



# La proteína priónica celular: Análisis de su función neuroprotectora y reguladora del ciclo celular

Patricia Carulla Martí

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSIDAD DE BARCELONA  
FACULTAD DE BIOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**LA PROTEÍNA PRIÓNICA CELULAR:  
ANÁLISIS DE SU FUNCIÓN NEUROPROTECTORA Y  
REGULADORA DEL CICLO CELULAR**

Memoria presentada por la licenciada en Biología

**PATRICIA CARULLA MARTÍ**

para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona

Esta tesis ha sido inscrita dentro del programa de doctorado en Biomedicina, bienio 2008-2009 de la Universidad de Barcelona. El trabajo experimental y la redacción de la presente memoria han sido realizados bajo la dirección del Dr. José Antonio del Río Fernández, Catedrático de Biología Celular del Departamento de Biología Celular de la Universidad de Barcelona y el Dr. Franc Llorens Torres, Investigador Post-doctoral de la Universitätsmedizin Göttingen.

Barcelona, 2013.

---

Director de la tesis

Dr. José Antonio del Río  
Fernández

---

La doctoranda

Patricia Carulla Martí

---

Codirector de la tesis

Dr. Franc Llorens Torres





*“ Los retos son los que hacen la vida interesante, superarlos es lo que hace que tengan sentido. ”*

Joshua J. Marine



A veces pienso que si no hubiese sido por Joaquim Molina, no estaría en estos momentos escribiendo esta Tesis. Quizás incluso habría estudiado otra licenciatura. A él le “culpo” de haberme transmitido la curiosidad y el interés por la biología y las ciencias de la vida hace ya más de 10 años. Encaminaste mi futuro profesional hacia este campo, y por eso mismo, te doy las gracias.

Más tarde, en la universidad, Gemma, Alicia, Llorens, Joaquín y Cristina, os convertisteis en compañeros de batalla. Junto a vosotros la ciencia ha sido más que divertida. Llenasteis de anécdotas los años de carrera y compartisteis conmigo las primeras peripecias en el laboratorio. Juntos, y sin darnos cuenta, hemos ido aprendiendo este “extraño” lenguaje que hablamos los que nos dedicamos a esto y que aún, a día de hoy, toma su protagonismo en nuestras conversaciones. Gracias por caminar a mi lado desde entonces. Sabéis de sobras, que por vuestro apoyo incondicional os merecéis un “MUCHAS GRACIAS” en mayúsculas.

Meses más tarde de acabar la carrera, me encontré llamando a la puerta del despacho de Toni del Río. Había decidido hacer el doctorado y Toni me brindó esa oportunidad. A pesar que no esperaba convertirme en “Miss Noviembre”, estos años en tu laboratorio han sido una muy buena experiencia personal y profesional. Gracias por tu confianza, por permitirme realizar la tesis y por enseñarme todo lo que he aprendido en estos cuatro años, que a mi parecer, no ha sido poco. Sin tu apoyo, mis pequeños grandes éxitos científicos no hubiesen sido posibles.

Realizar el doctorado en este grupo también ha significado pasar a formar parte de la familia JAAAAAR. ¡Y qué gran familia! A cada uno de vosotros os quiero dar las gracias por compartir conmigo cada momento de estos cuatro años. Desde nuestras reuniones en la sala de café, los *tuppers* en el césped y las “seradas” pijas nocturnas a las terapias contra el pesimismo, la frustración y los agobios que cada cierto tiempo aparecen después de inevitables temporadas de, digamos, baja productividad. Gracias también por celebrar juntos nuestros pequeños triunfos, desde un western blot que se resiste a salir a la publicación de un primer artículo o la superación de un reto propio, aunque sea tan simple como aprender a pinchar a un ratón. Vosotros, Sara, Oscar, Diego, Cristina, Vane, Ana, Silvia, Ina, Natalia y Giovanna, habéis hecho de mis cuatro años en el laboratorio una experiencia inolvidable. Mil gracias. Y mil gracias también los que acabáis de llegar, Miriam, Ágata y, especialmente a Andreu. Espero haber contribuido, ni que sea con un granito de arena, a lo que seguro será el comienzo de tu carrera investigadora.

Y Franc, qué decir de ti. Siempre recordaré que, aunque estabas en el laboratorio, te conocí tres o cuatro meses más tarde. A partir de entonces, sin embargo, fue un no parar. Gracias por tu entusiasmo, tu compromiso en todo momento, tus ganas de enseñar y tu empeño en transmitirme lo mejor de esta profesión. Conmigo has necesitado altas dosis de paciencia, pero creo que no nos podemos quejar del resultado que hemos conseguido, ¿no?. Ha sido todo un honor ser “tu pre-doc”.

Gracias también a todo el equipo de baloncesto. Qué mejor manera de desconectar que disfrutar de este deporte con gente como vosotras. En especial a ti, Aura, que además de

compartir conmigo la cancha de básquet has contribuido a darle un toque final a esta Tesis con tus expertos consejos de diseño.

Y finalmente quiero agradecer el apoyo incondicional de mi familia y, cómo no, de Sergi. Aunque hayáis vivido esta tesis, “de otra manera”, se puede decir que la habéis vivido casi igual de intensamente que yo. Gracias a mi padre por tener siempre una solución “técnica” a todos mis problemas (¿la palabra “pinganillo” te suena de algo?) y también por hacerme ver las cosas como son cuando a mi me parecen una montaña. Gracias a mi madre, por tu empeño en descifrar mis bocetos cuando te explico mi trabajo y por mantener arriba mis ánimos en todo momento, tratándome como una reina, sobre todo durante mi “reclutamiento” en el pisito. Me ha encantado volver a la rutina de antes por unos meses. Gracias a ti, Cristina, mi hermana, quizás la que te has enterado menos de todo esto, pero que aún así, siempre estás allí para transmitirme tu optimismo. Has conseguido más de una vez, y casi sin darte cuenta que me olvidase del trabajo con tus planes alocados con Pol y ahora Itzhak. Y tú, Sergi, que te has quedado sin vacaciones por mi culpa. Te las debo. Esto y todo tu apoyo y ánimos constantes durante estos años. Gracias por aguantar mis mil historias, consiguiendo que recupere la sonrisa cada vez que algo me la borra. No te preocupes, que la cosa no se acaba aquí, guarda fuerzas para el próximo reto.

Y unas líneas también para ti, abuela. Esto no es el Premio Nobel que tan convencida decías que un día conseguiría, pero quizás sea lo que más se le parezca. Gracias por creer siempre en mí.

En definitiva, porque todos y cada uno de vosotros habéis contribuido de una manera u otra a hacer realidad este proyecto personal y profesional,

*Muchas  
Gracias!*

# ÍNDICE





<b>ÍNDICE</b> .....	iii.
<b>ABREVIATURAS</b> .....	ix.
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xv.
<i>Prólogo</i> .....	1.
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	5.
<b>1. La proteína priónica celular</b> .....	5.
<b>1.1. De la aparición de las prionopatías al descubrimiento de PrP<sup>C</sup></b> .....	5.
<b>1.1.1. Reseña histórica</b> .....	5.
<b>1.1.2. Las prionopatías</b> .....	6.
Clasificación de las prionopatías .....	7.
<b>1.2. La proteína priónica celular (PrP<sup>C</sup>)</b> .....	11.
<b>1.2.1. El gen <i>Prnp</i></b> .....	11.
Estructura génica .....	11.
Genes homólogos de <i>Prnp</i> .....	12.
<b>1.2.2. La proteína PrP<sup>C</sup></b> .....	12.
Características estructurales de PrP <sup>C</sup> .....	12.
Biología celular de PrP <sup>C</sup> .....	13.
Expresión tisular y celular de PrP <sup>C</sup> .....	15.
Mutaciones y polimorfismos .....	16.
Evolución de PrP <sup>C</sup> .....	17.
<b>1.2.3. Una proteína, dos conformaciones: PrP<sup>C</sup> y PrP<sup>SC</sup></b> .....	17.
La hipótesis del prión .....	17.
Modelos de conversión de PrP <sup>C</sup> a PrP <sup>SC</sup> .....	17.
Diferencias bioquímicas y estructurales entre PrP <sup>C</sup> y PrP <sup>SC</sup> .....	19.
¿Cómo llega PrP <sup>SC</sup> a infectar el SNC? .....	19.
Pérdida de función vs ganancia de toxicidad .....	20.
<b>2. Funciones fisiológicas de PrP<sup>C</sup></b> .....	23.
<b>2.1. Estrategias para el estudio de las posibles funciones fisiológicas de PrP<sup>C</sup></b> .....	23.
<b>2.1.1. Modelos <i>in vivo</i>: el uso de animales transgénicos para el estudio funcional de PrP<sup>C</sup></b> .....	23.
Modelos <i>Prnp-knockout</i> .....	24.
Modelos de expresión de formas truncadas de PrP <sup>C</sup> .....	25.
Modelos de sobreexpresión de <i>Prnp</i> o de expresión de formas mutadas de la proteína .....	26.
<b>2.1.2. Aproximaciones experimentales <i>in vitro</i> al estudio de la función de PrP<sup>C</sup></b> .....	27.
<b>2.1.3. Posibles funciones descritas de PrP<sup>C</sup></b> .....	28.

<b>2.2. PrP<sup>C</sup> y la regulación del ciclo celular y la proliferación .....</b>	<b>29.</b>
<b>2.2.1. Introducción al ciclo celular</b>	<b>29.</b>
Fases del ciclo celular	29.
Mecanismos de regulación del ciclo celular	30.
<b>2.2.2. La proliferación celular</b>	<b>31.</b>
Los factores de crecimiento y su señalización intracelular	32.
<b>2.2.3. EGF y EGFR</b>	<b>32.</b>
Características estructurales de EGFR	32.
Mecanismo de activación de EGFR	33.
<b>2.2.4. PrP<sup>C</sup> en la regulación de los procesos de proliferación: antecedentes</b>	<b>35.</b>
<b>2.3. PrP<sup>C</sup> en la diferenciación y la neuritogénesis .....</b>	<b>35.</b>
<b>2.3.1. La diferenciación neuronal</b>	<b>35.</b>
<b>2.3.2. El citoesqueleto neuronal</b>	<b>36.</b>
El citoesqueleto de actina en la formación de filopodios	36.
La neuritogénesis: del filopodio a la neurita	37.
El papel de las RhoGTPasas en la formación de filopodios	38.
<b>2.3.3. PrP<sup>C</sup> en la neuritogénesis: antecedentes</b>	<b>40.</b>
<b>2.4. PrP<sup>C</sup>: Función sináptica y excitabilidad neuronal .....</b>	<b>41.</b>
<b>2.4.1. La sinapsis neuronal</b>	<b>41.</b>
<b>2.4.2. El glutamato y la sinapsis glutamatérgica</b>	<b>41.</b>
Los receptores de glutamato	42.
<b>2.4.3. Excitabilidad neuronal y excitotoxicidad</b>	<b>45.</b>
La excitabilidad intrínseca de las neuronas	45.
Mecanismos de excitotoxicidad celular	45.
<b>2.4.4. Función de PrP<sup>C</sup> en la sinapsis: antecedentes</b>	<b>46.</b>
Función neuroprotectora de PrP <sup>C</sup>	47.
<b>2.4.5. Alteraciones en la excitabilidad neuronal: la epilepsia</b>	<b>48.</b>
Introducción a la fisiopatología de la epilepsia	48.
El hipocampo como diana en los procesos epilépticos	49.
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>53.</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>57.</b>
<b>Capítulo I .....</b>	<b>59.</b>
PrP <sup>C</sup> regula la función del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y la morfología celular en células Neuro2a	

<b>Capítulo II</b> .....	89.
PrP <sup>C</sup> ejerce su papel neuroprotector ante episodios epilépticos y muerte celular inducidos por KA a través de la modulación de la activación de JNK3 por unión de GluR6/7-PSD-95	
<b>RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	109.
<b>1.1. PrP<sup>C</sup> controla la progresión del ciclo celular</b> .....	111.
La expresión de PrP <sup>C</sup> correlaciona con los niveles proliferativos en células N2a	112.
PrP <sup>C</sup> regula la activación de las vías de señalización ERK1/2 y AKT	113.
EGFR como mediador de la señalización de PrP <sup>C</sup> en la membrana celular	114.
<b>1.2. PrP<sup>C</sup> regula la dinámica del citoesqueleto de actina</b> .....	115.
La sobreexpresión de PrP <sup>C</sup> induce la formación de filopodios en células N2a	115.
EGFR modula la actividad de las Rho GTPasas vía AKT	117.
PrP <sup>C</sup> actúa como un módulo de señalización durante la neuritogénesis	118.
<b>1.3. PrP<sup>C</sup> es necesaria para la integridad funcional del SNC</b> .....	120.
PrP <sup>C</sup> : de la neuritogénesis al mantenimiento de la función sináptica	120.
El animal <i>Prnp</i> <sup>0/0</sup> muestra una susceptibilidad incrementada a la excitotoxicidad por KA	123.
PrP <sup>C</sup> modula la formación del complejo GluR6-PSD-95-MLK3 y la activación de JNK3 en respuesta a KA	125.
Los mutantes PrP <sup>ΔF</sup> y PrP <sup>ΔC4</sup> presentan un fenotipo epiléptico similar al descrito en el animal <i>Zurich I</i> tras la administración de KA	128.
<b>1.4. La influencia del fondo genético en el fenotipo del ratón</b> <b><i>Prnp</i>-knockout</b> .....	131.
<b>1.5. Tanto la pérdida de función de PrP<sup>C</sup> como la ganancia de toxicidad de PrP<sup>SC</sup> influyen en el desarrollo de la fisiopatología de las EETs</b> .....	134.
<b>1.6. PrP como diana de estudio para el tratamiento de las prionopatías y otras enfermedades neurodegenerativas</b> .....	135.
<b>1.7. Próximos pasos en el estudio de PrP<sup>C</sup></b> .....	136.
<b>CONCLUSIONES</b> .....	141.
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	145.
<b>ANEXO I: Informe del Factor de Impacto</b> .....	173.
<b>ANEXO II: Informe de participación</b> .....	177.



# ABREVIATURAS

---





<b>AD</b>	Del inglés, <i>Alzheimer Disease</i>
<b>AHP</b>	Del inglés, <i>Afterhyperpolarization currents</i>
<b>AKT</b>	proteína quinasa B o PKB
<b>AMP</b>	del inglés, <i>Adenosine monophosphate</i>
<b>AMPA</b>	del inglés, <i>alpha-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate</i>
<b>AMPA</b>	del inglés, <i>AMPA receptor</i>
<b>AP-1</b>	del inglés, <i>Activator protein-1</i>
<b>Arp2/3</b>	del inglés, <i>Actin-related Protein 2/3</i>
<b>BAX</b>	del inglés, <i>Bcl-2 associated X protein</i>
<b>CaMKII</b>	del inglés, <i>Calcium/calmodulin-dependent kinase II</i>
<b>cAMP</b>	del inglés, <i>cyclic AMP</i>
<b>CD</b>	del inglés, <i>Central domain</i>
<b>Cdc42</b>	del inglés <i>Cell-division cycle 42</i>
<b>CDK</b>	del inglés, <i>Cyclin-dependent kinase</i>
<b>CDKI</b>	del inglés, <i>CDK inhibitor</i>
<b>CJD</b>	del inglés, <i>Creutzfeldt-Jakob Disease</i>
<b>C-terminal</b>	extremo carboxi-terminal
<b>DG</b>	<i>del inglés, Dentate gyrus</i>
<b>DNA</b>	del inglés, <i>Deoxyribonucleic acid</i>
<b>DNQX</b>	antagonista AMPA/KA 6,7,-dinitroquinoxalina-2,3-diona
<b>Dpl</b>	proteína Doppel
<b>Edbg</b>	cepa de ratón <i>Edinburgh</i>
<b>EAA</b>	del inglés, <i>Excitatory Amino Acid</i>
<b>EET</b>	enfermedades espongiiformes transmisibles
<b>EGF</b>	del inglés, <i>Epidermal growth factor</i>
<b>EGFR</b>	del inglés, <i>Epidermal growth factor receptor</i>
<b>EPSP</b>	del inglés, <i>Excitatory postsynaptic potential</i>
<b>ERK1/2</b>	del inglés, <i>Extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
<b>ESC</b>	del inglés, <i>Embryonic stem cells</i>
<b>FACS</b>	del inglés, <i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
<b>FAK</b>	del inglés, <i>Focal adhesion kinase</i>
<b>FBS</b>	del inglés, <i>Fetal bovine serum</i>
<b>GAPs</b>	del inglés, <i>GTPase-activating proteins</i>
<b>GDIs</b>	del inglés, <i>Guanosine nucleotide dissociation inhibitors</i>
<b>GEFs</b>	del inglés, <i>Guanine nucleotide exchange factors</i>
<b>GluR</b>	del inglés, <i>Glutamate receptor</i>
<b>GABA</b>	del inglés, <i>Gamma-Aminobutyric acid</i>
<b>GPI</b>	del inglés, dominio <i>Glycosylphosphatidylinositol</i>
<b>Grb2</b>	del inglés, <i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
<b>GTP</b>	del inglés, <i>Guanosine triphosphate</i>
<b>HD</b>	del inglés, <i>Hydrophobic domain</i>
<b>iGluR</b>	del inglés, <i>ionotropic GluR</i>
<b>IPSP</b>	del inglés, <i>Inhibitory postsynaptic potential</i>

<b>JNK</b>	del inglés, <i>c-jun N-terminal kinases</i>
<b>JunAA</b>	mutante de c-jun (substitución de las serinas de fosforilación por alaninas)
<b>KA</b>	del inglés, <i>Kainic acid</i>
<b>KAR</b>	del inglés, <i>KA receptor</i>
<b>KO</b>	del inglés, <i>knockout</i>
<b>LIMK1</b>	del inglés, <i>LIM kinase 1</i>
<b>LTP</b>	del inglés, <i>Long term potentiation</i>
<b>MAPK</b>	del inglés, <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
<b>MFs</b>	microfilamentos de actina
<b>mGluR</b>	del inglés, <i>metabotropic GluR</i>
<b>MLK3</b>	del inglés, <i>Mixed-lineage protein kinase 3</i>
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>MTs</b>	microtúbulos
<b>N2a</b>	Neuro2a
<b>NFs</b>	neurofilamentos
<b>NMDA</b>	del inglés, <i>N-Methyl-D-aspartic acid</i>
<b>NMDAR</b>	del inglés, <i>NMDA receptor</i>
<b>Ngsk</b>	cepa de ratón <i>Nagasaki</i>
<b>N-terminal</b>	extremo amino-terminal
<b>N-WASP</b>	del inglés, <i>Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
<b>OR</b>	del inglés, dominio de <i>Octarepeats</i>
<b>ORF</b>	del inglés, <i>Open reading frame</i>
<b>PARP</b>	del inglés, <i>poly(ADP-ribose) polymerase</i>
<b>PIP2</b>	del inglés, <i>Phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate</i>
<b>PIP3</b>	del inglés, <i>Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate</i>
<b>PKA</b>	del inglés, <i>Protein kinase A</i>
<b>PrP<sup>C</sup></b>	proteína priónica celular
<b>PrP<sup>Sc</sup></b>	proteína priónica <i>scrapie</i>
<b>PI3K</b>	del inglés, <i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
<b>PKA</b>	del inglés, <i>Protein kinase A</i>
<b>PKB</b>	del inglés, <i>Protein kinase B</i> (también llamada AKT)
<b>PKC</b>	del inglés, <i>Protein kinase C</i>
<b>PLC</b>	del inglés <i>Phospholipase C</i>
<b>PPF</b>	del inglés, <i>Paired pulse facilitation</i>
<b>PSD</b>	del inglés, <i>Postsynaptic density</i>
<b>PTK</b>	del inglés, <i>Protein tyrosine kinase</i>
<b>Rac1</b>	del inglés <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
<b>Rb</b>	Retinoblastoma
<b>RE</b>	retículo endoplasmático
<b>RhoA</b>	del inglés <i>Ras-homologous member A</i>
<b>RNA</b>	del inglés, <i>Ribonucleic acid</i>
<b>ROCK</b>	del inglés, <i>Rho-associated protein kinase</i>

