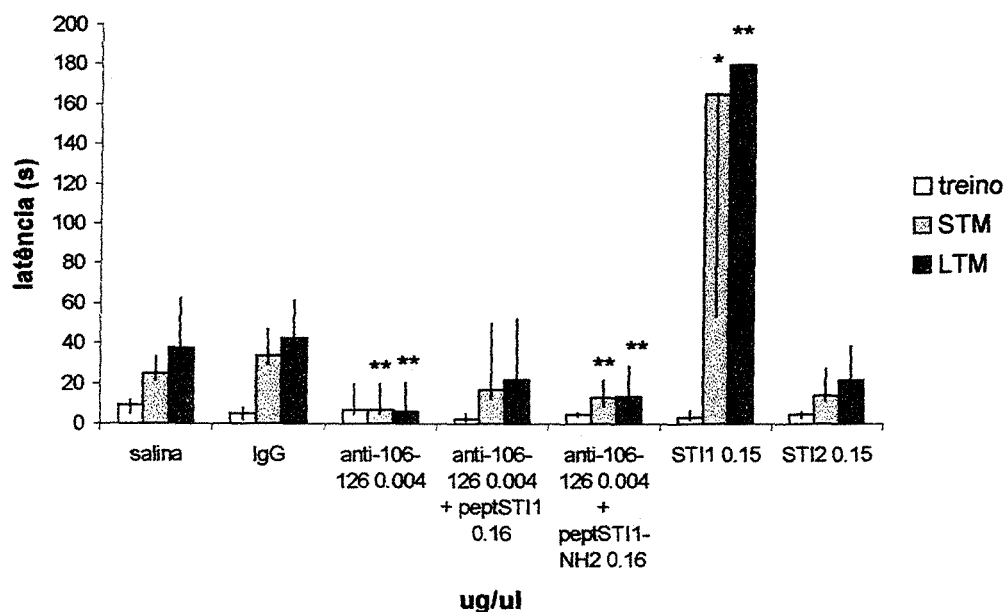


Figura 5: Efeito da administração intra-hipocampal bilateral de salina, IgG (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), IgG anti-PrP^c 106-126 (0,004 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), anti-PrP^c 106-126 (0,004 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) co-infundido com peptídeo de STI1 (0,16 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), anti-PrP^c 106-126 (0,004 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) co-infundido com peptídeo irrelevante de STI1 (0,16 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), peptídeo de STI1 (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) e peptídeo de STI1 amino (STI2; 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) sobre a consolidação da STM e LTM. Os valores representam a mediana do tempo de latência na plataforma de ratos submetidos ao teste de esQUIVA inibitória. * significativamente diferente do grupo que recebeu salina ou IgG (teste de Mann-Whitney U, $p < 0,05$).

Em suma, os resultados demonstrados sugerem que a interação PrP^c-STI1 é crucial para a consolidação das memórias de curta e longa duração. Além disso, a interação entre estas proteínas possivelmente ativa vias de transdução de sinal indispensáveis ao processo de consolidação da memória. Novos estudos serão necessários para investigar os mecanismos envolvidos neste processo.

CAPÍTULO III

A exclusão da proteína prion celular leva a prejuízos comportamentais em função da idade

Desde a descoberta da proteína prion celular, a produção de diferentes cepas de animais *knockout* para PrP^c levou a comunidade científica a crer que a função desta enigmática proteína seria elucidada. No entanto, os estudos realizados com estes animais demonstraram poucas alterações significativas visíveis à simples observação (Büeler *et al.*, 1992), embora outros grupos tenham relatado defeitos em sinapses (Collinge *et al.*, 1994; Manson *et al.*, 1995) e na função celular hipocampal (Collinge *et al.*, 1996). Dados de nosso laboratório demonstraram previamente que animais Prnp^{0/0} adultos (3 meses de idade) não apresentaram déficits cognitivos, exceto um pequeno aumento da atividade locomotora (Roesler *et al.*, 1999). Todos estes dados apontam para uma possível ação de mecanismos compensatórios desenvolvidos nestes animais que supririam a falta de PrP^c.

Uma vez que grande parte dos estudos realizados até o momento investigou a relevância do PrP^c nos mais variados parâmetros utilizando animais jovens, o objetivo deste trabalho é verificar se a função do PrP^c permanece inalterada em animais mais velhos. Para tanto, utilizamos

camundongos $Prnp^{0/0}$ (Büeler *et al.*, 1992) em diferentes idades e os testamos nas tarefas comportamentais de esquiva inibitória, de campo aberto e labirinto em cruz elevado (*plus-maze*). Além disso, foram também utilizados ratos Wistar, nas mesmas idades, infundidos com anticorpo anti-PrP^c no hipocampo.

O artigo "Cellular prion protein ablation impairs behavior as a function of age" está publicado na revista *Neuroreport*.