---

<b>ROS</b>	del inglés, <i>Reactive oxygen species</i>
<b>RTqPCR</b>	del inglés, <i>Real time quantitative polymerase chain reaction</i>
<b>SH2 / SH3</b>	del inglés, dominios <i>Src homology 2</i> y <i>Src homology 3</i>
<b>SNC</b>	sistema nervioso central
<b>SNP</b>	sistema nervioso periférico
<b>SOD</b>	superóxido dismutasa
<b>SOS</b>	del inglés, <i>Son of Sevenless</i>
<b>SP</b>	del inglés, <i>Signal peptide</i>
<b>ST11</b>	del inglés, <i>Stress-inducible protein 1</i>
<b>SVZ</b>	del inglés, <i>Subventricular zone</i>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	del inglés, <i>Transforming growth factor beta</i>
<b>Tg(wtPrP)</b>	cepa de ratón de sobreexpresión de PrP <sup>C</sup>
<b>TLE</b>	del inglés, <i>Temporal lobe epilepsy</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	del inglés, <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
<b>WT</b>	del inglés, <i>Wild type</i>
<b>ZrchI</b>	cepa de ratón <i>Zurich I</i>
<b>ZrchII</b>	cepa de ratón <i>Zurich II</i>



# LISTA DE FIGURAS

---





## INTRODUCCIÓN

### Figuras

Figura 1. Características histopatológicas de las EETs.....	7.
Figura 2. Evolución del número de casos confirmados de CJD en España .....	9.
Figura 3. Dominios estructurales de PrP <sup>C</sup> .....	13.
Figura 4. Biosíntesis y tráfico subcelular de PrP <sup>C</sup> .....	15.
Figura 5. La proteína priónica humana y sus mutantes .....	16.
Figura 6. Modelos de conversión de PrP <sup>C</sup> en PrP <sup>Sc</sup> .....	18.
Figura 7. Posibles funciones fisiológicas descritas para PrP <sup>C</sup> .....	29.
Figura 8. El ciclo celular .....	31.
Figura 9. Estructura del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) .....	33.
Figura 10. Señalización vía EGFR .....	34.
Figura 11. Fases de la neuritogénesis .....	38.
Figura 12. El citoesqueleto de actina en la formación de filopodios .....	39.
Figura 13. La sinapsis glutamatérgica .....	42.
Figura 14. Estructura de los receptores de glutamato .....	44.
Figura 15. Mecanismo de excitotoxicidad .....	46.
Figura 16. El hipocampo: estructura laminar y conexiones .....	50.

### Tablas

Tabla 1. Etiología de las enfermedades causadas por priones .....	7.
Tabla 2. Diferencias bioquímicas y estructurales entre PrP <sup>C</sup> y PrP <sup>Sc</sup> .....	19.
Tabla 3. Estrategias de generación de ratones <i>Pmp-knockout</i> .....	24.
Tabla 4. Fenotipo neurodegenerativo en ratones <i>Pmp-Knockout</i> que expresan formas truncadas de PrP <sup>C</sup> .....	26.
Tabla 5. Proteínas de interacción con PrP <sup>C</sup> .....	28.

## RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Figuras

Figura 17. Mecanismo propuesto de regulación de EGFR por PrP <sup>C</sup> en células N2a ...	120.
Figura 18. Mecanismo molecular propuesto para la función neuroprotectora de PrP <sup>C</sup> ante la excitotoxicidad por KA .....	127.
Figura 19. Modelo hipotético del efecto neurotóxico de PrP <sup>C</sup> y sus variantes .....	129.
Figura 20. Datos comparativos de la susceptibilidad a KA de ratones C57bl/6-129sv <i>wild type</i> , PrP-KO, PrP $\Delta$ C4 y PrP $\Delta$ F35 .....	130.
Figura 21. Respuesta epiléptica y muerte derivada de la administración de KA en diferentes cepas de ratones <i>Pmp-knockout</i> .....	134.

### Tablas

Tabla 6. Mecanismo de agregación proteica en enfermedades amiloides .....	136.
---------------------------------------------------------------------------	------



## **Prólogo**

Esta tesis doctoral se inicia en septiembre de 2009, en el laboratorio del Dr. José Antonio del Río del Departamento de Biología Celular de la Universidad de Barcelona. Forma parte de una de las líneas de investigación del grupo, centrada en conocer el posible rol fisiológico de la proteína priónica celular (PrP<sup>C</sup>) en el sistema nervioso central (SNC).

La conversión de esta proteína endógena a una forma de plegamiento anómalo denominada PrP<sup>SC</sup> constituye el evento clave en el desarrollo de las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs). Aunque el conocimiento de la bioquímica y transmisibilidad de PrP<sup>SC</sup> es esencial para entender este grupo de enfermedades, la hipótesis de la pérdida de función, establecida años atrás, ha impulsado la investigación hacia la forma no-patogénica de la proteína. A pesar de que PrP<sup>C</sup> parece no ser la causante de la neurotoxicidad observada en las EETs, la reducción de sus niveles de expresión durante el desarrollo de la enfermedad contribuye probablemente a su fisiopatología.

En el momento de iniciar este trabajo, ya se había descrito en nuestro laboratorio la participación de PrP<sup>C</sup> en la regulación de la transmisión sináptica y en la neurotoxicidad derivada de una sobreestimulación glutamatérgica en el SNC. La disponibilidad de ratones *knockout* para la proteína priónica había permitido reproducir un modelo de excitotoxicidad *in vivo* e *in vitro* mediante la administración de agentes epileptogénicos como el kainato. Sin embargo, se desconocía el rol específico de PrP<sup>C</sup> sobre los mecanismos moleculares implicados. Por otro lado, existían evidencias de la participación de PrP<sup>C</sup> en otras muchas funciones celulares básicas, entre las que destacan los procesos de proliferación y diferenciación celular durante el desarrollo y posteriormente en la edad adulta. Con el fin de complementar la información existente se había llevado a cabo en el laboratorio un estudio de perfil génico PrP-dependiente en células Neuro2a, lo que constituía una importante fuente de información disponible para profundizar en la participación de PrP<sup>C</sup> en los diferentes procesos celulares en esta línea de neuroblastoma.

La introducción de este trabajo resume la información existente sobre la proteína priónica celular, su participación en el desarrollo de las enfermedades causadas por priones y sus posibles funciones fisiológicas descritas hasta el momento, entrando en mayor detalle en su función neuroprotectora y reguladora del ciclo celular. El trabajo se estructura en torno a las dos publicaciones derivadas de estos cuatro años de investigación, cuyos resultados se discuten y contrastan posteriormente con el fin de aportar una visión más global, aunque detallada, sobre el estado del conocimiento a día de hoy.



# INTRODUCCIÓN





## 1

# La proteína priónica celular

## 1.1. DE LA APARICIÓN DE LAS PRIONOPATÍAS AL DESCUBRIMIENTO DE PrP<sup>C</sup>

### 1.1.1. Reseña histórica

El descubrimiento de las enfermedades causadas por priones así como la identificación de la naturaleza química de este agente infeccioso, suponen un episodio remarcable en la historia de la medicina. Los grandes avances en este campo de investigación han sido reconocidos por dos Premios Nobel, uno en 1976 a D. Carleton Gajdusek, por sus estudios sobre la enfermedad de kuru (Gajdusek et al., 1966), y el otro en 1997 a Stanley B. Prusiner, por el descubrimiento del “prion” como agente proteico infeccioso (Prusiner, 1982).

Debemos remontarnos a mediados del s. XVIII para encontrar los primeros indicios sobre las enfermedades espongiformes transmisibles (EETs), un conjunto de enfermedades neurodegenerativas que afectan tanto a animales como a humanos (Collins et al., 2004, Kovacs and Budka, 2008, Imran and Mahmood, 2011b, a). Ganaderos europeos observaron como una enfermedad letal, rápidamente denominada “tembladera” (en inglés, scrapie) por su sintomatología, se extendía entre cabras y ovejas (Detwiler, 1992). Pero no fue hasta principios del s. XX que se describieron los primeros casos de EET en humanos. Sobre 1930, se produjo una alta incidencia de una enfermedad rara llamada Creutzfeldt-Jakob (CJD), caracterizada por una degeneración progresiva del sistema nervioso central (SNC) que llevaba a la muerte del individuo afectado (Sikorska et al., 2012).

Tuvieron que pasar varias décadas para que estos hechos cobrasen significancia y se encontrase una relación entre las ambas enfermedades. En 1959, Igor Klatzo relacionó la neuropatología de CJD con el kuru (Klatzo et al., 1959), una enfermedad de Nueva Guinea (Hadlow, 1959, 2008), que afectaba comunidades enteras, especialmente mujeres y niños.

Enseguida se identificó la pauta de aparición del Kuru al determinar núcleos de individuos afectados que practicaban una forma de canibalismo consistente en la ingestión de las vísceras y cerebros de las personas fallecidas, como parte de un ritual funerario.

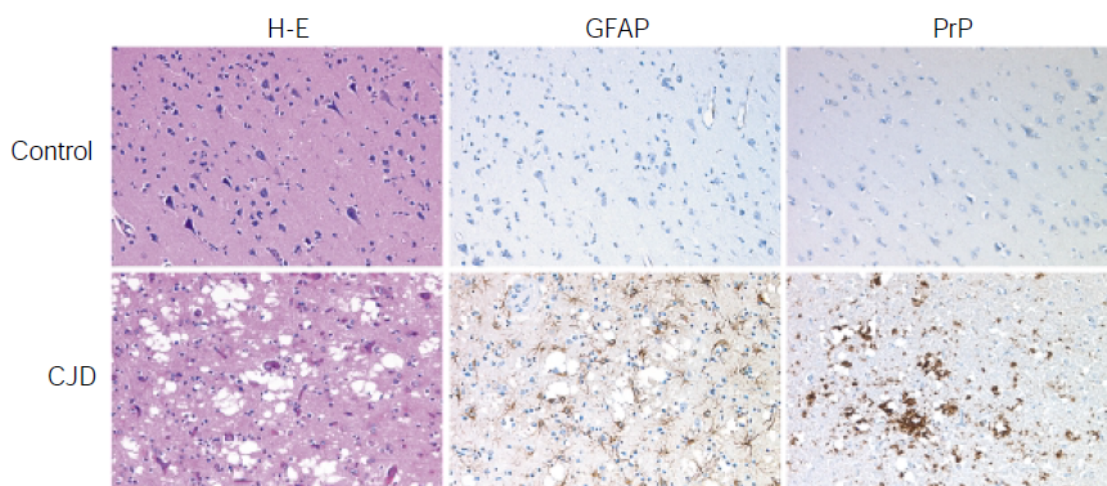
Experimentos realizados con chimpancés en los que se inoculaban extractos de cerebros de ganado afectado de *scrapie* (1959), así como de pacientes enfermos de kuru (1966) (Gajdusek, 1977) y CJD (1968) (Gibbs et al., 1968), sacaron a la luz la transmisibilidad de estas enfermedades, que se creían ser consecuencia del llamado “virus lento”. Este término había sido introducido por Bjorn Sigurdsson en 1954 y describía que un agente vírico no convencional era la causa común de estas enfermedades infecciosas (Sigurdsson, 1954).

Curiosamente, este agente infeccioso era invisible a los microscopios electrónicos, no se transmitía a través de la leche materna y causaba una degeneración del SNC sin provocar respuesta inmunológica. Su período de incubación podía ser de hasta 20 años y la probabilidad de contraer la enfermedad dependía del volumen del inóculo.

El descubrimiento del agente patógeno fue atribuido a Stanley B. Prusiner en 1982 (Prusiner, 1982). Este neurólogo y bioquímico estadounidense desarrolló protocolos efectivos de purificación que permitieron el análisis de fracciones ricas en partículas infecciosas, a partir de muestras de cerebros enfermos (Bolton et al., 1982, Meyer et al., 1986). Gracias a ello, se pudieron identificar partículas de naturaleza puramente proteica, sin ácido nucleico, a las que denominó “prión” (Prusiner, 1982), diferenciándolo de otros agentes patógenos como virus, viroides, bacterias, hongos o parásitos. Los priones resultaron ser resistentes a algunos procesos de degradación proteica, nucleasas, radiaciones ionizantes o ultravioleta (Alper, 1972) o a la modificación con hidroxilamina, pero perdían su capacidad infectiva si se trataban con agentes desnaturizantes de proteínas como es el fenol o el SDS. Con todo ello se establecía la hipótesis de que la transmisibilidad de las EETs era debida a una única proteína (hipótesis del prión) (Prusiner, 1991, Aguzzi et al., 2008a, Tuite and Serio, 2010) que se ha denominado PrP<sup>SC</sup> por ser causante de *scrapie* o PrP<sup>Res</sup> por su resistencia total o parcial a la degradación por proteasas. Esta proteína parecía ser una forma anómala de la proteína priónica celular endógena o PrP<sup>C</sup> (Prusiner, 1998, Westergard et al., 2007, Linden et al., 2008), motivo por el cual no despertaba la respuesta inmunológica del organismo.

### 1.1.2. Las prionopatías

Las EETs o prionopatías son un grupo de enfermedades neurodegenerativas raras e invariablemente fatales (Collins et al., 2004, Kovacs and Budka, 2008). Cursan con trastornos neurológicos progresivos acompañados de déficits cognitivos, sensoriales y motores, y no generan una respuesta inmunitaria ni inflamatoria relevante (Kovacs and Budka, 2009). A nivel neuropatológico, los cerebros de pacientes afectados por alguna EET no suelen mostrar grandes anormalidades a primera vista. Sin embargo, un examen microscópico detallado revela cambios histopatológicos característicos: astrogliosis y microgliosis, amiloidosis y una vacuolización neuronal que da una apariencia esponjiforme al tejido (ver Figura 1). Este rasgo es característico de estas enfermedades pero no es un signo neuropatológico obligado en todas ellas (Aguzzi et al., 2001, Budka, 2003).



**Figura 1. Características histopatológicas de las EETs.** Análisis histológico e inmunohistoquímico de muestras de córtex frontal de pacientes sanos (fila superior) o pacientes de CJD (fila inferior). Las secciones procesadas para hematoxilina-eosina (H-E, izquierda), con anticuerpos contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, centro) y con anticuerpos contra la proteína priónica (PrP, derecha). El marcaje H-E muestra muerte neuronal y una marcada espongiosis; el marcaje con GFAP detecta una fuerte proliferación de astrocitos reactivos (gliosis) y el marcaje de PrP, un depósito de la proteína a nivel perivacuolar en las muestras de CJD. *Adaptado de (Aguzzi et al., 2001).*

## Clasificación de las prionopatías

Las EETs engloban un gran número de enfermedades neurodegenerativas (ver (Collins et al., 2004, Aguzzi et al., 2008a, Colby and Prusiner, 2011) para revisión), que se pueden agrupar en función del huésped y de su etiología (ver Tabla 1 para clasificación). Estas patologías pueden tener origen infeccioso, genético o esporádico y pueden afectar individuos de distintos grupos de edades, con largos períodos de incubación antes de la aparición de los primeros síntomas clínicos. Su prevalencia es relativamente baja y son todavía incurables. Las principales se describen a continuación:

Prionopatías en animales			
Enfermedad	Huésped	Etiología	Año de descripción
Scrapie	Ganado caprino /ovino	Infección con priones de origen desconocido	1732
TME	Visones	Infección con priones de origen ovino/bovino	1947
CWD	Cérvidos	Infección con priones de origen desconocido	1967
BSE	Ganado vacuno	Infección con priones de origen desconocido	1986
EUE	Nyala / kudu	Infección con priones de origen BSE	1986
FSE	Felinos	Infección con priones de origen BSE	1990
NHP	Lémures	Infección con priones de origen BSE	1996

Prionopatías humanas			
Enfermedad	Huésped	Etiología	Año de descripción
Kuru	Humano	Canibalismo	1957
sCJD	Humano	Conversión espontánea PrP <sup>C</sup> -PrP <sup>Sc</sup> / mutación somática	1920
fCJD	Humano	Mutaciones en el gen <i>Prnp</i>	1924
GSS	Humano	Mutaciones en el gen <i>Prnp</i>	1936
iCJD	Humano	Infección iatrogénica con priones de origen humano	1974
FFI	Humano	Haplotipo <i>Prnp</i> - 178N-129M	1986
nvCJD	Humano	Infección con priones de origen BSE	1996
sFI	Humano	Conversión espontánea PrP <sup>C</sup> -PrP <sup>Sc</sup> / mutación somática	1999
VPSPr	Humano	Conversión espontánea PrP <sup>C</sup> -PrP <sup>Sc</sup> / mutación somática	2008

**Tabla 1. Etiología de las enfermedades causadas por priones.** Del inglés. TME: *Transmissible mink encephalopathy*; CWD: *Chronic wasting disease*; BSE: *Bovine spongiform encephalopathy*; EUE: *Exotic ungulate encephalopathy*; FSE: *Feline spongiform encephalopathy*; NHP: *Transmissible spongiform encephalopathy in non-human primates*; sCJD: *sporadic Creutzfeldt-Jakob disease*; fCJD: *familial CJD*; GSS: *Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome*; iCJD: *iatrogenic CJD*; FFI: *Fatal familial insomnia*; nvCJD: *new variant CJD*; sFI: *sporadic fatal insomnia*; VPSP: *variably protease-sensitive prionopathy*. Adaptado de (Imran and Mahmood, 2011b).

## Enfermedades priónicas en humanos

- Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD):

A pesar de ser la prionopatía más común en humanos, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob sigue siendo rara, afectando anualmente en su conjunto a 1-2 individuos por cada millón de la población mundial, independientemente del sexo (ver Figura 2 para datos epidemiológicos). Su origen puede ser: i) esporádico (sCJD), si aparece sin causa conocida aparente; ii) familiar o genético (fCJD), si es el resultado de ciertas mutaciones en el gen codificante para PrP<sup>C</sup> (Figura 5) (Mastrianni, 2010, Cortez and Sim, 2013); iii) iatrogénico (iCJD), si deriva de la transmisión accidental del agente patógeno durante la práctica médica u otros procedimientos quirúrgicos; y iv) nueva variante (nvCJD), si es consecuencia de la transmisión de la encefalopatía espongiforme bovina (BSE) del ganado vacuno a los humanos a través de la ingesta de alimentos contaminados.

Las formas de origen esporádico, familiar o iatrogénico suelen presentarse en personas de entre 55 y 75 años, y cursan con un rápido deterioro cognitivo, con diferentes grados de disfunción cerebelar, mioclonía y alteraciones en la capacidad visual y el habla, llevando a la muerte del afectado varias semanas después de la aparición del primer signo clínico (ver (Gambetti et al., 2003, Sikorska et al., 2012) para revisión). A diferencia, la nueva variante de CJD afecta a poblaciones más jóvenes (25-35 años), se concentra geográficamente en el Reino Unido y su desarrollo es más prolongado. La sintomatología clínica difiere de la de la CJD clásica, caracterizándose en un inicio por alteraciones del comportamiento, pérdida de memoria, cambios de personalidad y depresión. Posteriormente, el individuo desarrolla síntomas neurológicos en forma de alteraciones sensoriales, ataxia, mioclonía y demencia progresiva, con el consecuente fallecimiento del afectado aproximadamente 15 meses después de la aparición de los primeros signos clínicos.

- Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS):

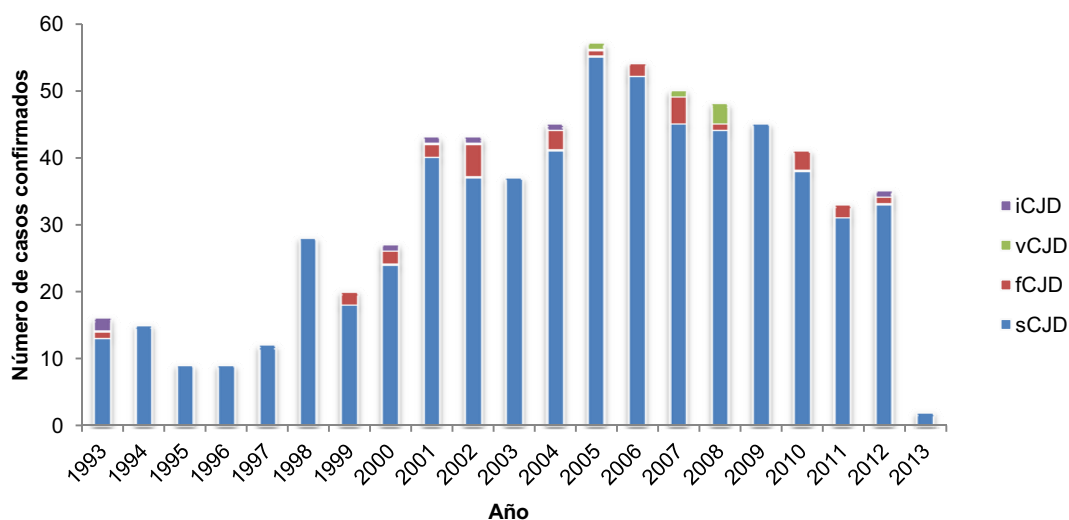
Es una forma de EET de origen hereditario, producida por mutaciones puntuales en la secuencia codificante para la PrP<sup>C</sup> (ver Figura 5), entre las que destaca la sustitución de una prolina por una leucina en el codón 102 (Mastrianni, 2010). Se caracteriza por un inicio temprano, entre los 30 y los 60 años de edad, de progresión lenta (3-10 años) y que afecta a 1 de cada 100 millones de individuos al año. Su sintomatología clínica se caracteriza por pérdida de memoria, ataxia cerebelar, demencia, disartria y dismetría ocular entre otros (ver (Liberki, 2012) para revisión).

- Insomnio familiar fatal (FFI):

Inicialmente conocida como demencia talámica, el FFI es una enfermedad hereditaria causada por una mutación (D178N) en el gen *Prnp*, ligada al polimorfismo M129V (Mastrianni, 2010, Cortez and Sim, 2013). Casi 100 casos de FFI han sido reportados hasta el día de hoy. La enfermedad aparece entre los 20 y los 72 años, independientemente del sexo y con una esperanza de vida de entre 8 y 72 meses. Se caracteriza por insomnio o interrupción del sueño acompañado de mioclonía, ataxia, disartria y disfagia, entre otros. También se ha descrito una forma esporádica de la enfermedad, llamada insomnio fatal esporádico (sFI) no ligada a mutaciones en el gen *Prnp* (ver (Montagna et al., 2003) para revisión).

- Kuru:

Es una enfermedad causada por priones, limitada geográficamente a una comunidad de Papúa Nueva Guinea como consecuencia de rituales de canibalismo. El kuru causó a mediados de los años cincuenta la muerte del 1-2% de la población, mayoritariamente mujeres y niños, por mayor exposición al material de riesgo. El período de incubación de esta enfermedad alcanza los 50 años y se presenta en forma de ataxia cerebelar y temblores (ver (Klatzo et al., 1959) para revisión).



**Figura 2. Evolución del número de casos confirmados de CJD en España.** Fuente: Informe de vigilancia epidemiológica de las encefalopatías espongiformes transmisibles humanas. Datos actualizados a 1 de julio de 2013. Centro Nacional de Epidemiología – Instituto de Salud Carlos III.

### Enfermedades priónicas en animales

Las enfermedades causadas por priones afectan de forma natural a muchos mamíferos, incluyendo ganado ovino, caprino y bovino, así como visones, ciervos y felinos, entre otros (ver Tabla 1) (Imran and Mahmood, 2011a). La falta de casos reportados de mamíferos lepóridos ha hecho creer, durante mucho tiempo, que éstos eran inmunes a la infección por priones. Sin

embargo, datos experimentales recientes demuestran que, a pesar de tener una inusual resistencia a esta enfermedad, también pueden contraer la infección (Chianini et al., 2012).

De todas las prionopatías animales descritas cabe destacar el scrapie y la BSE, ya que han supuesto la muerte y sacrificio de enormes cantidades de ganado ovino y bovino comportando, no solo grandes pérdidas económicas sino también una importante alarma social y un riesgo para la salud pública. La enfermedad debilitante crónica (CWD), que afecta a mamíferos de la familia de los cérvidos, también ha ido ganando importancia en las últimas décadas, con un incremento de la prevalencia que amenaza en convertirse en una pandemia.

- Encefalopatía espongiforme de cabras y ovejas (tembladera o scrapie):

El scrapie es una enfermedad neurodegenerativa causada por priones que afecta el sistema nervioso de cabras y ovejas. Fue descubierto durante el s. XVIII en Inglaterra (1732) y Alemania (1759), y desde entonces se ha detectado en todos los países a excepción de Australia y Nueva Zelanda. La sintomatología del scrapie tiene un desarrollo muy lento. Se inicia con cambios de comportamiento, seguido del desarrollo progresivo de signos neurológicos más evidentes, principalmente ataxia, prurito e hiperestesia (alteraciones de la sensibilidad) (ver (Detwiler, 1992) para revisión). La esperanza de vida tras la aparición de los síntomas es de entre 1 y 6 meses, y no existe ningún tratamiento ni vacuna.

Actualmente tampoco hay métodos efectivos para inactivar los priones. Se cree que estos agentes persisten largo tiempo en partículas del suelo constituyendo un reservorio permanente de scrapie infeccioso. No hay evidencias de que el scrapie sea infeccioso en humanos, sin embargo su erradicación es de interés público a raíz de la epidemia de la BSE, de su relación con la CJD y por sus posibles consecuencias a nivel económico.

- Encefalopatía espongiforme bovina (BSE):

La BSE, coloquialmente conocida como “enfermedad de las vacas locas”, fue diagnosticada por primera vez en los años 70-80 en el Reino Unido. Se caracteriza por causar una degeneración del SNC de los bovinos, incurable, que cursa con la aparición de síntomas en los animales adultos, y que progresivamente concluye con la muerte del animal (Smith and Bradley, 2003).

A finales de los años 70 y 80, se produjo una importante epidemia de BSE en Gran Bretaña, que afectó, años más tarde a Europa y otros países como Estados Unidos. Se cree que la BSE se pudo originar por la transmisión del agente infeccioso desde el ganado ovino al vacuno a través de la cadena alimentaria por suplementos nutricionales elaborados con harinas de carne y huesos contaminados con el prión. El proceso de fabricación había sido modificado a comienzos del 1981, permitiendo un aumento de la supervivencia del agente infeccioso y su transmisión. Los casos de BSE fueron incrementando, hasta alcanzar su pico máximo en 1992 debido al largo período de incubación de la enfermedad (4-5 años). Más de 300.000 reses fueron sacrificadas a la vez que se impulsaron nuevas medidas preventivas para paliar el importante riesgo que suponía para la salud pública. El problema se resolvió eficazmente a

pesar de varios casos reportados en humanos, relacionados con la epidemia de BSE (Woolhouse and Anderson, 1997).

- Enfermedad debilitante crónica (CWD)

La CWD es una enfermedad neurodegenerativa causada por priones que afecta a los cérvidos, entre ellos ciervos y alces. Hasta hace poco era una enfermedad poco conocida que aparentemente se limitaba a pequeños núcleos geográficos de Estados Unidos. Sin embargo, a día de hoy, los casos se extienden por todo el territorio estadounidense y también Canadá, no sólo en animales silvestres si no también en cautiverio. Al parecer, la CWD se propaga de forma horizontal entre animales, por contacto directo y/o contaminación del ambiente, lo que dificulta el control y prevención de la enfermedad. Por lo general esta patología se manifiesta en una pérdida progresiva del peso del animal y cambios en el comportamiento, acompañados muchas veces de ataxia y temblores, resultando en la muerte del animal pocos meses después del inicio de la sintomatología.

## 1.2. LA PROTEÍNA PRIÓNICA CELULAR (PrP<sup>C</sup>)

### 1.2.1. El gen *Prnp*

#### Estructura génica

La secuenciación de una fracción proteica de 27-30kDa (PrP 27-30) presente en muestras de cerebro infectado por scrapie permitió la identificación de un gen: *Prnp*. Sorprendentemente, el gen codificante para PrP<sup>SC</sup> resultaba hallarse en el lugar que los partidarios de la teoría del prión menos esperaban: en el genoma del hospedador (Chesebro et al., 1985, Oesch et al., 1985). Tanto PrP<sup>SC</sup> como PrP<sup>C</sup> compartían la misma secuencia de aminoácidos y eran codificadas por un mismo gen (Basler et al., 1986).

El gen *Prnp* codifica para la proteína priónica celular, PrP<sup>C</sup>, activa en el cerebro y otros órganos. Es un gen de copia única, localizado en el brazo corto (p) del cromosoma 20 en humanos y en el cromosoma 2 en ratones. Los genes *Prnp* constan de 2 exones (en hámster, humanos y marsupiales) o 3 (en rata, ratón, ovinos y bovinos) en función de la especie. Se han descrito varios polimorfismos, tanto en el *Prnp* humano como de ratón, siendo el del codón 129 crítico para la susceptibilidad humana a las prionopatías (Owen et al., 1990, Gambetti et al., 2003).

#### Genes homólogos de *Prnp*

El primer homólogo descrito de *Prnp* fue *Prnd* (Watts and Westaway, 2007, Westaway et al., 2011). Este gen presenta dos exones y codifica para la proteína Doppel (Dpl), una proteína GPI-de membrana con cierta similitud con PrP<sup>C</sup> a nivel de estructura y topología proteica. Se expresa en varios tejidos durante el desarrollo fetal, especialmente en los testículos. Las mutaciones en este gen o la sobreexpresión de la proteína pueden causar desórdenes neurológicos (Moore et al., 1999).

Por otro lado, el gen *Sprn* también muestra cierta similitud a *Prnp*. Da lugar a una proteína llamada Shadoo, que se expresa únicamente en el cerebro, lo que sugiere su participación en los fenómenos asociados a priones en el SNC. Su patrón de expresión coincide con el de PrP<sup>C</sup>, por lo que se cree que puede tener un papel compensatorio ante una posible falta de *Prnp* (Daude and Westaway, 2011, Young et al., 2011).

Mientras *Prnd* se localiza en el cromosoma junto a *Prnp*, en una región de no más de 55kDa, *Sprn*, se encuentra en el cromosoma 7 en el ratón y en el 10 en humanos. Todos ellos, independientemente del número de exones, presentan un marco abierto completo de lectura (ORF) contenido en un único exón.

## 1.2.2. La proteína PrP<sup>C</sup>

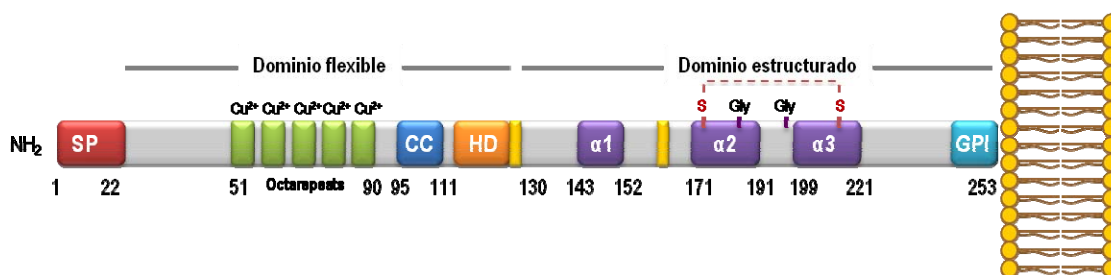
### Características estructurales PrP<sup>C</sup>

La proteína priónica celular o PrP<sup>C</sup> es una glicoproteína de 253 aminoácidos (en el humano) altamente conservada y anclada a la membrana celular por un dominio glucosil fosfatidil inositol (GPI) en su extremo carboxi-terminal. Posee un peso molecular aparente de 33-36kDa en geles de SDS poliacrilamida. Su estructura tridimensional se ha determinado mediante resonancia magnética nuclear (Zahn et al., 2000) e incluye las siguientes regiones o dominios estructurales (Figura 3), muy similares entre especies (revisado en (Watts and Westaway, 2007, Linden et al., 2008, Mehrpour and Codogno, 2010, Biasini et al., 2012)) (los residuos corresponden a una secuencia de ratón):

- Dominio amino-terminal (N-terminal): Este dominio largo y flexible, sin estructura secundaria, corresponde a los residuos 23 a 124 una vez eliminado el péptido señal (SP, residuos 1-22) durante la biosíntesis de PrP<sup>C</sup> en el retículo endoplasmático. A SP le sigue una región polibásica (CC, residuos 23-27) importante para el correcto tráfico intracelular (Sunyach et al., 2003) y una región compuesta por octapéptidos de secuencia PHGGGWGQ (OR u *octarepeats*; residuos 51-90), capaces de unir cobre (Brown et al., 1997) y otros iones bivalentes.
- Dominio central (CD): Este dominio incluye una región de residuos de carga positiva (CC, residuos 95-111) seguida de una región hidrofóbica altamente conservada (HD, residuos 112-130) que sirve como anclaje transmembrana en algunas situaciones.
- Dominio carboxi-terminal (C-terminal): Es un dominio más estructurado, globular, que incluye dos láminas beta (residuos 127-129 y 166-168) y tres hélices alfa (residuos 143-152, 171-191 y 199-221), seguidas de un péptido señal (residuos 231-254) que se elimina durante la biosíntesis para la incorporación del dominio GPI responsable de anclar la proteína a la membrana plasmática. También presenta dos puentes disulfuro entre dos residuos cisteína de las hélices- $\alpha$ .

A diferencia de PrP<sup>C</sup>, Doppel no contiene la región de los *octarepeats*. Presenta una gran similitud al dominio C-terminal de PrP<sup>C</sup> aunque a nivel de secuencia aminoacídica únicamente comparten el 25% de homología. En comparación, Shadoo es una proteína de menor número

de residuos (98 en ratón) pero con secuencias N- y C-terminal muy parecidas a las de PrP<sup>C</sup> y Doppel.



**Figura 3. Dominios estructurales de PrP<sup>C</sup>.** Representado en rojo encontramos el péptido señal (SP) del extremo N-terminal, ausente en la forma madura de la proteína. Los *octarepeats* (OR) se indican en verde. A ellos se unen iones de cobre (Cu<sup>+</sup>). En azul, el clúster de carga positiva (CC). En naranja, la región hidrofóbica (HD). En amarillo las láminas-β y en lila las hélices-α. Los dos potenciales puntos de glucosilación se indican como Gly y los puentes disulfuro como S. El dominio GPI de anclaje a membrana se representa en cian.

## Biología celular de PrP<sup>C</sup>

### Biosíntesis de PrP<sup>C</sup>

La biosíntesis de PrP<sup>C</sup> comparte similitudes con otras proteínas secretables o de membrana. Se sintetiza en el retículo endoplasmático (RE), desde donde es dirigida al aparato de Golgi y posteriormente a la superficie celular (Figura 4). En la membrana celular, PrP<sup>C</sup> se ubica concretamente en los *rafts* lipídicos (también llamados *rafts* lipídicos) (Hugel et al., 2004, Taylor and Hooper, 2006, Lewis and Hooper, 2011), que son compartimentos dinámicos de la membrana celular, heterogéneos y enriquecidos en lípidos, que sirven como focos de transducción de señales intracelulares (Simons and Toomre, 2000).

Durante su biosíntesis, PrP<sup>C</sup> sufre varias modificaciones post-traduccionales que incluyen: i) la eliminación del péptido señal de su región N-terminal, responsable de dirigir la cadena polipeptídica al RE, ii) la adición de dos cadenas de oligosacáridos en residuos de asparagina (Asn181 y 197 en humanos; Asn180 y 196 en ratón) del dominio C-terminal (Lawson et al., 2005), iii) la formación de un puente disulfuro entre dos residuos de cisteína y iv) la adición de un grupo GPI una vez eliminado el péptido señal del extremo C-terminal. Como muchas proteínas de la superficie celular, PrP<sup>C</sup> puede sufrir, una vez en la membrana, diferentes tipos de roturas endoproteolíticas (ver (Harris, 2003)).

### Glucosilación

La existencia de una alta conservación en los puntos de glucosilación de PrP<sup>C</sup> entre mamíferos ha impulsado el estudio de las modificaciones postraduccionales de la proteína en busca de una significancia funcional. El tratamiento de PrP<sup>C</sup> con N-Glucosidasa F (PNGasa F) ha permitido comprobar que la glucosilación de PrP<sup>C</sup> es variable, resultando en formas no glucosiladas, mono-glucosiladas y di-glucosiladas, dependiendo del número de sitios de glucosilación ocupados por cadenas de oligosacáridos (Haraguchi et al., 1989). Existe una gran

variedad de N-glicanos que pueden encontrarse unidos a PrP<sup>C</sup>, distribuidos en diferentes áreas del cerebro.

La importancia de la glucosilación para el mantenimiento de la estructura de PrP<sup>C</sup> se ha demostrado *in vitro* mediante la expresión exógena de una PrP<sup>C</sup> mutada en las secuencias de glucosilación (AsnXaaThr), que resulta en una forma con propiedades cercanas a PrP<sup>SC</sup>, incluyendo insolubilidad y resistencia parcial a proteasas (Lehmann and Harris, 1997). Las diferencias en glucosilación entre PrP<sup>C</sup> y PrP<sup>SC</sup> incluyen también el dominio GPI, con seis glicofomas posibles reportadas para PrP<sup>SC</sup>. Se cree pues que las glucosilaciones de PrP tienen un papel clave en modular la estabilidad de PrP<sup>C</sup> y también su tráfico y distribución celular. Aunque la glucosilación no es un requisito para la propagación de PrP<sup>SC</sup>, sus alteraciones pueden ser determinantes en la susceptibilidad a la infección por priones, siendo características de cada cepa y presentándose como posibles marcadores de la enfermedad (Lawson et al., 2005).

### Topología

Aunque la mayoría de moléculas de PrP<sup>C</sup> están ancladas a la membrana plasmática, existen otras topologías posibles en función del tipo y el entorno celular. En células que han sido transfectadas con PrP<sup>C</sup> *in vitro*, se han descrito algunas moléculas que adoptan una orientación transmembrana llamada <sup>Ntm</sup>PrP y <sup>Ctm</sup>PrP en función de la orientación de sus secuencias respecto el lumen del RE (Hegde et al., 1998b, Harris, 2003).