CAPÍTULO IV

A hiperlocomoção induzida por MK-801, mas não por anfetamina e cafeína, está diminuída em camundongos que não expressam a proteína prion celular

A maioria das doenças causadas por prions em humanos apresenta alguns sintomas psiquiátricos comuns, como alterações de comportamento e psicose. Isso levou os pesquisadores a investigar a possível função de mutações no gene que codifica o PrP^c na etiologia de doenças psiquiátricas. Um estudo pioneiro coordenado por Samaia e colaboradores (1998) identificou que uma substituição no códon 171 do gene *Prnp* co-segregava com um tipo raro de doença esquizo-afetiva em indivíduos pertencentes a uma mesma família. Estes resultados não foram reproduzidos em outros estudos que demonstraram a falta de associação entre mutações e polimorfismos no gene que codifica o prion humano a esquizofrenia (Rujescu *et al.*, 2002; Tsai *et al.*, 2001).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o possível envolvimento do PrP^c na neurotransmissão relacionada a alterações comportamentais presentes em doenças psicóticas. Para tanto, investigou-se o efeito de três substâncias conhecidas por induzirem hiperlocomoção em baixas doses: o MK-801, antagonista dos

receptores glutamatérgicos NMDA; a anfetamina, clássico modelo dopaminérgico para doenças psicóticas e a cafeína, antagonista dos receptores da adenosina, no comportamento locomotor de camundongos *Prnp*^{0/0} (*Zrch-1*) (*Büeler et al.*, 1992) e controles.

O artigo "Decreased hyperlocomotion induced by MK-801, but not amphetamine and caffeine in mice lacking cellular prion protein (PrP^C)" está publicado na revista *Molecular Brain Reserch*.

DISCUSSÃO

As funções fisiológicas de PrP^c começam a ser desvendadas. Estudos prévios demonstraram que a interação PrP^c-laminina está envolvida na neuritogênese (Graner *et al.*, 2000), enquanto a de PrP^c-STI1, na neuroproteção (Zanata *et al.*, 2002), eventos importantes para a plasticidade e a formação da memória.

Nossos dados demonstram que a interação PrP^c-laminina está envolvida na consolidação da memória de curta e longa duração uma vez que anticorpos específicos, anti-PrP^c e anti-laminina, promoveram amnésia medida na tarefa da esquiva inibitória. No entanto, observamos ausência de efeito aditivo na consolidação da memória após a infusão do peptídeo γ -1 da laminina. Isto pode ocorrer porque o peptídeo inteiro não é capaz de mediar os efeitos da laminina inteira ou ainda porque a interação PrP^c-LN no sistema está saturada. Porém, a co-infusão desse peptídeo com o anticorpo anti-PrP^c reverteu o efeito amnésico desse último, indicando assim que a manutenção da ligação entre PrP^c e o sítio específico da cadeia gama1 da laminina é importante para o estabelecimento da memória.

A infusão do anticorpo monoclonal 8H4 que reconhece epítipo localizado na região C-terminal de PrP^c entre os aminoácidos 175-185 (Cui *et al.*, 2001), portanto, sítio de ligação da proteína a laminina,

inibiu a STM e a LTM. A ausência de efeito é observada após a infusão do anticorpo monoclonal 8B4 que reconhece os aminoácidos 34 a 52 de PrP^c (Cui *et al.*, 2003), logo, dirigido a um epítipo fora da região de ligação à laminina. Desta forma, observamos que a especificidade do sítio de ligação de laminina a PrP^c é crucial para a formação da memória e o efeito não é inespecífico e dado por ligação a uma proteína qualquer na superfície celular.

Os resultados sugerem ainda que a interação PrP^c-laminina desencadeia sinais via cAMP/PKA/MAPK para a consolidação da memória de curta duração enquanto que para a consolidação da memória de longa duração apenas a via cAMP/PKA parece envolvida.

Além da importância da interação PrP^c-laminina na memória, também demonstramos que a interação PrP^c-STI1 é crucial em processos de consolidação da memória já que a ruptura desta ligação promove amnésia em ratos submetidos à tarefa de esquiva inibitória. O sítio de PrP^c onde STI1 se liga é específico para desencadear os processos responsáveis pela formação da STM e LTM uma vez que a infusão de STI1 recombinante ou do seu peptídeo ligante de PrP^c melhoram STM e LTM, enquanto peptídeos de outros domínios da molécula são inócuos. Além disso, a administração de anticorpos anti-STI1 ou anti o peptídeo de STI1 ligante de PrP^c bloquearam a STM e a LTM.

A importância da interação de PrP^c a STI1 na consolidação da STM e LTM foi reforçada pela infusão do peptídeo de PrP^c 106-126 (reconhece STI1) que promoveu amnésia, provavelmente por inibir esta interação. Novos estudos serão necessários para avaliar os mecanismos moleculares e bioquímicos disparados pela interação PrP^c-STI1 que são indispensáveis à consolidação da STM e LTM.

Adicionalmente, verificamos que o envolvimento de sistemas na formação da memória tornam-se mais susceptíveis a mecanismos que requerem PrP^c em animais mais velhos (entre as idades de 3 e 9 meses). Estes dados estão em acordo com estudo realizado por Curtis e colaboradores (2003) demonstrando uma redução significativa nos níveis de potenciação pós-tetânica e da potenciação de longa duração em animais Prnp^{0/0} com idade média de 10 meses.