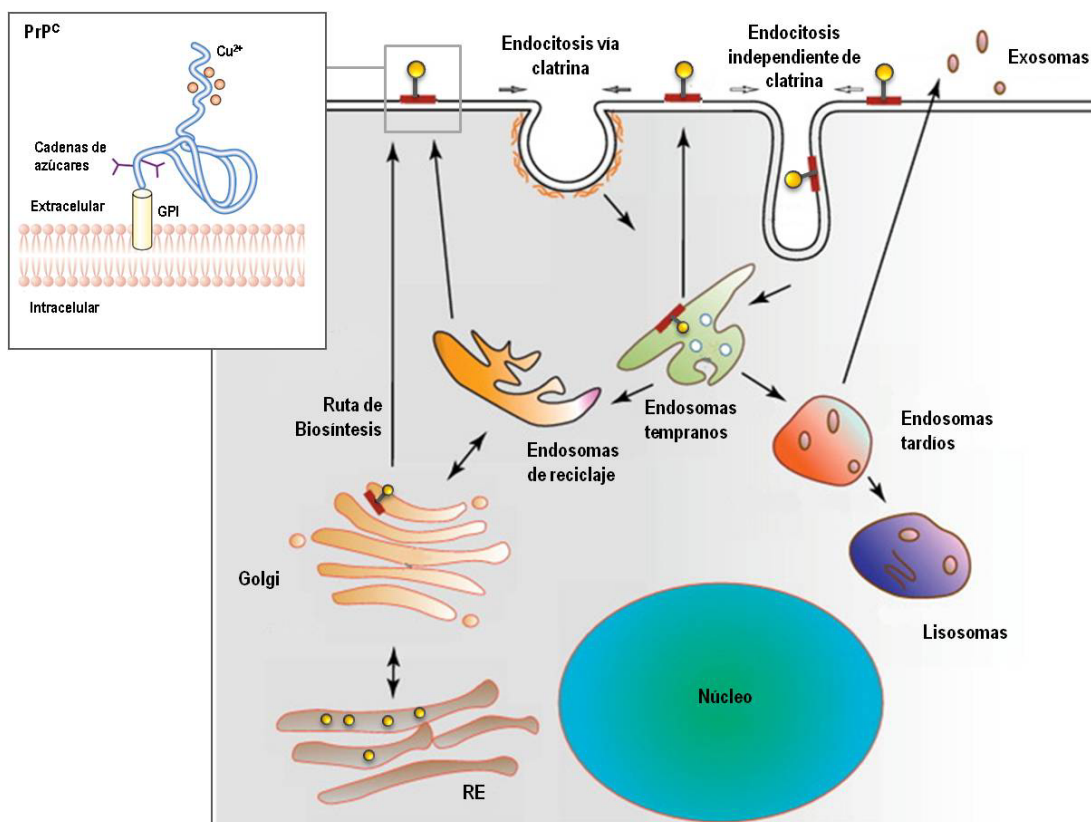
Como se da también con otras proteínas, existen pequeñas fracciones de PrP<sup>C</sup> de plegamiento erróneo que son enviadas al citosol desde el RE para su degradación en el proteasoma. Se ha observado, mediante el uso de inhibidores del proteasoma en cultivos celulares y en animales transgénicos, que la acumulación de pequeñas cantidades de esta PrP<sup>C</sup> citosólica puede llegar a ser altamente neurotóxica y causar neurodegeneración severa independiente de PrP<sup>SC</sup> (Ettaihe et al., 2000, Ma et al., 2002, Wang et al., 2009b). No obstante, este hecho está por confirmar, pues existen contradicciones al respecto que incluso le atribuyen un rol antiapoptótico (Roucou et al., 2003, Fioriti et al., 2005).

### Endocitosis

Experimentos de cinética celular con proteína PrP<sup>C</sup> marcada han demostrado que, una vez en la superficie celular, PrP<sup>C</sup> entra a formar parte de una vía cíclica de reciclaje entre la membrana plasmática y el compartimento endocítico (Shyng et al., 1993, Harris, 2003, Prado et al., 2004).

Aunque ha habido cierta controversia al respecto, la endocitosis de PrP<sup>C</sup> puede estar mediada tanto por caveolas (Peters et al., 2003) como por vías dependientes de clatrina (Shyng et al., 1994) (Figura 4). Hay que tener en cuenta, sin embargo, que al ser PrP<sup>C</sup> una proteína anclada a membrana mediante un grupo GPI carece de dominios capaces de interactuar directamente con las proteínas adaptadoras de clatrina. En consecuencia, su endocitosis por esta vía requiere de componentes intermedios que medien dicha interacción, además del movimiento de la proteína fuera de los *rafts* lipídicos. Hay indicios de que la región de carga

positiva del extremo N-terminal de PrP<sup>C</sup> (Sunyach et al., 2003) así como la unión de cobre (Pauly and Harris, 1998) a los *octarepeats* puedan tener esa función.



**Figura 4. Biosíntesis y tráfico subcelular de PrP<sup>C</sup>.** La proteína priónica celular, una vez sintetizada en el retículo endoplasmático (RE), se dirige al aparato de Golgi donde se somete a una serie de modificaciones post-traduccionales que incluyen: 1) la eliminación del péptido señal, 2) la adición de cadenas de oligosacáridos, 3) la formación de un puente disulfuro y 4) la adición del grupo GPI de anclaje a la membrana. En la superficie celular, PrP<sup>C</sup> se internaliza al compartimento endocítico por vías dependientes y/o independientes de clatrina para su reciclaje o su proteólisis. *Adaptado de (Brown, 2001, Rajendran et al., 2012).*

También se ha descrito la posible implicación directa del receptor de la lipoproteína de baja densidad (LRP1) y/o el receptor de laminina (67kDa) en la internalización de PrP<sup>C</sup> (Gauczynski et al., 2001).

### Expresión tisular y celular de PrP<sup>C</sup>

Existen ciertas discrepancias sobre la expresión de PrP<sup>C</sup> a nivel tisular y celular. Éstas son debidas principalmente a las diferentes técnicas (Fournier et al., 1995, Fournier et al., 2000, Bailly et al., 2004, Barmada et al., 2004, Fournier, 2008) y anticuerpos (Polymenidou et al., 2008) empleados para su detección. A ello se le suma la variabilidad en la glucosilación (Haraguchi et al., 1989) y los polimorfismos isomórficos (Mastrianni, 2010).

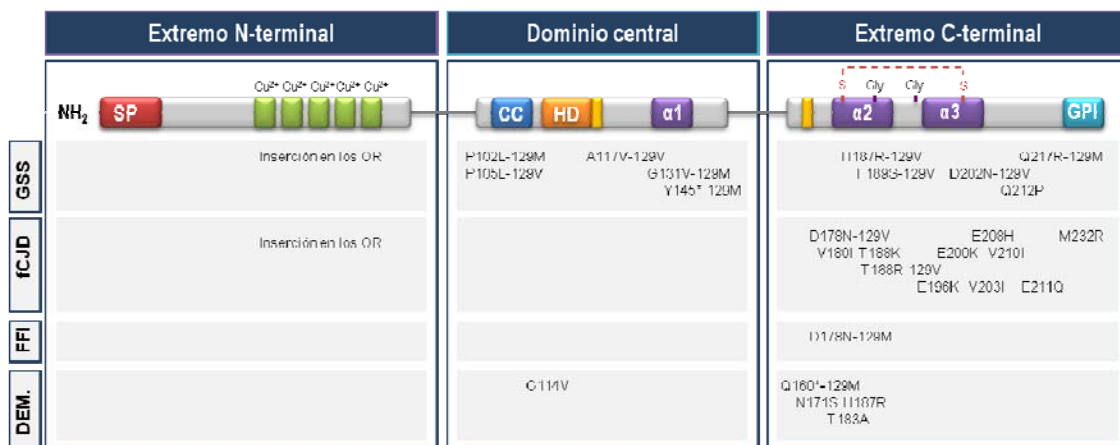
Aún así, se conoce que PrP<sup>C</sup> se expresa en varios tejidos y órganos del cuerpo entre los que encontramos componentes celulares del sistema inmune, la sangre, el estómago, el corazón o incluso el riñón. Sin embargo, su presencia mayoritaria corresponde al SNC, donde se ubica de

forma mayoritaria en regiones tales como el cerebelo, bulbo olfativo, estructuras límbicas y el complejo nigro-estriado (Sales et al., 1998). A nivel celular, se expresa en varias poblaciones neuronales del hipocampo, el tálamo y el neocórtex, así como en células gliales. En las neuronas, PrP<sup>C</sup> predomina en los compartimentos endocíticos, los axones, las dendritas y especialmente en el botón sináptico. Su localización exacta en la sinapsis ha creado cierta controversia, con publicaciones favorables a su presencia pre-sináptica post-sináptica o en ambas (Bailly et al., 2004, Fournier, 2008). En cualquier caso, su presencia en la sinapsis sugiere un posible rol en el control de la transmisión del impulso nervioso (Herms et al., 1999, Brown, 2001, Sales et al., 2002).

Al igual que el mRNA, la expresión de PrP<sup>C</sup> está regulada a lo largo del desarrollo del SNC (Manson et al., 1992, Tremblay et al., 2007, Benvegnu et al., 2010). Se ha descrito que los niveles de la proteína incrementan desde edad embrionaria E7.5 hasta edad postnatal P20 (en ratón), con patrones de expresión específicos según la región cerebral, el tipo celular y las propiedades neuroquímicas de cada neurona (Lazarini et al., 1991, Miele et al., 2003, Tremblay et al., 2007).

### Mutaciones y polimorfismos

Se han identificado gran cantidad de mutaciones en el gen *Prnp* en humanos, principalmente asociadas a enfermedades priónicas hereditarias o a polimorfismos (p.e. M129V). Estos polimorfismos no siempre causan la enfermedad pero pueden afectar en la susceptibilidad del individuo a desarrollarla, así como influir en el período de incubación, la patología o el fenotipo (Mastrianni, 2010, Cortez and Sim, 2013). Otras mutaciones, sobre todo las que se localizan en los puntos de glucosilación, pueden dar lugar a alteraciones estructurales que también parecen tener un papel en el desarrollo de algunas prionopatías (Kiachopoulos et al., 2005, Lawson et al., 2005). La Figura 5 resume las principales mutaciones y polimorfismos descritos para *Prnp*.



**Figura 5. La proteína priónica humana y sus mutantes.** En la figura se indican las inserciones y mutaciones puntuales descritas en el gen *Prnp* humano en pacientes afectados por GSS, fCJD, FFI o mutaciones asociadas a demencia familiar y/o síndromes neuropsiquiátricos (DEM.). El asterisco es indicador de un codón de stop y por lo tanto, una proteína truncada. Se indican también los polimorfismos asociados al codón 129 (metionina, M o valina, V). SP: péptido señal; CC: clúster de carga positiva; HD: región hidrofóbica; α1, α2, α3: hélices-α; GPI: dominio glucosil fosfatidil inositol. El puente disulfuro (S) se genera entre las cisteínas de los residuos 179 y 214, y los puntos de N-glucosilación (Gly) corresponden a los residuos 181 y 197. Adaptado de (Aguzzi et al., 2008a).

## Evolución

PrP<sup>C</sup> está presente en una gran variedad de especies. Genes similares a *Prnp* existen en aves (Gabriel et al., 1992), reptiles (Simonic et al., 2000), anfibios (Strumbo et al., 2001) e incluso en *zebrafish* (Syed et al., 2011) y otros peces (Suzuki et al., 2002, Favre-Krey et al., 2007) además de en todos los mamíferos (van Rheede et al., 2003). Sin embargo, no se ha descrito la presencia de homólogos en organismos más primitivos como insectos, cefalópodos o protozoos. Aunque la identidad en secuencia entre los homólogos conocidos de PrP<sup>C</sup> es limitada se conoce que las proteínas resultantes varían en contenido aminoacídico, teniendo entre 250 y 600 aminoácidos aproximadamente (Simonic et al., 2000, Favre-Krey et al., 2007).

Estudios comparativos de las estructuras disponibles sugieren que todas las moléculas de PrP<sup>C</sup> comparten un rasgo común característico: un extremo N-terminal flexible, con una región cargada positivamente y unida a un dominio globular carboxi-terminal (Wopfner et al., 1999). El plegamiento de este dominio globular incluye la formación de un puente disulfuro altamente conservado (Maiti and Surewicz, 2001), aunque la secuencia primaria muestra una diversidad considerable. Estos dos dominios se unen mediante una región hidrofóbica, que es la región más conservada entre todas las especies (Harrison et al., 2010). Los puntos de glucosilación y las secuencias responsables del procesamiento de la proteína precursora también muestran un grado considerable de conservación (van Rheede et al., 2003). La región de los *octarepeats*, sin embargo, ha experimentado un fenómeno de expansión y retracción, variando en el número de repeticiones de entre 2 y 7 según la especie (van Rheede et al., 2003).

### 1.2.3. Una proteína, dos conformaciones: PrP<sup>C</sup> y PrP<sup>SC</sup>

#### La hipótesis del prión

La conversión de la forma celular de PrP (PrP<sup>C</sup>) a la forma patógena (PrP<sup>SC</sup>) constituye el evento principal de las enfermedades causadas por priones (Pan et al., 1993, Shen and Ji, 2011). Según la hipótesis del prión, la forma endógena normal de PrP, ya sea resultante de un proceso infeccioso o consecuencia de mutaciones desestabilizantes, sufre un cambio conformacional que la transforma en PrP<sup>SC</sup>. Ésta, debido a la insolubilidad que le caracteriza, se deposita en el citoplasma neuronal formando extensos agregados y causando efectos citotóxicos (Pan et al., 1993, Tuite and Serio, 2010). La proteína patógena generada es, a su vez, capaz de transformar más moléculas de PrP<sup>C</sup>, resultando en una reacción en cadena que lleva a la reducción de los niveles endógenos de PrP<sup>C</sup> y al acúmulo de PrP<sup>SC</sup> en los tejidos del huésped. Se cree que esta agregación es el evento patogénico principal que lleva al proceso neurodegenerativo (Satheeshkumar et al., 2004, Aguzzi and Calella, 2009).

#### Modelos de conversión de PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>SC</sup>

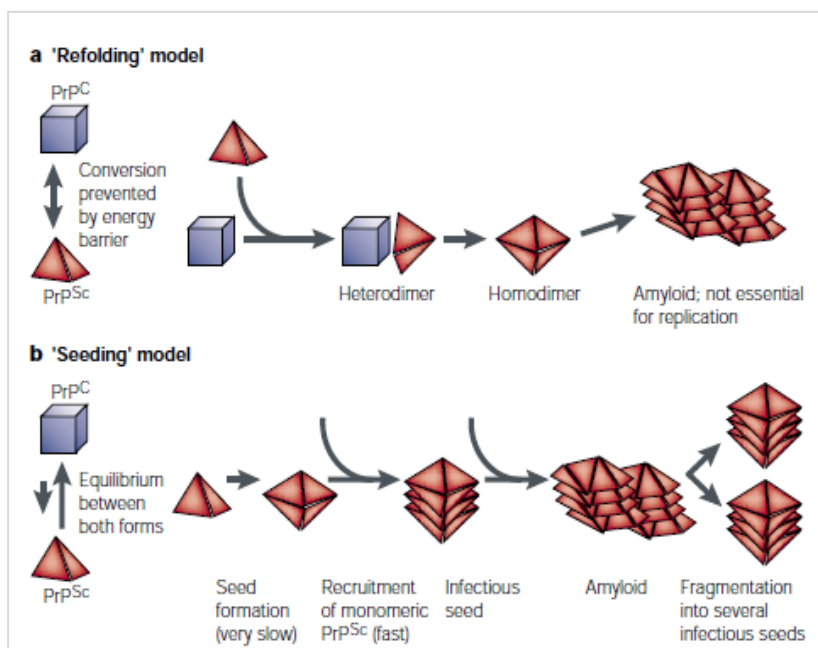
Existen dos modelos principales que describen el cambio conformacional de PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>SC</sup> (Figura 6). Éstos se resumen a continuación.

### Modelo de Plegamiento

De acuerdo con este modelo, PrP<sup>SC</sup> existe en forma de monómero termodinámicamente más estable que PrP<sup>C</sup>. Sin embargo, esta conformación favorecida es cinéticamente inaccesible por sí sola. En este escenario, el punto crítico para la conversión es la formación de un heterodímero entre PrP<sup>SC</sup> y PrP<sup>C</sup>, en el que PrP<sup>SC</sup> actúa como un molde para catalizar el nuevo plegamiento a la conformación más estable (Georgieva et al., 2004). Este proceso requiere atravesar una barrera energética muy grande pero es apoyado por estudios *in vitro* que demuestran que una estructura compuesta principalmente por hélices- $\alpha$  es capaz, espontáneamente, de convertirse en una estructura de contenido mayoritario de láminas- $\beta$  (Weissmann and Aguzzi, 1999, Satheeshkumar et al., 2004).

### Modelo de Nucleación-Polimerización

Este otro modelo propone que ambas proteínas, PrP<sup>C</sup> y PrP<sup>SC</sup> o un precursor de ésta, se encuentran en un equilibrio termodinámico reversible, favorable a la conformación PrP<sup>C</sup>. El paso de PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>SC</sup> ocurre únicamente cuando varias moléculas de la forma anómala se agrupan en un núcleo o “semilla” estable. Este núcleo, una vez formado, lleva al reclutamiento de monómeros de PrP<sup>C</sup> que cada vez más rápido adoptan la conformación de PrP<sup>SC</sup> y dan lugar a un agregado amiloide. Con esta estructura cristalina formada, PrP<sup>SC</sup> se estabiliza. La fragmentación de estos agregados supone a su vez un incremento del número de núcleos que pueden reclutar más monómeros de PrP<sup>SC</sup>, simulando una replicación aparente del agente infeccioso (Aranda-Anzaldo, 1992).



**Figura 6. Modelos de conversión de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>SC</sup>.** a) Modelo de plegamiento o *refolding*. b) Modelo de nucleación-polimerización o *seeding*. Adaptado de (Aguzzi et al., 2001).

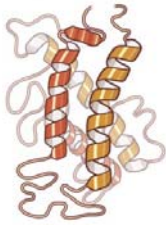
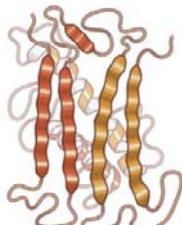
Ambos modelos coinciden en la necesidad de la presencia de PrP<sup>C</sup> para que se pueda dar una infección por priones (Sailer et al., 1994). Esta idea se corroboró posteriormente con la

generación de un modelo de ratón *knockout* (KO) para *Prnp* que resultó ser resistente a este agente infeccioso (Bueler et al., 1993, Weissmann et al., 1994).

### Diferencias bioquímicas y estructurales entre PrP<sup>C</sup> y PrP<sup>SC</sup>

Determinar las características bioquímicas y estructurales de PrP<sup>SC</sup> no ha sido una tarea fácil debido a las dificultades en su purificación a gran escala, su insolubilidad y su heterogeneidad. Aún así, se conoce que PrP<sup>SC</sup> tiene un peso molecular similar al de su homóloga no patológica (30-35kDa) y presenta también diferentes grados de glucosilación (Lehmann and Harris, 1997, Lawson et al., 2005). Además de su naturaleza oligomérica, las características más destacables de PrP<sup>SC</sup> son su insolubilidad y su inusual resistencia a la degradación por enzimas proteolíticas como la proteinasa K (PK) (Prusiner, 1998, Colby and Prusiner, 2011). El núcleo resistente a PK corresponde normalmente a la región C-terminal, muchas veces denominada PrP27-30 por su peso molecular (Oesch et al., 1985). Es este fragmento resistente el que tiene tendencia a formar los agregados y el que constituye el elemento principal de las placas amiloides (Aguzzi and Calella, 2009).

Otras características destacables de la PrP<sup>SC</sup> hacen referencia a su estructura secundaria. Como se ha mencionado anteriormente, el cambio conformacional de PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>SC</sup> supone la transformación de una estructura rica en  $\alpha$ -hélices (Huang et al., 1994) a una de alto contenido en láminas- $\beta$  (Huang et al., 1995). La estructura química que adquiere el prión le hace, además, resistente a las altas temperaturas, radiación ionizante y ultravioleta (Alper, 1972), así como a los métodos estándar de esterilización. La Tabla 2 resume las diferencias más significativas entre ambas proteínas.