A falta de alterações comportamentais significativas em animais Prnp^{0/0} sugere que mecanismos compensatórios como a superexpressão de outras proteínas podem atenuar a falta de PrP^c. Deste modo, estes mecanismos provavelmente atuam aos 3, mas não aos 9 meses de idade, demonstrando que os mecanismos que requerem PrP^c tornam-se mais lábeis com o envelhecimento. Além disso, o déficit locomotor e exploratório observado nos camundongos Prnp^{0/0} aos 9 meses, mas não em ratos infundidos com anti-PrP^c sugerem que estes prejuízos são independentes do déficit cognitivo.

No último trabalho, observamos que camundongos $Prnp^{0/0}$ apresentaram hiperlocomoção induzida por MK-801, antagonista dos receptores glutamatérgicos NMDA, diminuída e não afetada por anfetamina, clássico modelo dopaminérgico para doenças psicóticas ou cafeína, antagonista dos receptores da adenosina. Uma vez que a supressão da expressão de PrP^c é um modelo para a falta da proteína, mutações específicas na proteína poderiam levar a uma perda da função que poderia ser responsável por comportamentos psicóticos relatados em pacientes com doenças causadas por prions.

O mecanismo envolvido na diminuição da hiperlocomoção induzida por MK-801 em camundongos $Prnp^{0/0}$ é desconhecido. No entanto, diversos estudos demonstraram distúrbios em sistemas neurotransmissores em animais infectados com prions sugerindo que a perda de função de PrP^c após a conversão a PrP^{sc} pode levar a alteração de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA.

A diminuição da hiperlocomoção induzida por MK-801 pode sugerir distúrbios ao nível de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA nos animais *knockout* para PrP^c . No entanto, a expressão dos subtipos de receptores NMDA, NR2A, NR2B e NR1 em extratos de hipocampus destes animais não mostrou qualquer diferença com os controles (dados não mostrados). Desta forma, novos estudos serão necessários para elucidar os mecanismos envolvidos no efeito observado.

Em suma, os resultados principais demonstrados nesta tese sugerem que a interação PrP^c-laminina e PrP^c-STI1 são cruciais para a consolidação das memórias de curta e longa duração. Desta forma, indicam que PrP^c pode fazer parte de um complexo macromolecular formado entre proteínas de superfície celular e extracelulares que incluiria a laminina, PrP^c e a STI1. A interação destas proteínas seria responsável pela transdução de sinais importantes e cruciais em processos cognitivos como a consolidação da memória.

CONCLUSÕES

- A interação PrP^c-laminina está envolvida na consolidação da memória de curta e longa duração em ratos submetidos a tarefa de esquiva inibitória.

- A interação PrP^c-laminina desencadeia sinais via cAMP/PKA/MAPK para a consolidação da memória de curta duração, enquanto que para a consolidação da memória de longa duração apenas a via cAMP/PKA parece envolvida.

- A interação PrP^c-STI1 é crucial em processos de consolidação da memória uma vez que a ruptura desta ligação promove amnésia em ratos submetidos à tarefa de esquiva inibitória.

- O envolvimento dos sistemas formadores da memória tornam-se mais susceptíveis a mecanismos que requerem PrP^c em animais mais velhos (entre as idades de 3 e 9 meses).

- O déficit locomotor observado nos camundongos Prnp^{0/0} aos 9 meses, mas não em ratos infundidos com anti-PrP^c sugere que este prejuízo é independente do déficit cognitivo.

- Camundongos Prnp^{0/0} apresentaram hiperlocomoção induzida por MK-801 diminuída e não afetada por anfetamina ou cafeína.

- A diminuição da hiperlocomoção induzida por MK-801 sugere distúrbios ao nível de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA em animais *knockout* para PrP^c.

PERSPECTIVAS

- Avaliar a memória e outros parâmetros comportamentais em camundongo "knockout condicional" para PrP^c.

- Avaliar as vias bioquímicas disparadas pela interação PrP^c-STI1 que são indispensáveis à consolidação da memória.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguzzi, A.; Weissmann, C. Prions research: the next frontiers. **Nature**, 389: 795-798, 1997.
2. Barry, R.A.; Prusiner, S.B. monoclonal antibodies to the cellular and scrapie prion proteins. **Journal of Infectious Disease**, 154:518-521, 1986.
3. Basler, K.; Oesch, B.; Scott, M.; Westaway, D.; Walchli, M.; Groth, D.F.; McKinley, M.P.; Prusiner, S.B.; Weissmann, C. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. **Cell**, 46:417-428, 1986.
4. Bernabeu, R.; Bevilaqua, L.; Ardenghi, P.; Bromberg, E.; Schmitz, P.; Bianchin, M.; Izquierdo, I.; Medina, J.H. Involvement of hippocampal D1/D5 receptor camp signaling pathways in the late memory consolidation phase of an aversively-motivated task in rats. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, 94:104-146, 1997.
5. Bianchin, M., Mello e Souza, T., Medina, J.H., Izquierdo, I. The amygdala is involved in the modulation of long-term memory, but not in working or short-term memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, 71:127-31, 1999.
6. Blatch, K.; Lassel, M.; Takatori, T.; Grandhi, T.; Kundra, V. Isolation of a mouse cDNA encoding mSTI1, a stress-inducible protein containing the TPR motif. **Gene**, 194:277-282, 1997.
7. Brown, D.R.; Qin, K.; Herms, J.W.; Madlung, A.; Manson, J.; Strome, R.; Fraser, P.E.; Kruch, T.; von Bohlen, A.; Schulz-Schaeffer, W.; Giese A.; Westaway, D.; Kretschmar, H. The cellular prion protein binds copper in vivo. **Nature**, 390: 684-687, 1997a.

8. Brown, D.R.; Schulz-Schaeffer, W.J.; Schmidt, B.; Kretzchmar, H.A. Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. **Experimental Neurology**, 146: 104-112, 1997b.
9. Brown, D.R.; Besinger, A. Prion expression and superoxide dismutase activity. **Biochemical Journal**, 334: 423-429, 1998.
10. Büeler, H.; Fischer, M.; Lang, Y.; Fluethmann, H.; Lipp, H.P.; DeArmond, S.J.; Prusiner, S.B.; Aguet, M.; Weissmann, C. Normal development and behavior of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. **Nature**, 356:577-582, 1992.
11. Büeler, H.; Aguzzi, A.; Sailer, A.; Greiner, R.A.; Autenried, P.; Aguet, M.; Weissmann, C. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. **Cell**, 73:1339-1347, 1993.
12. Cahill, L., McGaugh, J.L. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. **TINS**, 21:294-99, 1998.
13. Cashman, N.R; Loertsche, R.; Nalbantoglu, J.; Shaw, I.; Kascsak, R.J.; Bolton, D.C.; Bendheim, P.E. Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. **Cell**, 61:185-192, 1990.
14. Chabry, J.; Caughey, B.; Chesebro, B. Specific inhibition of in vitro formation of protease-resistant prion protein by synthetic peptides. **Journal of Biological Chemistry**, 273:13203-13207, 1998.
15. Chen, Z.L.; Strickland, S. Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalysed degradation of laminin. **Cell**, 91:917-925, 1997.
16. Chiarini, L.B; Freitas, A.R.O.; Zanata, S.M.; Brentani, R.R; Martins, V.R.; Linden, R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. **The EMBO Journal**, 21:3317-3326, 2002.

17. Chiesa, R. & Harris, D.A. Prion diseases: what is the neurotoxic molecule? **Neurobiology of Disease**. 8:743-63, 2001.
18. Cohen, F.E. & Prusiner, S.B. Pathologic conformations of prion proteins. **Annual Review of Biochemistry**, 67:793-819, 1998.
19. Collinge, J.; Whittington, M.A.; Sidle, K.C.; Smith, C.J.; Palmer, M.S.; Clarke, A.R.; Jeffreys, J.G. Prion protein is necessary for normal synaptic function. **Nature**, 370:295-297, 1994.
20. Collinge, S.B.; Collinge, J.; Jefferys, J.G. Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca(2+)-activated K⁺ currents. **Neurosciences Letters**, 209:49-52, 1996.
21. Colognato, H. & Yurchenco, P.D. Form and function: the laminin family of heterotrimers. **Developmental Dynamics**, 218:213-234, 2000.
22. Cui, T.; Daniels, M.; Wong, B.S.; Li, R.; Sy, M-S; Sasson, J.; Brown, D.R. Mapping the functional domain of the prion protein. **European Journal of Biochemistry**, 270:3368-3376, 2003.
23. Curtis, J.; Errington, M.; Bliss, T.; Voss, K.; MacLeod, N. Age-dependent loss of PTP and LTP in the hippocampus of PrP-null mice. **Neurobiology of Disease**, 13:55-62, 2003.
24. DeArmond, S.J.; Bouzamondo, E. Fundamentals of prion biology and diseases. **Toxicology**, 181-182: 9-16, 2002.
25. Duffy, P.; Wolf, J.; Collins, G.; Devoe, A.; Streeten, B.; Cowen, D. Possible person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. **The New England Journal of Medicine**, 290:692-693, 1974.
26. Einchembaum, H. Is the rodent hippocampus just for 'place'? **Current Opinion in Neurobiology** 6:187-95, 1996a.