PrP <sup>C</sup>	PrP <sup>SC</sup>
Estructura rica en hélices- $\alpha$ (42% hélices- $\alpha$ / 3% láminas- $\beta$ )	Estructura rica en láminas $\beta$ (30% hélices- $\alpha$ / 43% láminas- $\beta$ )
Susceptible a degradación por proteasas	Resistente a la degradación por proteasas
Soluble a detergentes no desnaturizantes	Insoluble en detergentes no desnaturizantes
Presente en forma de monómeros	Presente en forma de agregados proteicos
No resistencia extrema a radiaciones ionizantes y ultravioletas	Resistencia a radiaciones ionizantes y ultravioletas
	
Conformación normal	Conformación alterada

**Tabla 2.** Diferencias bioquímicas y estructurales entre PrP<sup>C</sup> y PrP<sup>SC</sup>.

### ¿Cómo llega PrP<sup>SC</sup> a infectar el SNC?

Llegados a este punto, uno se pregunta cómo puede el prión llegar a dañar el SNC, que resulta ser el único compartimento del organismo que presenta una degeneración clínica e

histopatológicamente detectable (Aguzzi et al., 2001). Son varias las aproximaciones que se han realizado *in vitro* con el fin de reproducir la infección y la replicación del prión. Varias líneas celulares, tanto neuronales como no neuronales (Grassmann et al., 2013), así como cultivos organotípicos (Falsig et al., 2012) y neuroesferas (Iwamaru et al., 2013) han sido infectadas de forma eficiente y son capaces de mantener el proceso replicativo. Asimismo, el tratamiento *in vitro* con un péptido sintético perteneciente a la región central de PrP<sup>C</sup> parece reproducir los eventos que se producen en el cerebro, a nivel celular, en los últimos estadios de la patología priónica (Aguzzi et al., 2001, Gavin et al., 2005, Mabbott and MacPherson, 2006, Vilches et al., 2013).

Como hemos comentado anteriormente, existen diferentes vías de entrada de priones en el organismo. En casos de exposición al patógeno por consumo de alimentos contaminados, como en la BSE, el agente infeccioso es capaz de atravesar el epitelio intestinal y ser transportado y acumulado en los tejidos linfoides tales como el bazo, los ganglios linfáticos o las amígdalas, entre otros. Desde aquí, los priones pueden replicarse y colonizar el sistema inmune a través de la infección de linfocitos, macrófagos y células dendríticas de los centros germinales, que expresan cantidades considerablemente altas de PrP<sup>C</sup> (Cashman et al., 1990, Kitamoto et al., 1991, Aguzzi and Calella, 2009). En una segunda etapa, PrP<sup>SC</sup> asciende retrógradamente a través de las fibras eferentes del sistema nervioso simpático y parasimpático (Beekes et al., 1998, McBride et al., 2001), alcanzando la médula espinal y finalmente el encéfalo. También se ha detectado presencia de priones en la saliva, la placenta y en las heces de animales infectados, por lo que también suponen un elemento de riesgo para la transmisión del prión por vía oral (Gough and Maddison, 2010).

Además de esta vía, también se han descrito otras formas de neuroinvasión. Se han reportado varios casos de propagación de priones directamente al cerebro durante procedimientos quirúrgicos (p.e. trasplantes de córnea o injertos de duramadre) así como a través del sistema circulatorio mediante transfusiones sanguíneas de individuos infectados (Barrenetxea, 2012). Finalmente, también se ha reportado la transmisión eficaz de priones por aerosoles, los cuales llevan a cabo la invasión de estructuras neuronales desde las vías respiratorias sin necesidad de una replicación previa del agente infeccioso en los órganos linfoides (Haybaeck et al., 2011).

### **Pérdida de función vs ganancia de toxicidad**

La conversión de PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>SC</sup> abre el debate sobre si las enfermedades por priones son resultado de la pérdida de función de PrP<sup>C</sup> (del inglés, "*Loss-of-function hypothesis*"), o de la ganancia de toxicidad de PrP<sup>SC</sup> (del inglés "*Gain-of-function hypothesis*"). Por un lado, si PrP<sup>C</sup> tiene un rol importante en alguna función fisiológica básica, como parece que se está demostrando (Lasmezas, 2003, Westergard et al., 2007), la reducción de sus niveles puede comportar el desarrollo del fenotipo y la neurodegeneración observada en las enfermedades priónicas (Hetz et al., 2003). No hay que olvidar, sin embargo, que tanto la ausencia de Prp<sup>C</sup> en el animal *Pmp-knockout* (Bueler et al., 1993) como la expresión de formas funcionales de PrP<sup>C</sup> con mutaciones en tan solo un único aminoácido (p.e. la sustitución D167S en la región  $\alpha$ 2- $\beta$ 2 de PrP<sup>C</sup> en el ratón Tg(Mo<sup>167S</sup>)), confieren resistencia a la infectividad por priones (Bett et al., 2012).

Por otro lado, si los efectos tóxicos derivan de PrP<sup>SC</sup>, un aumento de sus niveles conllevará un incremento de la toxicidad. Hay que tener en cuenta, por eso, que aunque sí se ha asociado cierta toxicidad a la agregación de PrP<sup>SC</sup>, no queda clara una correlación espacial entre estos procesos de muerte y los depósitos de PrP<sup>SC</sup> (Brandner et al., 1996). Se cree que son las formas oligoméricas intermedias las responsables de esta toxicidad (Aguzzi and O'Connor, 2010).

Probablemente es la suma de ambos factores la responsable del desarrollo de la patología priónica (Shen and Ji, 2011). En base a esta idea, se han generado nuevas líneas de investigación dirigidas al estudio de las prionopatías, que podrían agruparse en dos grandes aproximaciones, una focalizada al estudio de PrP<sup>SC</sup>, su transmisibilidad y mecanismo de infección y toxicidad, y otra destinada a conocer más en detalle las funciones fisiológicas de PrP<sup>C</sup> y su posible alteración en respuesta a diferentes mutaciones o a cambios en los niveles de expresión de la proteína.



## 2 Funciones fisiológicas de PrP<sup>C</sup>

### 2.1. ESTRATEGIAS PARA EL ESTUDIO DE LAS POSIBLES FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE PrP<sup>C</sup>

Son varias las estrategias que se han desarrollado para llegar a conocer la función fisiológica de PrP<sup>C</sup>. Aunque la utilidad de los animales transgénicos es incuestionable, otras aproximaciones basadas en estudios *in vitro* con modelos celulares, también han aportado información relevante. Es cierto, que los resultados obtenidos de modelos *in vivo* no siempre correlacionan con los obtenidos *in vitro*, probablemente por una marcada especificidad celular o por influencia del entorno extracelular. Aún así, cualquier estudio al respecto es esencial y muy valioso para conocer el rol de PrP<sup>C</sup> y llegar a entender las bases moleculares de las enfermedades causadas por priones.

#### 2.1.1. Modelos *in vivo* : el uso de animales transgénicos para el estudio funcional de PrP<sup>C</sup>

El uso de técnicas de recombinación homóloga y de clonaje de cDNA permitió sobre los años 90 la generación de ratones *Prnp-knockout* (Locht et al., 1986). La alta conservación de la proteína entre mamíferos (van Rheede et al., 2003) había creado una gran expectación alrededor de la generación de estos modelos transgénicos, creyendo que revelarían la función fisiológica de PrP<sup>C</sup>. Sin embargo, estos animales resultaron no mostrar un fenotipo claro (Steele et al., 2007). Este hecho llevo a pensar que, o bien PrP<sup>C</sup> no era tan esencial como se creía para la supervivencia y desarrollo del organismo (Bueler et al., 1992, Manson et al., 1994, Weissmann and Bueler, 2004) o bien existían mecanismos compensatorios que estaban enmascarando su verdadera función (Steele et al., 2007).

Años después, tras un estudio más detallado, se fueron desvelando diferentes fenotipos en el ratón *Prnp-knockout*, entre los que encontramos su resistencia a la infección por priones (Bueler et al., 1993, Sailer et al., 1994, Weissmann et al., 1994). Este fenotipo, que es el más importante que se ha descrito, corrobora la hipótesis de que se requiere de la proteína endógena para la replicación del prión (Aguzzi et al., 2001, Aguzzi et al., 2008b).

Las características de los principales ratones *transgénicos* generados hasta el día de hoy para el estudio de PrP<sup>C</sup> se resumen a continuación (ver (Weissmann and Flechsig, 2003, Linden et al., 2008) para revisión).

### Modelos *Prnp-knockout*

Las primeras líneas de ratones transgénicos en los que se había eliminado el gen de PrP<sup>C</sup> fueron denominadas *Zurich I* (Bueler et al., 1992) y *Edinburgh* (Manson et al., 1994), en referencia a la ciudad donde se habían generado (Tabla 3). Ambos ratones mostraban resistencia a priones pero ningún otro fenotipo a primera vista. Más tarde se describieron ciertas alteraciones a nivel de transmisibilidad sináptica (Collinge et al., 1994, Herms et al., 1995) y una mayor susceptibilidad a estrés oxidativo (Brown et al., 2002), y excitotoxicidad por glutamato (Walz et al., 1999, Rangel et al., 2007, Khosravani et al., 2008). Al ratón *Edinburgh*, también se le asociaron alteraciones en ritmos circadianos (Tobler et al., 1996) y déficits cognitivos (Criado et al., 2005).

Cepa	Mecanismo de generación	Background	Fenotipo
<b>Wild type (Wt)</b>	Exón 3 y regiones adyacentes no codificantes (UTR).		Sin fenotipo
<b>Zurich I (ZrchI)</b>	Reemplazamiento de los residuos 4-187 con un casete Neo.	<i>c57BL/6J x 129/Sv</i>	Desarrollo normal. Déficits en transmisión sináptica. Sensibilidad incrementada a estrés oxidativo y a la excitotoxicidad por glutamato
<b>Edinburgh (Edbg)</b>	Interrupción del ORF en posición 93 e introducción de un casete Neo.	129/Ola	Desarrollo normal. Alteración en ritmos circadianos. Déficits cognitivos y sinápticos. Sensibilidad incrementada a estrés oxidativo y a la excitotoxicidad por glutamato
<b>Nagasaki (Ngsk)</b>	Reemplazamiento de parte del intrón 2, el ORF completo y parte del 3' UTR por un casete Neo.	<i>c57BL/6J x 129/Sv</i>	Ataxia cerebelar y pérdida selectiva de células de purkinje.
<b>Rcm0</b>	Reemplazamiento de parte del intrón 2, el ORF completo y parte del 3' UTR por un casete de HPRT	<i>c57BL/6J x 129/Sv</i>	Ataxia cerebelar y pérdida selectiva de células de purkinje.
<b>Zurich II (ZrchII)</b>	Reemplazamiento desde 0,27 kb del intrón 2 hasta 0,6 kb de la región adyacente al exón 3 con un lugar <i>loxP</i> .	<i>c57BL/6J x 129/Sv</i>	Ataxia cerebelar y pérdida selectiva de células de purkinje.

**Tabla 3. Estrategias de generación de ratones *Prnp-knockout*.** Resumen de las principales cepas de ratones transgénicos KO para PrP<sup>C</sup> existentes. Se indica también el mecanismo utilizado para su generación y el fenotipo observado en cada uno. Neo: neomicina fosfotransferasa; HPRT: hipoxantina fosforribosil transferasa. *loxP*: secuencia derivada del bacteriófago P1. *Adaptado de (Weissmann and Flechsig, 2003).*

Años después, se generaron varias cepas nuevas de animales *Prnp-knockout*: la *Nagasaki* (Sakaguchi et al., 1996), la *Rcm0* y la *Zurich II* (Tabla 4). Éstas no resultaron ser buenos modelos animales, pues los tres mostraban ataxia cerebelar y pérdida selectiva de células de purkinje (Flechsig et al., 2003). Los estudios realizados demostraron que este fenotipo era reversible mediante la re inserción de PrP<sup>C</sup>, lo que llevó erróneamente a atribuir esta neurodegeneración a la ablación de la proteína priónica celular. La discrepancia en el fenotipo de los diferentes modelos *Prnp-knockout* hizo, más tarde, que se generasen animales transgénicos que expresaban formas truncadas de la proteína. Gracias a ellos, se pudo asociar la neurodegeneración observada a la sobreexpresión de la proteína Doppel, que no se había descrito en los animales *Zurich I* y que parecía ser consecuencia de la alteración en los mecanismos de *splicing* derivada del procedimiento de generación de estos tres modelos transgénicos (Moore et al., 1999). Shmerling y colaboradores habían descrito como la expresión en un fondo *Zurich I* de formas de PrP<sup>C</sup> carentes de la región N-terminal reproducía no solo la ataxia cerebelar de modelos *Nagasaki*, *Rcm0* y *Zurich II* sino también el rescate de fenotipo por re inserción de PrP<sup>C</sup>. La semejanza de Doppel a esta forma truncada de PrP<sup>C</sup>, fue la que llevó, finalmente, a descubrir la participación de esta proteína en el fenotipo degenerativo de estas tres cepas *Prnp-knockout* (Shmerling et al., 1998).

### **Modelos de expresión de formas truncadas de PrP<sup>C</sup>**

Muchas otras cepas de ratones transgénicos de sobreexpresión de formas truncadas de PrP<sup>C</sup> han sido generados desde entonces, presentando fenotipos distintos según los dominios eliminados (Shmerling et al., 1998, Li et al., 2007a, Baumann et al., 2009) y proporcionando información funcional sobre la diferentes regiones estructurales de la proteína. Los más destacados se resumen en la Tabla 4 y se describen a continuación.

#### Región N-terminal

Entre estos mutantes encontramos los que presentan alteraciones en la región de los *octarepeats*. Los experimentos realizados *in vitro* indican que este dominio es el principal mediador de la función neuroprotectora de PrP<sup>C</sup> ya que la sobreexpresión de formas truncadas carentes de los OR o la inserción de repeticiones promueve la muerte celular y altera la susceptibilidad a estrés oxidativo *in vitro* (Sakudo et al., 2003, Yin et al., 2006). No obstante, los estudios *in vivo* realizados con los mutantes carentes de los OR (PrP $\Delta$ 32-80, PrP $\Delta$ 32-93 y PrP $\Delta$ 32-106) indican que esta región no es crítica para la función neuroprotectora de PrP<sup>C</sup>, ya que no presentan el fenotipo neurodegenerativo que sí se observa *in vivo* tras deleciones más extensas (p.e. en el animal PrP $\Delta$ 32-121 y PrP $\Delta$ 32-134 (o PrP $\Delta$ F35)) (Shmerling et al., 1998, Li et al., 2007b). Estudios posteriores han asociado esta función neuroprotectora a la región polibásica adyacente correspondiente a los residuos 23-31 (Turnbaugh et al., 2011).

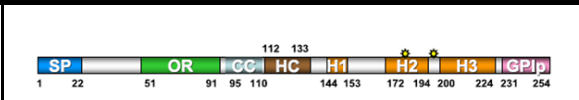





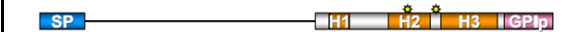



#### Dominio central

A pesar de que el uso de péptidos sintéticos que mimetizan el dominio central han resultado ser neurotóxicos *in vitro* (Forloni et al., 1993, Gavin et al., 2005), se ha observado que la eliminación del CD *in vivo* (PrP $\Delta$ 94-134 o PrP $\Delta$ CD) da lugar a un fenotipo neurodegenerativo progresivo y letal (Baumann et al., 2007), que es reversible mediante la expresión de PrP<sup>C</sup> *wild*

*type* o de PrP<sup>C</sup> carente de la región de los OR. Por otro lado, el mutante PrP $\Delta$ 105-125 presenta una toxicidad mucho mayor a la observada en mutantes con depleción de regiones más extensas o incluso en transgénicos de sobreexpresión de Doppel. Parece ser que la falta de este dominio produce un incremento en la afinidad de PrP<sup>C</sup> hacia su hipotético receptor responsable de la transducción de señales neurotóxicas (Li et al., 2007a).

### Región C-terminal

El extremo carboxi-terminal se caracteriza por la presencia de estructuras secundarias esenciales para mantener la conformación de la proteína, así como la presencia de un grupo GPI capaz de anclar PrP<sup>C</sup> a la membrana. Se ha descrito que mutantes con depleciones en las hélices  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  desarrollan un fenotipo neurodegenerativo (Muramoto et al., 1997). Sin embargo, animales transgénicos que expresan formas solubles de PrP<sup>C</sup> (del inglés, *anchorless*) por eliminación de su grupo GPI no presentan cambios patológicos apreciables (Chesebro et al., 2005).

	$\Delta$	NDG
	-	-
	$\Delta 32-80$	NO
	$\Delta 32-93$	NO
	$\Delta 32-106$	NO
	$\Delta 32-121$	SI
	$\Delta 32-134$	SI
	$\Delta 94-134$	SI
	$\Delta 114-121$	NO
	$\Delta 105-125$	SI
	$\Delta 231-254$	NO

**Tabla 4. Fenotipo neurodegenerativo en ratones *Prnp-knockout* que expresan formas truncadas de PrP<sup>C</sup>.** La molécula PrP<sup>C</sup> wt se muestra en la parte superior. Los dominios de la proteína eliminados se han substituido por una línea negra. Los aminoácidos correspondientes y la presencia/ausencia de neurodegeneración (NDG) se indican a la derecha. Adaptado de (Aguzzi et al., 2008a, Linden et al., 2008).

### Modelos de sobreexpresión de *Prnp* o formas mutadas de la proteína

Cuando un fenotipo determinado es observado tras la ablación de un gen en un animal transgénico es importante confirmar la asociación gen-fenotipo mediante la reinserción del cDNA en el animal *knockout* generado. En el caso de PrP<sup>C</sup>, la sobreexpresión de la forma *wild type* en un *background knockout* Tg(wtPrP) resulta en la acumulación de PrP<sup>C</sup> no funcional en el organismo, obteniendo un fenotipo similar al derivado de una ausencia de PrP<sup>C</sup>.

Concretamente, la cepa Tg20 presenta una excitabilidad neuronal incrementada (Rangel et al., 2009) y desarrolla ataxia y degeneración del sistema nervioso central y periférico a edades avanzadas (Westaway et al., 1994). Esto ha llevado a pensar que la sobreexpresión de PrP<sup>C</sup> puede ser patológica, ampliando así el espectro de las enfermedades priónicas (Ma et al., 2002).

Finalmente, también se han generado animales transgénicos con mutaciones puntuales en la secuencia de PrP<sup>C</sup>. A modo de ejemplo, se ha descrito que mutaciones en la región hidrofóbica central de PrP<sup>C</sup> alteran la estructura y el procesamiento proteolítico de la proteína, modificando su paso por el retículo endoplasmático y, consecuentemente, su orientación a nivel de membrana, dando lugar a formas transmembrana asociadas a procesos neurodegenerativos (Hegde et al., 1998a). Por otro lado, la inserción de nueve repeticiones en los OR asociadas a mutaciones hereditarias de *Prnp* también resultan en un fenotipo neurodegenerativo en el animal transgénico PG14 (Chiesa et al., 1998).