27. Forloni, G.; Angaretti, N.; Chiesa, R.; Monzani, E.; Salmona, M.; Bugiani, O.; Tagliavini, F. Neurotoxicity of a prion protein fragment. **Nature**, 362:543-546, 1993.
28. Fuster, J.M. Distributed memory for both short and long term. **Neurobiology of Learning & Memory**. 70:268-74, 1998.
29. Gabinson, R.; Meiner, Z.; Halimi, M.; Bem-Sasson, S.A. Heparin-like molecules bind differentially to prion-proteins and change their intracellular metabolic fate. **Journal of Cellular Physiology**. 157:319-325, 1993.
30. Gajdusek, D.C.; Zigas, V. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea. The endemic occurrence of "kuru" in the native population. **New England Journal of Medicine**, 257:974-978, 1957.
31. Ghetti, B.; Dlouhy, S.R.; Giaccone, G.; Bugiani, O.; Frangione, B.; Forlone, M.R.; Tagliavini, F. Gerstmann-Straussler-Scheinker disease and the Indiana kindred. **Brain Pathology**, 5:61-75, 1995.
32. Gibbs, C.J.Jr.; Gajdusek, D.C.; Asher, D.M.; Alpers, M.P.; Beck, E.; Daniel, P.M.; Mathews, W.B. Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform-encephalopathy): transmission to the chimpanzee, **Science**, 161: 388-389, 1968.
33. Glatzel, M. & Aguzzi, A. The shifting biology of prions. **Brain Research Reviews**, 36:241-248, 2001.
34. Graner, E.; Mercadante, A.F.; Zanata, S.M; Forlenza, O.V.; Cabral, A.L.B.; Veiga, S.S.; Juliano, M.A.; Roesler, R.; Walz, R.; Minetti, A.; Izquierdo, I.; Martins, V.R.; Brentani, R.R. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. **Molecular Brain Research**, 76: 85-92, 2000a.
35. Grimpe, B.; Dong, S.; Doller, C.; Temple, K.; Malouf, A.T.; Silver, J. The critical role of basement membrane-independent

- laminin gamma1 chain during axon regeneration in the CNS. **Journal of Neuroscience**, 22:3144-3160, 2002.
36. Harris, D.A.; Falls, D.L.; Johnson, F.A.L.; Fischbach, G.D. A prion like protein from chicken brain copurifies with a acetylcholine receptor inducing activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 88:7664-7668, 1991.
 37. Hill, A.F.; Zeidler, M.; Ironside, J.; Collinge, J. Diagnosis of the new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. **Lancet**, 349:99-100, 1997
 38. Honoré, B.; Leffers, H.; Madsen, P.; Rasmussen, H.H.; Vandekerckhove, J.; Celis, J.E. Molecular cloning and expression of a transformation-sensitive human protein containing the TPR motif and sharing identity to the stress-inducible yeast protein STI1. **Journal of Biological Chemistry**. 276:8485-8491, 1992.
 39. Hyman, B.T.; Van Hoesen, G.H.; Damasio, A.R. Memory-related neural systems in Alzheimer's disease: an anatomic study. **Neurology**, 40:1721-1730, 1990.
 40. Iijima, T.; Witter, M.P.; Ichikawa, M.; Tominaga, T.; Kajiwara, R.; Matsumoto, G. Entorhinal-hippocampal interactions revealed by real-time imaging. **Science**, 272:1176-1179, 1996.
 41. Indyk, J.A.; Chen, Z.L.; Strickland, S. Laminin chain expression suggests that laminin-10 is a major isoform in the mouse hippocampus and is degraded by the tPA/plasmin system during excitotoxic injury. **Neuroscience**, 116:359-371, 2003.
 42. Izquierdo, I.; Medina, J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, 68: 285-316, 1997.

43. Izquierdo, I., Barros, D.M., Mello e Souza, T., Souza, M.M.; Izquierdo, L.A.; Medina, J.H. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, 393: 635-636, 1998^a.
44. Izquierdo, I.; Izquierdo, L.A.; Barros, D.M.; Mello e Souza, T.; Souza, M.M.; Quevedo, J.; Rodríguez, C.; Sant'anna, M.K.; Madruga, M.; Medina, J.H. Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory. **Behavioral Pharmacology**, 9:421-27, 1998^b.
45. Izquierdo, I.; Medina, J.H.; Izquierdo, L.A.; Barros, D.M.; Souza, M.M.; Mello e Souza, T. Short and long-term memory are differentially regulated by mono-aminergic systems in the rat brain. **Neurobiology of Learning and Memory**, 69:219-24, 1998^c.
46. Izquierdo, I.; Medina, J.H.; Vianna, M.R.; Izquierdo, L.A.; Barros, D.M. Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behavioral Brain Research** 103:1-11, 1999.
47. Izquierdo, I. and McGaugh, J.L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behavioral Pharmacology**, 11: 517-534, 2000.
48. Johnson, R.T.; Gibbs, C.J. Medical progress: Creutzfeldt-Jakob disease and related transmissible spongiform encephalopathies. **The New England Journal of Medicine**, 339:1994-2004, 1998.
49. Kretschmar, H.A.; Stowring, L.E.; Westaway, D.; Stubblebine, W.H.; Prusiner, S.B.; DeArmond, S.J. Molecular cloning of a human prion protein cDNA. **DNA**, 5:315-324, 1986.
50. Klatzo, I.; Gajdusek, D.C.; Zigas, V. Pathology of kuru. **Laboratory Investigation**. 8:799-847, 1959.
51. Kurschner, C; Morgan, J.I. Analysis of interaction sites in homo- and heteromeric complexes containing Bcl-2 family