### 2.1.2. Aproximaciones experimentales *in vitro* al estudio de la función de PrP<sup>C</sup>

Los estudios funcionales de PrP<sup>C</sup> realizados sobre gran variedad de líneas celulares (p.e. células N2a, células gástricas cancerosas SGC7901 o células SK-N-SH, entre otras) y cultivos primarios han complementado la información obtenida de los modelos animales, a la vez que han permitido eliminar la posible influencia del fondo genético derivada de los modelos *in vivo* (Schauwecker and Steward, 1997, Striebel et al., 2013a, Striebel et al., 2013b). La mayoría de estos estudios corresponden al análisis de cambios funcionales y bioquímicos derivados de la modulación estable o transitoria de los niveles de expresión de la proteína. Asimismo, los análisis de proteómica y genómica funcional realizados en estas condiciones experimentales también han proporcionado información sobre la regulación de la expresión de genes y proteínas de forma PrP<sup>C</sup>-dependiente (Llorens et al., 2013b).

Otra estrategia para abordar *in vitro* el estudio de la función de PrP<sup>C</sup> ha consistido en identificar sus ligandos o proteínas de interacción (Watts and Westaway, 2007, Aguzzi et al., 2008a, Linden et al., 2008), con el fin de analizar su posible relación con procesos celulares y funciones ya conocidas. El uso de técnicas inmunohistoquímicas y de co-localización, junto con ensayos de doble híbrido, co-inmunoprecipitación o *cross-linking*, han permitido la identificación de un gran número de moléculas (Tabla 5) (Aguzzi A, 2008; Watts JC, 2007; Linden R, 2008). Sin embargo, hay que tener en cuenta que muchas veces, la falta de compartimentalización en sistemas *in vitro* o diferencias en niveles de expresión de la proteína dan lugar a falsos positivos (Watts and Westaway, 2007, Llorens et al., 2013b). En consecuencia, únicamente unas pocas de estas proteínas han resultado ser funcionales en contextos fisiológicos (Lee et al., 2003, Watts and Westaway, 2007, Llorens et al., 2013b).

Proteína	Función	Referencia
Proteínas de membrana:		
- N-CAM	Adhesión celular, señalización	(Schmitt-Ulms et al., 2001)
- Laminina	Adhesión celular, transducción de señal y neuritogénesis	(Graner et al., 2000b)
- Caveolina-1	Endocitosis	(Harmey et al., 1995)
- Quinasa Fyn	Molécula transdutora de señales intracelulares	(Mouillet-Richard et al., 2000)
- Clatrina	Tráfico intracelular de receptores de membrana	(Petrakis and Sklaviadis, 2006)
- Na <sup>+</sup> /KA <sup>+</sup> ATPasa $\alpha$ 3	Transporte activo de cationes a través de la membrana	(Petrakis and Sklaviadis, 2006)
- $\beta$ -distroglicano	Proteína constituyente del complejo distroglicano	(Keshet et al., 2000)
- BACE-1	Procesamiento de APP	(Parkin et al., 2007)
- $\alpha$ -espectrina	Mantenimiento de la integridad de la membrana y la estructura del citoesqueleto	(Petrakis and Sklaviadis, 2006)
Proteínas citoplasmáticas:		
- Proteína inducible por estrés (ST11)	Proteína de choque térmico (del inglés <i>Heat shock protein</i> )	(Zanata et al., 2002)
- $\alpha$ -tubulina	Subunidad formadora de microtúbulos - citoesqueleto	(Niezanski et al., 2005)
- $\beta$ -actina	Subunidad formadora de microfilamentos - citoesqueleto	(Keshet et al., 2000)
- Bcl-2	Molécula inhibidora de la apoptosis	(Kurschner and Morgan, 1995)
- Grb2	Proteína adaptadora para receptores tirosina quinasa	(Spielhaupter and Schatzl, 2001)
Proteínas sinápticas:		
- Sinapsina II	Regulación de la sinaptogénesis y la formación de vesículas	(Spielhaupter and Schatzl, 2001)
- Sinaptofisina	Proteína presináptica vesicular	(Keshet et al., 2000)
Proteínas nucleares:		
- CBP70	Lectina	(Rybner et al., 2002)

**Tabla 5. Proteínas de interacción con PrP<sup>C</sup>.** Resumen de algunas de las proteínas y moléculas de interacción descritas para PrP<sup>C</sup>. *Adaptado de (Watts and Westaway, 2007, Aguzzi et al., 2008a).*

### 2.1.3. Posibles funciones descritas de PrP<sup>C</sup>

Las diferentes aproximaciones experimentales llevadas a cabo hasta el momento, tanto *in vitro* como *in vivo* para el estudio de PrP<sup>C</sup> han permitido establecer hipótesis sobre el posible rol fisiológico de esta proteína (ver (Lasmezas, 2003, Westergard et al., 2007, Aguzzi et al., 2008a, Linden et al., 2008) para revisión). Sin embargo, a día de hoy, todavía existe cierta controversia al respecto. Aún así, los datos existentes involucran a PrP<sup>C</sup> en múltiples procesos celulares. Los más importantes se describen en la Figura 7. Conocer con detalle los mecanismos moleculares sobre los cuales actúa PrP<sup>C</sup> en cada uno de estos procesos es esencial para entender la patología priónica y encontrar dianas efectivas para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.



**Figura 7.** Posibles funciones fisiológicas descritas para PrP<sup>C</sup>.

A continuación, entraremos en detalle en las funciones de PrP<sup>C</sup> que están directamente relacionadas con nuestra línea de investigación. No hay que olvidar, sin embargo, que existe una gran interconexión entre todas ellas.

## 2.2. PRP<sup>C</sup> Y LA REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR Y LA PROLIFERACIÓN

### 2.2.1. Introducción al ciclo celular

El ciclo celular es un proceso esencial en el desarrollo, la diferenciación, la proliferación y la muerte de las células eucariotas, que consiste en una serie de eventos que dan lugar a la división y duplicación celular (King and Cidlowski, 1995, Ohnuma and Harris, 2003).

La progresión a través de este ciclo está altamente regulada por la activación e inactivación de proteínas asociadas. Cualquier evento que pueda alterar este proceso llevará a la disfunción e incluso la muerte celular. A nivel clínico, numerosos estudios han demostrado una clara correlación entre la desregulación de esta maquinaria celular y el desarrollo de enfermedades como el cáncer (Malumbres and Barbacid, 2009, Mehrpour and Codogno, 2010) principalmente, pero también otras patologías y afectaciones del sistema nervioso como la AD (Vincent et al., 1997), el Parkinson o la isquemia entre otros (Wang et al., 2009a).

#### Fases del ciclo celular

En las células eucariotas, el ciclo celular se divide principalmente en cuatro fases: G1, S, G2 y M. Durante la fase G1, la célula se prepara para la síntesis y replicación del material genético, que se producirá durante la fase S de manera que al final de la transición G2/M la célula se pueda dividir y dar lugar a dos células hijas. Las células quiescentes se mantienen fuera del ciclo, en fase G0, y son inducidas a entrar de nuevo en ciclo mediante la estimulación mitogénica (revisado en (Alberts et al., 2002, Wang et al., 2009a)).

## Mecanismos de regulación del ciclo celular

Este proceso biológico está orquestado por diferentes proteínas de ciclo celular, que incluyen ciclinas, quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y moléculas inhibidoras de quinasas dependientes de ciclinas (CKIs) (Malumbres and Barbacid, 2005, Wang et al., 2009a, Berridge, 2012). Todas ellas constituyen un complejo regulador altamente sincronizado e integrado (Kohn, 1999) entorno a la activación e inactivación periódica y ordenada de las CDKs. Éstas están presentes de forma constitutiva durante la progresión del ciclo celular a diferencia de las ciclinas, que se sintetizan o degradan en momentos específicos en respuesta a diferentes señales moleculares (Figura 8).

Las ciclinas y sus CDKs asociadas forman las subunidades reguladora y catalítica, respectivamente, de un heterodímero (ciclina-CDK) (Pines, 1993). Tras la interacción de las dos moléculas, la subunidad catalítica produce la activación o inactivación de una proteína diana (específica para cada heterodímero) mediante una reacción de fosforilación, regulando así el paso a la siguiente fase del ciclo celular. La integridad del genoma se mantiene a lo largo del ciclo gracias a un sistema de puntos de restricción o *checkpoints*, que operan en respuesta a daño en el material genético o DNA (Pardee, 1989, King and Cidlowski, 1995). El proceso se resume de la siguiente manera:

### Progresión G1/S

La presencia de un estímulo extracelular pro-mitótico (p.e. un factor de crecimiento) lleva a la síntesis de ciclina D, que es la primera ciclina que se produce a lo largo del ciclo y controla la progresión en fase G1 (Sherr, 1994). Esta ciclina activa a CDK4/6, lo que lleva a la fosforilación de la proteína retinoblastoma (Rb), que está formando un complejo con el factor de transcripción E2F. Esta fosforilación produce la disgregación del complejo, permitiendo la actividad transcripcional de E2F. Este punto es considerado crítico o un punto de restricción en el ciclo, a partir del cual la célula ya está irrevocablemente destinada a entrar en fase S (Pardee, 1989).

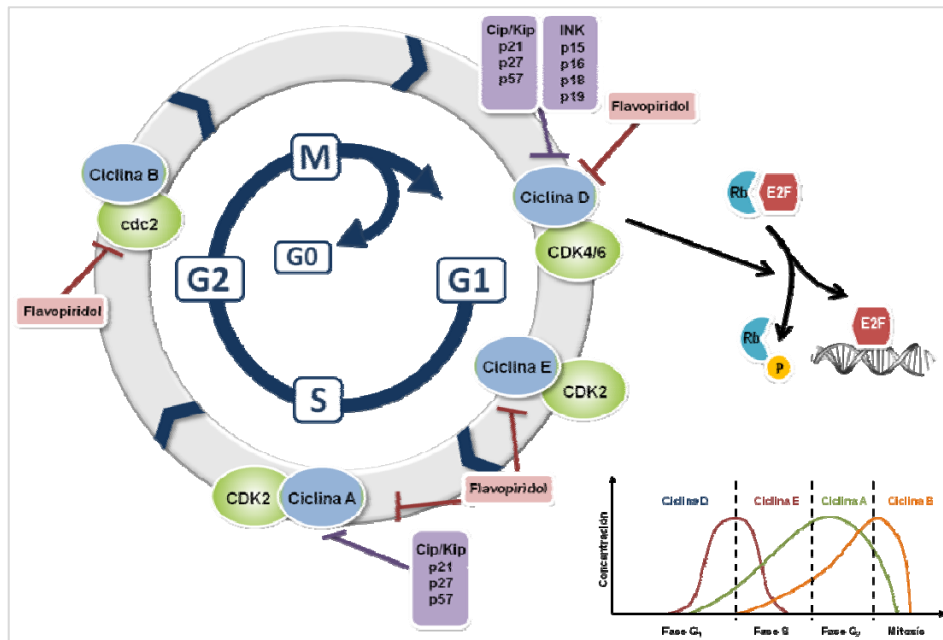
Para poder entrar en fase S se requiere previamente de la activación de CDK2 al final de la fase G1, mediante su interacción con la ciclina E. Este complejo debe ser silenciado, mediante ubiquitinación y degradación de la ciclina E en el proteasoma, una vez entrada la fase S para evitar la doble replicación del DNA (Malumbres and Barbacid, 2005). Tras la desaparición de ciclina E, CDK2 se asocia con la ciclina A, recién sintetizada. Este nuevo complejo es responsable de la activación de varias proteínas implicadas en la actividad de la DNA polimerasa, la replicación del DNA y la salida de fase S.

### Progresión G2/M:

Durante la fase G2, se produce la degradación proteolítica de las ciclinas A a la vez que se sintetizan ciclinas B. Éstas últimas se asocian con CDK1 (también llamada cdc2) para mediar el proceso mitótico mediante su translocación al núcleo y la activación de proteínas implicadas en la condensación de los cromosomas, la formación del huso mitótico y la rotura de la envuelta

nuclear (Li et al., 1997). La posterior inactivación progresiva del complejo ciclina B-cdc2 es esencial para la correcta segregación de los cromosomas y la división celular.

En esta cadena de complejos ciclina-CDK también intervienen moléculas de señalización (Pardee, 1989) así como inhibidores endógenos (p.e. cip/kip o INK4) o exógenos (p.e. flavopiridol) que refinan la dinámica del ciclo celular y regulan el potencial proliferativo.



**Figura 8. El ciclo celular.** La progresión a través del ciclo celular se da mediante las fases M, G1, S, y G2, y se regula mediante la expresión y activación de ciclinas, quinasas dependientes de ciclina (CDKs) e inhibidores de CDKs. Los complejos ciclina-CDK son específicos de cada fase del ciclo. El complejo ciclina D-CDK4/6 fosforila a retinoblastoma (Rb) y libera el factor E2F, que inicia la transcripción del DNA. Adaptado de (Wang et al., 2009a).

## 2.2.2. La proliferación celular

La entrada en ciclo de una célula supone, en la mayoría de los casos, el inicio del proceso de proliferación, que da lugar al crecimiento y a la división celular (Pardee, 1989). En el SNC, los procesos de proliferación se dan principalmente durante el desarrollo, aunque en el organismo adulto también podemos encontrar centros proliferativos latentes, como la región subventricular (SVZ) o el giro dentado del hipocampo (DG), constituidos por células madre neuronales (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002, Ohnuma and Harris, 2003, Steele et al., 2006). En ambos casos, este proceso está altamente regulado y coordinado en el tiempo y en el espacio (Gotz and Huttner, 2005). En las neuronas ya diferenciadas, también se requiere de un control preciso del ciclo celular para el mantenimiento del fenotipo neuronal. Aunque estas neuronas son células típicamente post-mitóticas y terminalmente diferenciadas, existen evidencias de que éstas mantienen la capacidad de reentrar en el ciclo en respuesta a ciertos estímulos (Herrup and Busser, 1995). Sin embargo, en estos casos la entrada en ciclo suele conducir a la muerte celular en lugar de a la proliferación.

Los principales elementos inductores de la proliferación son los factores de crecimiento (Berridge, 2012). Éstos, a través de receptores de membrana, activan vías de señalización específicas que actúan a nivel de la fase G1 del ciclo celular, induciendo la entrada en ciclo y el crecimiento de poblaciones celulares en zonas localizadas y en momentos determinados (Pardee, 1989, Kerkhoff and Rapp, 1998).

### **Los factores de crecimiento y su señalización intracelular**

Los factores de crecimiento son un conjunto de moléculas, ampliamente diversas en cuanto a estructura, capaces de inducir la proliferación y el crecimiento celular. Su actividad está mediada principalmente por receptores transmembrana con dominios citoplasmáticos tirosina-quinasa. La sobrerregulación de algunos factores de crecimiento y receptores asociados han sido relacionados con la formación de tumores (Malumbres and Barbacid, 2009, Pines et al., 2010).

Las principales familias de factores de crecimiento que encontramos incluyen: i) factores de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), ii) factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), iii) factores de crecimiento epidérmicos (EGF), iv) factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o iv) factores de crecimiento insulínico (IGF), entre otros. Estos factores utilizan una gran variedad de vías de señalización para transmitir información desde la superficie celular al núcleo. Las principales vías implicadas son: i) la vía de las quinasas activadas por mitógenos o MAPK, ii) la vía canónica *Wnt/ $\beta$ catenina*, iii) la vía *Hedgehog (Hh)*, iv) la vía del  $Ca^{2+}$  o v) la vía de factores nucleares como NF- $\kappa$ B, y llevan a la activación de factores de transcripción nucleares (p.e. CREB, o GLI1) y a la posterior transcripción de genes implicados en la proliferación celular. Estas vías inductoras de proliferación contrastan con vías de señalización antiproliferativas, que actúan evitando la entrada en el ciclo (p.e. la vía de TGF- $\beta$ ) (ver (Berridge, 2012) para revisión).

### **2.2.3. EGF y EGFR**

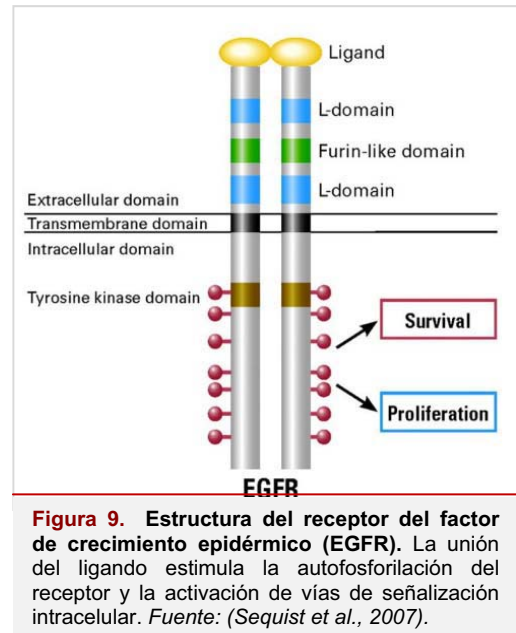
Los EGFs constituyen una familia de proteínas, de unos 53 aminoácidos, capaces de regular los mecanismos de proliferación, migración y diferenciación celular mediante su interacción con receptores tirosina quinasa presentes en la membrana celular (p.e. el receptor del factor de crecimiento epidérmico o EGFR) (Wong and Guillaud, 2004). Su descubrimiento se debe a Stanley Cohen y Rita Levi-Montalcini, por el cual recibieron el Premio Nobel de medicina en 1986 (Cohen, 1983).

#### **Características estructurales de EGFR**

El EGFR (o ErbB-1) es uno de los cuatro constituyentes de la familia de receptores ErbB junto con HER2 (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) y HER4 (ErbB-4), y se sintetiza a partir de un precursor polipeptídico de 1210 residuos. Tras la eliminación de la secuencia N-terminal hidrofóbica de inserción en membrana y la adición de grupos de glucosilación, la proteína es enviada a la superficie celular donde llevará a cabo su función.

El receptor EGFR maduro es una glicoproteína integral de membrana, de 170kDa. Está constituida por un dominio extracelular N- terminal (o ectodominio), que incluye la región de unión del ligando, seguida de un único dominio transmembrana y un dominio citoplasmático C-terminal (Lax et al., 1989). En este último, se localiza el sitio catalítico responsable de la activación tirosina quinasa, concretamente los residuos Y992, Y1045, Y1068, Y1148 e Y1173 (Figura 9). Este dominio también contiene algunos residuos serina/treonina cuya fosforilación regula los procesos de autoregulación del receptor por mecanismos de endocitosis (Wong and Guillaud, 2004, Bazley and Gullick, 2005).

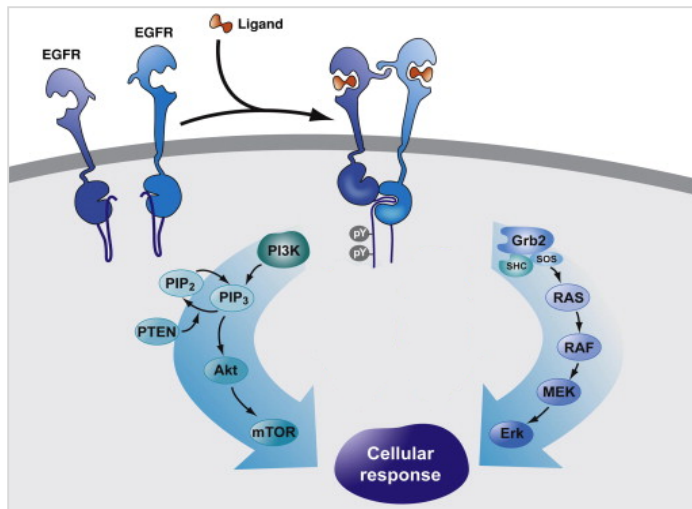
Más de la mitad de los EGFR inactivos (la mayoría en forma de monómeros) se concentran en las caveolas, que constituyen el 5-10% de la membrana celular. Esto facilita su dimerización tras su interacción con ligandos específicos como EGF o el factor de crecimiento transformante (TGF- $\alpha$ ), entre otros (Jorissen et al., 2003).