- members and the cellular prion protein. **Molecular Brain Research**, 37:249-258, 1996.
52. Lässle, M.; Blatch, G.L.; Kundra, V.; Takatori, T.; Zetter, B.R. Stress-inducible, murine protein mSTI1. Characterization of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different kinases. **Journal of Biological Chemistry**, 272: 1876-1884, 1997.
53. Lee, K.S.; Linden, R.; Prado, M.A.M.; Brentani, R.R.; Martins, V.R. Towards cellular receptors for prions. **Reviews in Medical Virology**. 13:399-408, 2003.
54. Liao, Y.C.; Tokes, Z.; Lim, E.; Lackey, A.; Woo, C.H.; Button, J.D.; Clawson, G.A. Cloning of rat "prion-related protein" cDNA. **Laboratory Investigation**, 57:370-374, 1987.
55. Liesi, P.; Seppala, E.; Trenkner, E. Neuronal migration in cerebellar microcultures is inhibited by antibodies against a neurite outgrowth domain of laminin. **Journal of Neuroscience Research**, 33:170-176, 1992.
56. Locht, C.; Chesebro, B.; Race, R.; Keith, J.M. Molecular cloning and complete sequence of prion protein cDNA from mouse brain infected with the scrapie agent. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 83:6372-6376, 1986.
57. Lorenzini, C.A., Baldi, E., Bucherelli, C., Sacchetti, B., Tassoni, G. Role of dorsal hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response: a tetradoxin functional inactivation study. **Brain Research**. 730:32-39, 1996.
58. Luckenbill-Edds, L. Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth. **Brain Research Review**, 23:1-27, 1997.
59. Lugaresi, E.; Medori, R.; Montagna, P.; Baruzzi, A.; Cortelli, P.; Lugaresi, A.; Tinuper, P.; Zucconi, M.; Gambetti, P. Fatal

- familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. **New England Journal of Medicine**. 315: 997-1003, 1986.
60. Manuelidis, E.; Kim, J.; Angelo, J.; Manuelidis, L. Serial propagation of Creutzfeldt-Jakob disease in guinea-pigs. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 73: 223-227, 1975.
61. Manson, J.C.; Hope, J.; Clarke, A.R.; Johnston, A.; Black, C.; MacLeod, N. PrP gene dosage and long term potentiation. **Neurodegeneration**, 4:113-114, 1995.
62. Markowitsch, H.J. The functional neuroanatomy of episodic retrieval. **Trends in Neuroscience**. 20:557-558, 1997.
63. Martins, V.R.; Graner, E.; Garcia-Abreu, J.; Souza, S.J.; Mercadante, A.F.; Veiga, S.S.; Zanata, S.M.; Neto, V.M.; Brentani, R.R. Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. **Nature Medicine**, 3:1376-1382, 1997.
64. Martins, V.R. A receptor for infectious and cellular prion protein. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 32:853-859, 1999.
65. Martins, V.R.; Graner, E.; Brentani, R.R. Doenças neurodegenerativas associadas a prions. In: Forlenza, O.V. & Caramelli P., **Neuropsiquiatria Geriátrica**. São Paulo: Atheneu, p. 489-504, 2000.
66. Martins, V.R.; Mercadante, A.F.; Cabral, A.L.B.; Freitas, A.R.O. Insights into the physiological function of cellular prion protein. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 34:585-595, 2001.
67. Masters, C.L.; Gajdusek, D.L.; Gibbs, C.J.J.R. The familial occurrence of Creutzfeldt-Jakob disease and Alzheimer's disease. **Brain**, 104:535-558, 1981.

68. Mathews, J.D.; Glasse, R; Lindenbaum, S. Kuru and cannibalism. **Lancet**, 449-452, 1968.
69. Mercurio, A.M. Laminin receptors: achieving specificity through cooperation. **Trends Cell Biology**, 5:419-423, 1995.
70. Miura, T.; Hori-I, A.; Takeuchi, H. Metal-dependent alpha-helix formation promoted by the glycine-rich octapeptide region of prion protein. **FEBS Letters**, 396: 248-252, 1996.
71. Moore, R.C.; Lee, I.Y.; Silverman, G.L.; Harrison, P.M.; Strome, R.; Heinrich, C.; Karunaratne, A.; Pasternak, S.H.; Chishti, M.A.; Liang, Y.; Mastrangelo, P.; Wang, K.; Smit, A.F.; Katamine, S.; Carlson, G.A.; Cohen, F.E.; Prusiner, S.B.; Melton, D.W.; Tremblay, P.; Hood, L.E.; Westaway, D. Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. **Journal of Molecular Biology**, 292:797-817, 1999.
72. Moser, M.B., Moser, E.I. Distributed encoding and retrieval of spatial memory in the hippocampus. **Journal of Neuroscience** 18: 7535-42, 1998.
73. Nakagami, Y.; Abe, K.; Nishiyama, N.; Matsuki, N. Laminin degradation by plasmin regulates long-term potentiation. **Journal of Neuroscience**, 20:2003-2010, 2000.
74. Oesch, B.; Westaway, D.; Walchli, M.; McKinley, M.P.; Kent, S.B.H.; Aebersold, R.; Barry, R.A.; Tempst, P.; Teplow, D.B.; Hood, L.E.; Prusiner, S.B.; Weissmann, C. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. **Cell**, 40:735-746, 1985.
75. Oesch, B.; Teplow, D.B.; Stahl, N.; Serban, D.; Hood, L.E.; Prusiner, S.B. Identification of cellular prion proteins binding to the scrapie prion protein. **Biochemistry**, 29:5848-5855, 1990.
76. Pan, K.M.; Baldwin, M.; Nguyen, J. Gasset, M.; Serban, A.; Groth, D.; Mehlhorn, I.; Huang, Z.; Fletterick, R.J.; Cohen, F.E.;