### Mecanismo de activación de EGFR

La unión del ligando a EGFR produce la transición del receptor de su forma monomérica inactiva a una forma homo- o hetero-dimérica, según si se produce entre receptores idénticos o miembros distintos de la misma familia (Ferguson et al., 2003). Esta dimerización activa la propiedad tirosina intrínseca del receptor que resulta en la autofosforilación de varios residuos de tirosina en su dominio C-terminal. Estas fosforilaciones generan lugares de unión de proteínas adaptadoras (p.e. Grb2, PLC $\gamma$  o Src) a través de sus dominios SH2 (del inglés, *Src homology 2*) o PTB (del inglés, *phosphotyrosin-binding domain*) fosforilados, formando complejos multiméricos de señalización junto con el receptor (Pawson and Scott, 1997). Hay que remarcar que la autofosforilación de EGFR no es un requisito esencial para su activación.

Vista la gran diversidad de moléculas que interaccionan con EGFR, no sorprende que su estimulación resulte en la activación simultánea de varias vías de señalización (Zwick et al., 1999, Jorissen et al., 2003) entre las que encontramos: i) la vía Ras/MAPK, ii) la vía de la fosfoinositol-3 quinasa y proteína quinasa B (PI3K/AKT), iii) la vía de quinasas transductoras de señal y activadoras de la transcripción (STAT), iv) la vía de la fosfolipasa C (PLC) o v) la vía de las quinasas c-jun N-terminal (JNK), entre otras. Estas vías están funcionalmente interconectadas pero, con el fin de simplificar la explicación, nos centraremos en las dos primeras, implicadas en la proliferación y supervivencia celular (Figura 10).



**Figura 10. Señalización vía EGFR.** La unión del ligando produce la dimerización del receptor en la superficie celular y su autofosforilación. Este proceso lleva a la activación de las vías de señalización de PI3K/AKT y Ras/MAPK, entre otras, implicadas en respuestas celulares de proliferación y supervivencia. Modificado de (Pines et al., 2010).

### Vía de señalización Ras/MAPK

Esta cascada de transducción de señales se inicia con la unión de la proteína adaptadora Grb2 (del inglés, *Growth factor receptor-bound protein 2*) al dominio C-terminal transfosforilado del EGFR activo. A su vez, Grb2 recluta el factor SOS (del inglés, *Son of Sevenless*) mediante su dominio SH3, que resulta activo con la formación del complejo. SOS activo promueve la unión de ras a GTP (guanosín trifosfato), que lleva a la posterior activación de Raf, responsable de iniciar la cascada MAPK mediante la fosforilación y activación de MEK y ERK1/2 (quinasas reguladoras de señales extracelulares 1 y 2). Esta última serina/treonina quinasa se transloca al núcleo donde regula la actividad de de distintos factores de transcripción, entre los que encontramos *Elk-1*, *c-fos* o *c-myc*, así como genes específicos de proteínas reguladoras del ciclo celular (p.e. *ccdn1*) (ver (Kerkhoff and Rapp, 1998, Meloche and Pouyssegur, 2007, Mebratu and Tesfaigzi, 2009, Keshet and Seger, 2010, Roskoski, 2012) para revisión).

### Vía de señalización PI3K/AKT

La activación de EGFR tiene unos marcados efectos sobre el metabolismo de los fosfolípidos, incluyendo el reciclaje de fosfatidilinositoles. Entre las enzimas involucradas en estos mecanismos encontramos a PI3K, que puede interaccionar con receptores tirosina quinasa activos, como EGFR, y llevar a la síntesis de fosfatidilinositol trifosfato (PIP3). Una de las dianas mejor caracterizadas de PIP3 es AKT (o PKB). Su unión al lípido produce la translocación de esta quinasa a la membrana donde es fosforilada y activada por quinasas dependientes de fosfolípidos (PDK-1). AKT es uno de los principales mediadores de supervivencia celular y proliferación de PI3K mediante la activación del regulador de la síntesis proteica mTor (del inglés, *Mammalian target of rapamycin*) o de factores de transcripción (Pene et al., 2002). Recientemente también se ha descrito la interacción Ras-PI3K, por lo que esta puede ser otra vía de activación de AKT (Bellacosa et al., 1998, Hers et al., 2011).

## 2.2.4. PrP<sup>C</sup> en la regulación de los procesos de proliferación: antecedentes

El estudio de la expresión de PrP<sup>C</sup> durante el desarrollo o embriogénesis ha sido de especial importancia a la hora de asignar a PrP<sup>C</sup> un papel en procesos de proliferación celular (McKinley et al., 1987, Manson et al., 1992, Miele et al., 2003). Además, PrP<sup>C</sup> también parece ejercer este rol en poblaciones celulares de constante renovación presentes en zona proliferativas del organismo adulto (SVZ y giro dentado).

Ensayos de sobreexpresión y silenciamiento realizados *in vitro* e *in vivo* han mostrado cambios proliferativos asociados a PrP<sup>C</sup>. Parece ser que los niveles de la proteína en la membrana confieren una mayor o menor respuesta a factores de crecimiento según el tipo celular y el estadio de desarrollo, favoreciendo así su proliferación o su diferenciación (Kim et al., 2005, Steele et al., 2006, Lee and Baskakov, 2010).

En concordancia con estos datos, el análisis de expresión génica de modelos *in vivo* e *in vitro* *knockout* para *Prnp* ha revelado cambios de expresión de genes asociados tanto a ciclo celular (como la ciclina D1) como a mecanismos de señalización por factores de crecimiento, en comparación a la situación control (Sato et al., 2000, Liang et al., 2007). Es posible que estas alteraciones en la expresión génica derivada de la presencia/ausencia de PrP<sup>C</sup> puedan contribuir al control de la proliferación en determinados tipos celulares.

Las evidencias de la participación de PrP<sup>C</sup> en el proceso de proliferación se describen más ampliamente en la discusión de este trabajo.

## 2.3. PrP<sup>C</sup> EN LA DIFERENCIACIÓN Y LA NEURITOGÉNESIS

### 2.3.1. La diferenciación neuronal

El desarrollo del SNC implica la generación de células neuronales, astrocitos y oligodendrocitos a partir de las células madre presentes en el neuroepitelio. En los seres humanos, estas células proliferan para dar lugar a las llamadas células progenitoras, que posteriormente se convertirán en las primeras formas neuronales inmaduras (Gotz and Huttner, 2005). A pesar de tener un origen común al inicio del desarrollo, las neuronas presentan una alta diversidad morfológica y funcional. Esto es debido a que tras esta fase de proliferación, las neuronas migran a su ubicación definitiva y se diferencian, es decir, adquieren las características morfológicas y fisiológicas de la neurona madura (Barnes and Polleux, 2009, Tahirovic and Bradke, 2009). El proceso de diferenciación no solamente afecta a la citología celular, sino que también influye a nivel molecular.

En el transcurso del desarrollo embrionario, la regulación de los procesos de diferenciación de los precursores neuronales, al igual que los de proliferación, recae tanto en factores intrínsecos

al tipo celular (Kempermann et al., 1997) como en señales extracelulares (Gritti et al., 1999, Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002). Éstas últimas dependen de la localización espacio-temporal e incluyen factores de crecimiento, moléculas de señalización y proteínas de matriz extracelular (Cheng and Poo, 2012).

Hasta el momento se han descrito más de 50 tipos neuronales distintos, aunque todos comparten algunos rasgos característicos comunes que las diferencian de las células de otros tejidos. Son células típicamente polarizadas y sus funciones se encuentran compartimentalizadas – cuerpo neuronal, dendritas, axón y terminal sináptico – para facilitar el procesamiento de las señales eléctricas (Barnes and Polleux, 2009, Tahirovic and Bradke, 2009). El cuerpo celular, contiene el núcleo y las organelas necesarias para la síntesis proteica y ocupa menos de una décima parte del volumen neuronal total. Las dendritas, que se originan del cuerpo neuronal, son estructuras altamente ramificadas y especializadas para recibir el estímulo eléctrico proveniente de otras neuronas. Finalmente, el axón permite la propagación de este estímulo en largas distancias, hacia el terminal sináptico, donde contacta con la neurona diana para la transmisión del potencial de acción. La excitabilidad de estas células también es un rasgo característico y diferencial de ellas (ver (Kandel, 2000, Alberts et al., 2002, Berridge, 2012) para revisión).

### **2.3.2. El citoesqueleto neuronal**

El mayor determinante intrínseco de la morfología y polaridad neuronal es el citoesqueleto (Barnes and Polleux, 2009, Tahirovic and Bradke, 2009), un elemento clave no solo para la rotura de la simetría neuronal sino también para el tráfico selectivo de componentes celulares durante la neuritogénesis (Witte and Bradke, 2008, Fletcher and Mullins, 2010). Constituye aproximadamente el 25% de las proteínas totales de una neurona y engloba principalmente tres estructuras filamentosas: i) los microtúbulos (MTs), ii) los neurofilamentos (NFs) y iii) los microfilamentos de actina (MFs), cada una con una composición, estructura, organización y función característica.

La dinámica del citoesqueleto está finamente regulada por un gran número de proteínas y moléculas asociadas, que responden acorde con las señales procedentes del entorno extracelular. En este trabajo nos vamos a centrar en el rol del citoesqueleto de actina en la formación de filopodios (ver (da Silva and Dotti, 2002, Mattila and Lappalainen, 2008) para revisión) como paso inicial de la neuritogénesis.

#### **El citoesqueleto de actina en la formación de filopodios**

Los MFs son estructuras altamente dinámicas cuya polimerización y despolimerización está regulada por una gran variedad de proteínas, que incluyen motores de miosina, proteínas de anclaje a membrana e incluso proteínas reguladoras GTPasa, entre muchas otras (Lee and Dominguez, 2010). Se localizan principalmente en las regiones corticales, cerca de la membrana plasmática (Hitt and Luna, 1994), concentradas en el terminal presináptico, las espinas dendríticas y los conos de crecimiento (Sobue, 1993). En la mayoría de circunstancias, se encuentran dispersos formando oligómeros de pequeño tamaño. Sin embargo, durante la

formación de filopodios y lamelipodios a nivel del cono de crecimiento, se produce el acúmulo de MFs más largos en regiones concretas de la membrana (Mattila and Lappalainen, 2008). A su vez, la organización de los microfilamentos de actina en estos dos tipos de protrusiones es muy diferente. Mientras los filopodios son proyecciones citoplasmáticas delgadas (0.1-0.3  $\mu\text{m}$ ), en forma de espina y formadas por filamentos paralelos de F-actina (Mattila and Lappalainen, 2008), los lamelipodios son prolongaciones finas (0.1-0.2  $\mu\text{m}$ ) y planas de la membrana, transitorias, y formadas por una red entrelazada de filamentos (Dent E, 2011). Ambas actúan como sensores del entorno extracelular (Cheng and Poo, 2012) además de ser el motor de la migración, adhesión y la motilidad celular (Kater and Rehder, 1995).

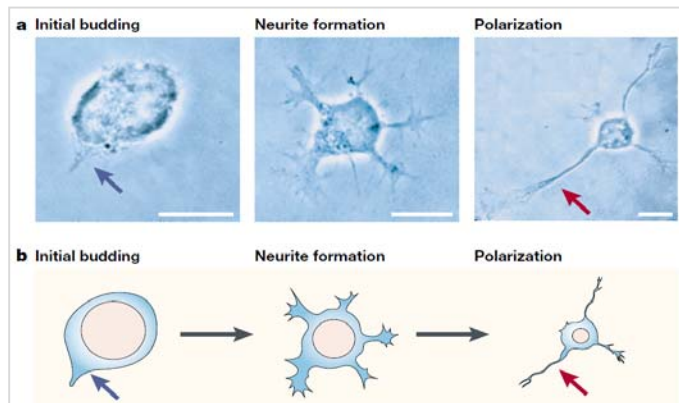
### **La neuritogénesis: del filopodio a la neurita**

La protrusión de filopodios y lamelipodios de la membrana neuronal supone el primer paso para la extensión de neuritas y la formación de las estructuras sinápticas (Sobue, 1993, Kater and Rehder, 1995) propias de la neuritogénesis. Este proceso dinámico, asociado a la diferenciación neuronal, permite que los precursores neuronales esféricos, que ya han migrado a su ubicación definitiva, generen estructuras dendríticas y axonales para la integración y transmisión de señales sinápticas (da Silva and Dotti, 2002). Parece claro que la comunicación entre la célula y el entorno extracelular determina el número, morfología, características, orientación y velocidad de crecimiento de las primeras neuritas, permitiendo la rotura de la esfera neuronal. Asimismo, el control espacio-temporal de este proceso es esencial para la correcta conectividad neuronal y, consecuentemente, para la función cerebral.

A pesar de la gran variabilidad de formas neuronales presentes en el cerebro en desarrollo, el proceso de extensión y elongación de un axón o dendrita en todas ellas se puede dividir en tres fases: i) la formación de protrusiones en la membrana en forma de filopodios y lamelipodios, ii) el movimiento del citoplasma (MTs y organelas) al nuevo espacio que se genera a medida que se forma la neurita (del inglés, *engorgement*) y iii) la consolidación de la neurita en una dendrita o una estructura migratoria polarizada que constituye el axón (Dent et al., 2011) (Figura 11). Este axón, que suele crecer largas distancias en busca de su célula diana, requiere también de la formación de una estructura altamente especializada, denominada cono de crecimiento axonal, que guía su elongación hasta el establecimiento del contacto sináptico. La diferenciación neuronal finaliza con la síntesis adecuada de neurotransmisores y receptores sinápticos, así como la muerte celular de aquellas neuronas que hayan generado sinapsis erróneas (da Silva and Dotti, 2002).

Los múltiples ensayos realizados *in vitro* para el estudio de la diferenciación neuronal, muchos de ellos sobre cultivos primarios de hipocampo, han permitido reproducir, en cierta medida, las fases de este proceso y determinar los mecanismos moleculares que guían la polarización neuronal (Goslin and Banker, 1989). Se ha descrito que la especificación del axón de entre todas las neuritas generadas así como el proceso de guía y elongación axonal, está regulada tanto por factores genéticos intrínsecos de la neurona como por señales extracelulares. Entre estas últimas encontramos señales cíclicas de elongación y retracción, ya sean factores difusibles (p.e. netrinas, semaforinas o neurotrofinas, entre otras) o elementos de la matriz extracelular (p.e. laminina o colágeno) (Cheng and Poo, 2012). Estas moléculas actúan sobre

elementos de membrana que llevan a la activación de vías de señalización intracelular como PI3K, AKT o GSK3 $\beta$ , entre otras. Estas vías regulan a su vez la dinámica del citoesqueleto de actina, el tráfico de proteínas en el interior de la célula, los mecanismos de adhesión celular y la vía endocítica para el reciclaje de la membrana celular, entre otros procesos (Arimura and Kaibuchi, 2007, Barnes and Polleux, 2009).



**Figura 11. Fases de la neuritogénesis.**

a) Imágenes de contraste de fases de los estadios iniciales de la neuritogénesis en cultivos neuronales de hipocampo. La esfera neuronal se rompe en forma de protrusiones localizadas (flecha azul), de las cuales se inicia la formación de neuritas. b) Representación esquemática de los pasos sucesivos que llevan al crecimiento neurítico y la formación del axón (flecha roja) y las dendritas a partir de la aparición inicial de protrusiones en membrana (flecha azul). Adaptado de (da Silva and Dotti, 2002).

Se conoce que la dinámica del citoesqueleto de actina durante el proceso de neuritogénesis está orquestada principalmente por las pequeñas GTPAsas de la superfamilia Rho, bajo la influencia de las vías de señalización mencionadas anteriormente. A continuación entraremos en detalle en la participación de estas proteínas en el proceso inicial de la neuritogénesis, concretamente durante la formación de filopodios.

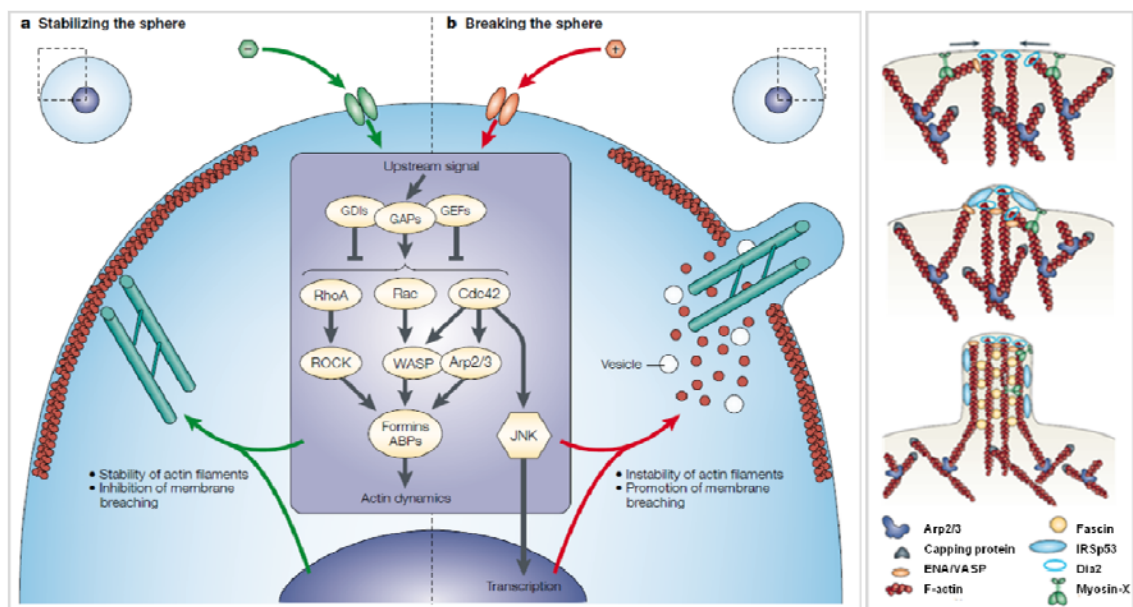
### El papel de las RhoGTPAsas en la formación de filopodios

Las pequeñas GTPAsas de la superfamilia Rho son interruptores moleculares intracelulares que ciclan entre su forma activa (unida a GTP) y su forma inactiva (unida a guanosina difosfato o GDP) en respuesta a la acción de factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs), proteínas activadoras de GTPAsas (GAPs) o inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDIs). Estas proteínas se encuentran íntimamente ligadas al citoesqueleto, regulando la morfología y dinámica celular (Luo, 2000, Ridley, 2006, Arimura and Kaibuchi, 2007). Entre las RhoGTPAsas más estudiadas encontramos Rac1 (del inglés *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*), implicada en la formación de lamelipodios, RhoA (del inglés *Ras-homologous member A*), relacionada con la formación de fibras de estrés, adhesiones focales y crecimiento neurítico y Cdc42 (del inglés *Cell-division cycle 42*), con un papel clave en la formación de filopodios y el establecimiento de la morfología del cono de crecimiento.

Cdc42 realiza su función mediante la regulación de la maquinaria de nucleación de los filamentos de actina, principalmente de la proteína asociada a actina 2/3 (Arp2/3) (Miki et al., 1998, Rohatgi et al., 1999). En esta vía, Cdc42 interacciona con N-WASP (del inglés, *Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein*), que se encuentra en su conformación autoinhibida y requiere de la unión de PIP2 (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*) a su dominio N-terminal para su activación. Una vez activa N-WASP, es capaz de interaccionar tanto con los

monómeros de actina como con el complejo Arp2/3. La unión del complejo Arp2/3 al extremo de un MF existente inicia el crecimiento de un filamento nuevo mediante un estricto control de la polimerización y despolimerización. Con ello se consigue mantener la estabilidad de los nuevos filamentos y dar lugar a la formación estructuras como son los filopodios. Se ha observado en cultivos primarios de células hipocámpicas que la falta de Cdc42 produce defectos en el citoesqueleto de actina suficientes como para bloquear la formación de filopodios, y consecuentemente la formación del axón (Garvalov et al., 2007).