- Prusiner, S. Conversion of alpha-helices into beta-sheet features in the formation of the scrapie prion proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 90: 10962-10966, 1993.
77. Paxinos, G.; Watson, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. San Diego: Academic Press, 1986.
78. Pereira, G.S.; Walz, R.; Bonan, C.D.; Battastini, A.M.; Izquierdo, I.; Martins, V.M., Brentani, R.R.; Sarkis, J.J. Changes in cortical and hippocampal ectonucleotidase activities in mice lacking cellular prion protein. **Neuroscience Letters**, 301:72-74, 2001.
79. Prusiner, S.B.; Bolton, D.C.; Groth, D.F.; Bowman, K.A.; Cochran, S.P.; McKinley, M.P. Further purification and characterization of scrapie prions. **Biochemistry**, 21: 6942-6950, 1982.
80. Prusiner, S.B.; McKinley, M.P.; Bowman, K. A.; Bolton, D.C.; Bendheim, P.E.; Groth, D.F.; Glenner, G.G. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. **Cell**, 35: 349-358, 1983.
81. Prusiner, S.B. *Scrapie* prions. **Annual Review of Microbiology**. 43:345-374, 1989.
82. Prusiner, S.B. Molecular biology and tran genetics of prion diseases. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology** 26:397-438, 1991.
83. Prusiner, S.B. Genetic and infectious prion disease, **Archives of Neurology**, 50: 1129-1153, 1993.
84. Prusiner, S.B. Prions. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 95:13363-13383, 1998.
85. Richardson, E.P.Jr.; Masters, C.L. The nosology of Creutzfeldt-Jacob disease and conditions related to the

- accumulation of PrP^{Sc} in the nervous system. **Brain Pathology**, 5: 33-41, 1995.
86. Rivas, R.J.; Hatten, M.E. Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. **Journal of Neuroscience**, 15:981-989, 1995.
87. Roesler, R.; Walz, R.; Quevedo, J.; de-Paris, F.; Zanata, S.M.; Graner, E.; Izquierdo, I.; Martins, V.M.; Brentani, R.R. Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP^C. **Molecular Brain Research**, 71:349-353, 1999.
88. Rosenzweig, M.R.; Bennett, E.L.; Colombo, P.J.; Lee, D.W.; Serrano, P.A. Short-term, intermediate-term and long-term memories. **Behavioral Brain Research** 57:193-198, 1993.
89. Rujescu, D.; Meisenzahl, E.M.; Giegling, I.; Kirner, A.; Leinsinger, G.; Hegerl, U.; Hahn, K.; Moller, H.J. Methionine homozygosity at codon 129 in the prion protein is associated with white matter reduction and enlargement of CSF compartments in healthy volunteers and schizophrenic patients. **Neuroimage**, 15:200-206, 2002.
90. Sakaguchi, S.; Katamine, S.; Nishida, N.; Moriuchi, R.; Shigematsu, K.; Sugimoto, T.; Nakatani, A.; Kataoka, Y.; Houtani, T.; Shirabe, S.; Okada, H.; Hasagawa, S.; Miyamoto, T.; Noda, T. Loss of cerebellar purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. **Nature**, 380: 528-531, 1996.
91. Salès, N.; Rodolfo, K.; Hässig, R.; Faucheux, B.; Giamberardino, L.D.; Moya, K.L. Cellular prion protein localization in rodent and primate brain. **European Journal of Neuroscience**, 10:2464-2471, 1998.
92. Salonen, V.; Peltonen, Roytta, M.; Virtanen, I. Laminin in traumatized peripheral nerve: basement membrane changes

- during degeneration and regeneratoin. **Journal of Neurocytology**, 16:713-720, 1997.
93. Samaia, H.B.; Mari,J.J.; Vallada, H.P.; Mourao, R.P.; Simpson, A.T.G.; Brentani, R.R. A prion-linked psychiatric disorder. **Nature** 390:241, 1997.
94. Shyng, S.L.; Heuser, J.E.; Harris, D.A. A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. **Journal of Cell Biology**, 125:1239-1250, 1994.
95. Shyng, S.L.; Moulder, K.L.; Lesko, A.; Harris, D.A. The N-terminal domain of a glycolipid-anchored prion protein is essential for its endocytosis via clathrin-coated pits. **Journal of Biological Chemistry**, 270:14793-14800, 1995.
96. Squire, L.R., Zola, S.M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 93(24):13515-13522, 1996.
97. Tateishi, J.; Ohta, M.; Koga, M. Sato, Y.; Kuroiwa, Y. Transmission of spongiform encephalopathy with kuru plaques from humans to small rodents. **Annals of Neurology**, 5: 581-584, 1979.
98. Thompson, R.F., Kim, J.J. Memory systems in the brain and localization of a memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 93(24): 13438-13444, 1996.
99. Timpl, R.; Brown, J. The laminins. **Matrix Biology**, 14:275-281,1994.
100. Tobler, I.; Gaus, S.E.; Deboer, T. Achermann, P.; Fischer, M.; Rulicke, T., Moser, M.; Oesch, B.; McBride, P.A.; Manson, J.C. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. **Nature**, 380: 639-642, 1996.

101. Tomaselli, K.T.; Reichardt, L.F. Peripheral motoneuron interactions with laminin and Schwann cell-derived neurite-promoting molecules: developmental regulation of laminin receptor function. **Journal of Neuroscience Research**, 21:275-285, 1988.
102. Tsai, M.T.; Su, Y.C.; Chen, Y.H.; Chen, C.H. Lack of evidence to support the association of the human prion gene with schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, 6:74-78, 2001.
103. Vianna, M.R.M.; Izquierdo, L.A.; Barros, D.M.; Ardenghi, P.; Pereira, P.; Rodríguez, C.; Moletta, B.; Medina, J.H.; Izquierdo, I. Differential role of hippocampal protein kinase A in short- and long-term memory. **Neurochemical Research**, 25:621-626, 2000.
104. Walz, R.; Amaral, O.B.; Rockenbach, I.C.; Roesler, R.; Izquierdo, I.; Cavalheiro, E.A.; Martins, V.R.; Brentani, R.R. Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. **Epilepsia**, 40:1679-1682, 1999.
105. Walz, R.; Castro, R.M.R.P.S.; Velasco, T.R.; Alexandre Jr, V.; Lopes, M.H.; Leite, J.P.; Santos, A.C.; Assirati Jr, J.A.; Wichert-Ana, L.; Terra-Bustamante, V.C.; Bianchin, M.M.; Maciag, P.C.; Ribeiro, K.B.; Guarnieri, R.; Araújo, D.; Cabalero, O.; Moura, R.; Salim, A.C.M.; Kindlmann, K.; Landemberger, M.C.; Marques Jr, W.; Fernandes, R.M.F.; Serafini, L.N.; Machado, H.R.; Carlotti Jr, C.G.; Brentani, R.R.; Sakamoto, A.C.; Martins, V.R. Surgical outcome in mesial temporal sclerosis correlates with prion protein gene variant. **Neurology**, 61:1204-1210, 2003.
106. Walz, R.; Castro, R.M.R.P.S.; Landemberger, M.C.; Velasco, T.R.; Terra-Bustamante, V.C.; Bastos, A.C.; Bianchin, M.M.; Wichert-Ana, L.; Araújo, D.; Alexandre Jr., V.; Assirati, J.A.; Santos, A.C.; Machado, H.R.; Carlotti Jr., C.G.; Brentani, R.R.;

- Martins, V.M.; Sakamoto, A.C. Malformations of cortical development are associated to a rare polymorphism of cellular prion protein. **Neurology**, submetido, 2004.
107. Wechselberger, C.; Wurm, S.; Pfarr, W.; Höglinger, O. The physiological functions of prion protein. **Experimental Cell Research**, 281:1-8, 2002.
108. Wells, G.A.H.; Wilesmith, J.W. The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. **Brain Pathology**, 5:91-103, 1995.
109. Westaway, D.; Goldman, P.A.; Mirenda, C.A.; McKinley, M.P.; Carlson, G.A.; Prusiner, S.B. Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. **Cell**, 51:651-662, 1987.
110. Whatley, S.A.; Powell, J.F.; Politopoulou, G.; Campbell, I.C.; Brammer, M.J.; Percy, N.S. Regulation of intracellular free calcium levels by the cellular prion protein. **Neuroreport**, 6:2333-2337, 1995.
111. Wong, B.S.; Pan, T.; Liu, T.; Li, R.; Gambetti, P.; Sy, M.S. Differential contribution of superoxide dismutase activity by prion protein in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 273:136-139, 2000.
112. Zanata, S.M.; Lopes, M.H.; Mercadante, A.F.; Hajj, G.N.M.; Chiarini, L.B.; Nomizo, R.; Freitas, A.R.O.; Cabral, A.L.B.; Lee, K.S.; Juliano, M.A.; Oliveira, E.; Jachieri, S.G.; Burlingame, A.; Huang, L.; Linden, R.; Brentani, R.R.; Martins, V.R. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. **The EMBO Journal**, 21:3307-3316, 2002.