RhoA también influye indirectamente en este proceso a través de la modulación de la estabilidad del citoesqueleto de actina a través de la activación secuencial de la quinasa asociada a Rho (ROCK) y la quinasa LIM1 (LIMK1). Esta última, a su vez, actúa sobre la ADF/Cofilina produciendo la despolimerización de filamentos de actina (Da Silva et al., 2003).



**Figura 12. El citoesqueleto de actina en la formación de filopodios.** La inducción de los cambios morfológicos que dan lugar a la formación de filopodios y posteriormente neuritas depende de señales extracelulares que dan lugar a la activación/inhibición de proteínas reguladoras (GDIs, GAPs y GEFs) y vías de señalización (RhoA, Rac y Cdc42) asociadas al citoesqueleto de actina. Esta señalización actúa sobre proteínas de unión a actina (ABPs) modulando la dinámica de los MFs. a) Cuando se requiere la estabilización de la membrana, la célula recibe señales inhibitorias de la diferenciación. b) Cuando se requiere de la formación neurítica, el citoesqueleto de actina se desestabiliza y se reorganiza. La participación de los complejos moleculares asociados a actina permite la formación del filopodio (derecha). Primero, las proteínas Dia2 y ENA/VASP, con la ayuda de los motores de miosina, llevan a cabo la elongación de los extremos libres de los MFs. Seguidamente, proteínas adaptadoras como IRSp53 permiten la deformación de la membrana y finalmente, la incorporación de proteínas de *cross-linking* como la filamina dan rigidez a los MFs a medida que se produce la elongación de la estructura. *Modificado de (da Silva and Dotti, 2002, Mattila and Lappalainen, 2008).*

Los cambios en el citoesqueleto que pueden desencadenar las RhoGTPasas en respuesta a la estimulación de receptores de superficie requieren de la formación simultánea y correcto funcionamiento de complejos multimoleculares, que incluyen tanto proteínas de soporte (p.e. Dia2) como proteínas de unión a actina. Éstas últimas controlan la organización del citoesqueleto e incluyen: i) proteínas de anclaje a la membrana (Ena/Mena/VASP), ii)

proteínas nucleadoras de actina (Arp2/3), iii) proteínas de unión o *cross-linking* (filamina o fascina), iv) proteínas de ensamblaje y desensamblaje de filamentos de actina (gelsolina, profilina), v) proteínas de secuestro de monómeros de actina (timosina-β4) y vi) proteínas despolimerizadoras de actina (ADF/cofilina) (revisado en (Mattila and Lappalainen, 2008, Dent et al., 2011)) (Figura 12).

La transfección de mutantes dominantes negativos o mutantes constitutivamente activos de las RhoGTPasas en diferentes tipos celulares así como la sobreexpresión/inhibición de proteínas asociadas han sido muy útiles en el estudio del crecimiento dendrítico y axonal (Threadgill et al., 1997, Garvalov et al., 2007).

### 2.3.3. PrP<sup>C</sup> en la neuritogénesis: antecedentes

La posible implicación de PrP<sup>C</sup> en mecanismos de diferenciación neuronal no fue inicialmente observada con la generación del animal *knockout*. Las diferentes cepas de ratón generadas no parecían mostrar alteraciones en el desarrollo embrionario ni problemas de supervivencia (Bueler et al., 1992). Sin embargo, los niveles incrementales de mRNA y proteína descritos, desde el estadio embrionario E7.5 hasta P20 aproximadamente, dejaban entrever que PrP<sup>C</sup> participaba en el desarrollo del SNC (Lazarini et al., 1991). La proteína priónica se expresaba en precursores tanto neuronales (Kim et al., 2005, Steele et al., 2006) como gliales (Bribian et al., 2012) y parecía actuar favoreciendo la diferenciación celular. No obstante, PrP<sup>C</sup> parecía tener el efecto opuesto sobre las células indiferenciadas en el adulto (Steele et al., 2006).

En paralelo a estos estudios, se han identificado ligandos de interacción con PrP<sup>C</sup>, como la laminina, el precursor del receptor de la laminina (Graner et al., 2000a) o NCAM (Schmitt-Ulms et al., 2001, Santuccion et al., 2005). Estos ligandos están implicados en mecanismos de neuritogénesis, por lo que su interacción con la proteína priónica puede ser importante para la estabilidad sináptica y el desarrollo y plasticidad neuronal (Graner E, 2000, Santuccion A, 2005). Asimismo, algunos estudios también han sugerido un papel de PrP<sup>C</sup> en la regulación de la dinámica de las adhesiones focales (FA) durante la diferenciación neuronal. Las FA son complejos proteicos de membrana a través de los cuales el citoesqueleto de una célula conecta con la matriz extracelular. Parece ser que PrP<sup>C</sup> está presente en estas estructuras de membrana en asociación a las proteínas reggie/flotilina (Schrock Y, 2009; Alleaume-Butaux A, 2013).

Estas aproximaciones, junto con ensayos de sobreexpresión (Pantera et al., 2009, Watanabe et al., 2012) o silenciamiento de PrP<sup>C</sup> (Loubet et al., 2012) han permitido describir el rol de la proteína priónica en la neuritogénesis (Alleaume-Butaux et al., 2013).

A estos datos se les suman otras evidencias presentadas en el apartado de discusión de este trabajo.

## 2.4. PrP<sup>C</sup>: FUNCIÓN SINÁPTICA Y EXCITABILIDAD NEURONAL

### 2.4.1. La sinapsis neuronal

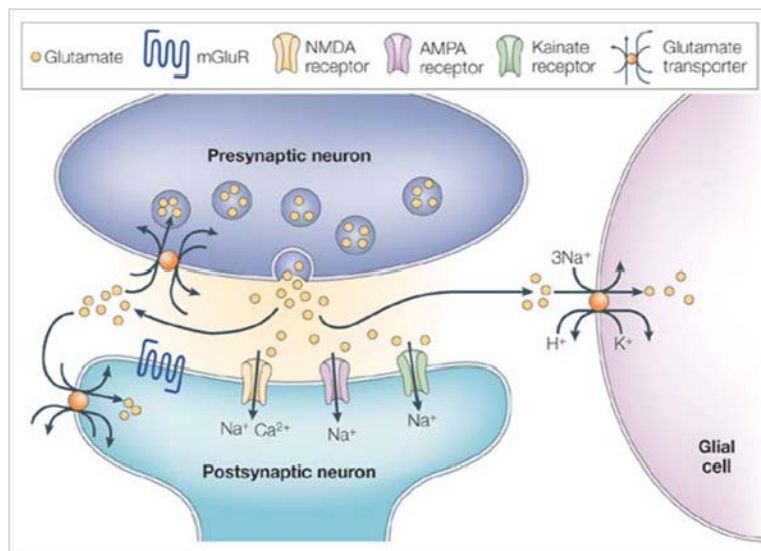
En el SNC, la sinapsis se define como una región de contacto especializado entre neuronas que permite la transmisión de señales eléctricas (iones) o químicas (neurotransmisores) entre ellas y la propagación del impulso nervioso. La sinapsis mediada por neurotransmisores se produce en tres etapas: 1) la llegada de un potencial de acción al terminal axonal produce la despolarización de la membrana, la entrada masiva de calcio por canales dependientes de voltaje y la consecuente liberación de neurotransmisores al espacio sináptico, 2) el neurotransmisor difunde por la hendidura sináptica hasta interactuar con receptores de membrana postsinápticos y 3) la unión ligando-receptor produce cambios en la membrana postsináptica que llevan a la generación de potenciales de acción excitatorios postsinápticos o EPSPs (si hay despolarización) e inhibitorios o IPSPs (si hay hiperpolarización) (ver (Kandel, 2000, Berridge, 2012) para revisión).

La neurotransmisión en el SNC depende de la maquinaria molecular presente en la sinapsis. Alteraciones en su funcionamiento son la causa de muchas patologías cerebrales entre las que encontramos la AD o el Parkinson (Palop et al., 2006).

### 2.4.2. El glutamato y la sinapsis glutamatérgica

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el SNC de los mamíferos (Platt, 2007). Además de su papel como aminoácido excitatorio también presenta un rol en la plasticidad sináptica y la potenciación neuronal a largo plazo (LTP), que es la base de los procesos de aprendizaje y memoria (McEntee and Crook, 1993, Meldrum, 2000). Aunque el glutamato es un elemento esencial en el mantenimiento del SNC, su activación excesiva puede convertirlo en una potente neurotoxina (Olney, 1969) cuya excitotoxicidad está implicada en la patogénesis de muchas enfermedades neurológicas como el infarto (Arundine and Tymianski, 2004), la esclerosis lateral amiotrófica (Pitt et al., 2000) o la epilepsia (Chapman, 2000).

El glutamato, que está distribuido por todo el cerebro, participa en una gran cantidad de procesos metabólicos. De hecho, más del 70% de las sinapsis excitatorias del SNC utilizan este aminoácido como neurotransmisor (Meldrum, 2000). El glutamato, una vez sintetizado, es introducido en las vesículas presinápticas desde las cuales se libera al terminal sináptico vía un mecanismo dependiente de calcio ( $Ca^{2+}$ ) y voltaje. Allí puede o bien interactuar con sus correspondientes receptores de glutamato (GluRs) situados tanto a nivel presináptico como postsináptico (Nakanishi, 1992) o bien ser activamente rescatado mediante un transportador de glutamato glial o neuronal (Danbolt, 2001) para regular su concentración. Este glutamato internalizado, se metaboliza a sus precursores (la glutamina y el  $\alpha$ -ketoglutarato) en las células gliales, los cuales son liberados al terminal sináptico para la re-síntesis del neurotransmisor (Daikhin and Yudkoff, 2000). Por otro lado, la activación de receptores postsinápticos lleva a la apertura de canales iónicos que constituye una señal química, de corta duración, que se convierte en un EPSP (Meldrum, 2000, Platt, 2007, Niciu et al., 2012) (Figura 13).



**Figura 13. La sinapsis glutamatérgica.** El glutamato liberado al terminal sináptico actúa a nivel postsináptico sobre receptores AMPA, NMDA, KA y receptores metabotrópicos (mGluRs), dando lugar a la generación de un potencial excitatorio. La acción del glutamato en la sinapsis finaliza con la reducción de su concentración por difusión o por recaptación mediante transportadores en células gliales adyacentes o en las mismas neuronas pre- o postsináptica. *Adaptado de (Attwell and Gibb, 2005) .*

## Los receptores de glutamato

El glutamato, así como sus agonistas exógenos (p.e. NMDA y KA), actúa sobre diferentes receptores de membrana se clasifican en receptores ionotrópicos (iGluRs) (Dingledine et al., 1999) y receptores metabotrópicos (mGluRs) (Pin and Duvoisin, 1995) según si constituyen un canal iónico o van asociados a segundos mensajeros, respectivamente.

### Receptores ionotrópicos de glutamato (iGluRs)

Son receptores que forman un canal catiónico que permite el flujo de iones de sodio ( $\text{Na}^+$ ), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y potasio ( $\text{K}^+$ ) tras la unión de su ligando. Se han identificado tres familias de iGluRs según su estructura y farmacología (Nakanishi, 1992). Su denominación hace referencia al agonista farmacológico capaz de unirse con mayor especificidad a ellos y abrir selectivamente el canal: receptores de N-metil-D-aspartato (NMDAR), receptores de  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) y receptores de ácido kaínico (KAR).

A nivel molecular, los iGluRs son proteínas integrales de membrana constituidas por diferentes subunidades que forman tetrámeros o pentámeros (Rosenmund et al., 1998, Madden, 2002), y cuya combinación determina las propiedades biofísicas y la farmacología del receptor. Se han identificado alrededor de 28 subunidades distintas, diferencialmente expresadas en el SNC. Cada subunidad consta de una cadena polipeptídica de aproximadamente 900 aminoácidos ( $\approx 100$  kDa) que da lugar a una proteína con los siguientes dominios: i) un extremo N-terminal en la región extracelular; ii) tres dominios transmembrana (M1, M3 y M4), iii) un *loop* (M2) incluido en la membrana por su cara citoplasmática y iv) un extremo C-terminal en la región intracelular (Figura 14), que permite la interacción del receptor con proteínas PSD (*postsynaptic density*). Las PSD están constituidas por más de 100 proteínas, que incluyen receptores, canales iónicos, moléculas de adhesión y proteínas del citoesqueleto, entre otras, siendo PSD-95 una de las más abundantes. Su función principal es la de mantener la estructura y organización de los elementos postsinápticos, asociándolos a las diferentes vías de

señalización y asegurando el correcto funcionamiento de la transmisión sináptica (Boeckers, 2006, Kim and Sheng, 2009).

- **Receptores de NMDA (NMDARs):**

Los NMDARs son estructuras tetra-heteroméricas permeables a iones de Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup> (Monyer et al., 1992) que han sido extensamente estudiados debido al gran número de ligandos selectivos descritos, tanto agonistas como antagonistas (p.e. MK801 o ketamina). Constituyen canales dependientes de voltaje que, en situación fisiológica de reposo, se encuentran bloqueados por magnesio (Mg<sup>2+</sup>) (Nowak et al., 1984). Cuando éste se elimina, el canal se activa permitiendo el influjo de calcio y dando lugar a la despolarización postsináptica y la generación del potencial de acción. Estos canales presentan un tiempo de apertura largo y una cinética de activación relativamente lenta (Lester et al., 1990).

A nivel estructural estos receptores están formados por subunidades NR1, NR2 (isoformas NR2A-NR2D) y, en algunos casos, subunidades NR3 (NR3A y NR3B) (Madden, 2002). La subunidad NR2, que se expresa según patrones espacio temporales en el cerebro, presenta los dos lugares de unión de ligando, mientras que en la NR1, presente en todas las neuronas, contiene el sitio de unión de glicina, co-agonista imprescindible para la actividad del receptor (Watanabe et al., 1992). En ausencia de glicina, la unión de glutamato al receptor no resulta en la apertura del canal (Johnson and Ascher, 1987). La alta permeabilidad a calcio de los NMDARs hace que éstos tengan un papel importante en procesos de muerte celular y excitotoxicidad.

- **Receptores AMPA (AMPAARs):**

Los iGluRs con afinidad para el agonista AMPA (Gouaux, 2004) están ampliamente pero diferencialmente distribuidos por el cerebro siendo mayoritaria su expresión en el hipocampo y en las capas superficiales de la corteza y putamen (Martin et al., 1993). Son responsables, junto con los KARs, de la transmisión excitatoria más rápida del SNC y también se han relacionado con mecanismos de plasticidad sináptica.

A nivel estructural, se encuentran en forma de homo- o hetero-oligómeros compuestos de subunidades denominadas GluRA-GluRD (o GluR1-GluR4) cuya combinación determina las propiedades funcionales del receptor (p.e. la permeabilidad a Ca<sup>2+</sup>) (Jonas and Burnashev, 1995). Los AMPARs presentan dos sitios de unión a ligando, los cuales deben estar ocupados para que se dé el cambio conformacional necesario para la apertura del canal. La entrada de cationes (principalmente Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>) da lugar a cambios locales en el potencial de membrana que desencadenan un EPSP.

- **Receptores de KA (KARs):**

Los KARs no solo median la transmisión de señales excitatorias sino que también regulan la liberación de neurotransmisores a nivel presináptico. Generan corrientes eléctricas menores (Castillo et al., 1997), más lentas pero de mayor duración que los AMPARs, y parecen estar

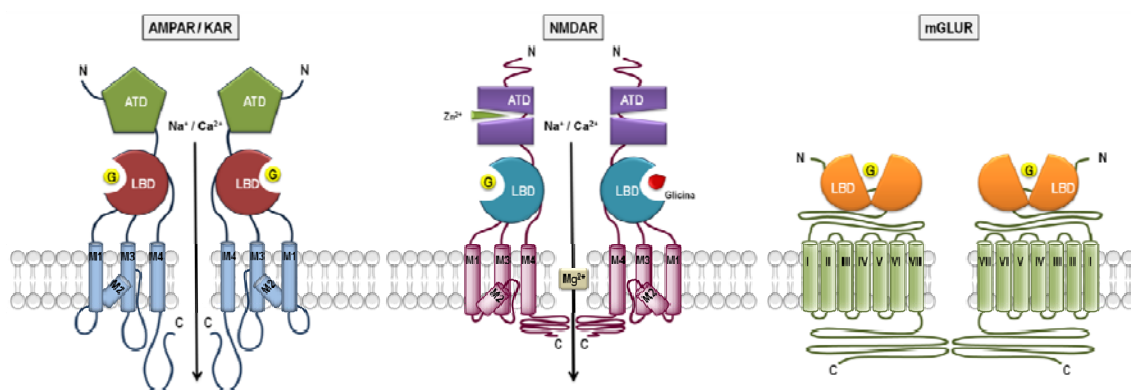
involucrados en fenómenos de plasticidad a corto y largo plazo así como en la regulación de la señalización sináptica (Lerma, 2003).

Hasta el momento, se han clonado cinco subunidades diferentes del receptor, divididas en dos subfamilias. La primera está compuesta por las subunidades GluR5-GluR7 (o GRIK1-3), que muestran un alto grado de homología entre ellas y son capaces de formar canales homoméricos. GluR6 (o GRIK2) ha sido ampliamente estudiada por su papel en la excitotoxicidad por KA a través de su interacción con MLK3 (del inglés, *mixed-lineage protein kinase 3*) y PSD-95 (Savinainen et al., 2001, Tian et al., 2005, Hu et al., 2009, Yu et al., 2009). La segunda familia, formada por KA1 y KA2 (o GRIK4-5), presenta mucha más afinidad al agonista pero no son capaces de formar canales homoméricos. Se conoce, a partir de ensayos de hibridación in situ, que estas subunidades se expresan de manera ubicua en el SNC, aunque el patrón de expresión de cada subunidad es heterogéneo (Bahn et al., 1994).

### Receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs)

Pertenecen a la superfamilia de receptores unidos a proteínas-G (proteínas que unen GTP) que se divide en tres grupos distintos (Grupo I: mGluR1, mGluR5; Grupo II: mGluR2, mGluR3; Grupo III: mGluR4, mGluR6-8) en función de su sistema de segundo mensajero, su homología y su farmacología. A diferencia de los iGluR, éstos están formados por polipéptidos que presentan siete dominios transmembrana (Figura 14). La unión de un agonista a uno de estos receptores da lugar a cambios en los niveles de segundos mensajeros (adenosín monofosfato cíclico (cAMP) o diacilglicerol (DAG)) mediados por la adenilato ciclasa (AC) y la fosfolipasa C (PLC) así como por la liberación de  $Ca^{2+}$  de los reservorios intracelulares (ver (Pin and Duvoisin, 1995) para revisión).

La función de los mGluRs se basa en regular la excitabilidad neuronal y la liberación de neurotransmisores (Doherty and Dingledine, 2002) y se caracterizan por mediar respuestas sinápticas más lentas en comparación a los iGluR.



**Figura 14. Estructura de los receptores de glutamato.** a-b) Representación de heterómeros de los receptores ionotrópicos AMPA / KA (a) y NMDAR (b). Cada subunidad consta de un dominio amino-terminal (ATD) y un dominio de unión al ligando (LBD) seguidos de cuatro dominios transmembrana y un extremo flexible carboxi-terminal. El receptor de NMDA consta de un sitio de unión a glicina y, en estado inactivo, se encuentra bloqueado por  $Mg^{2+}$ . c) Las subunidades de los receptores metabotrópicos constan de un dominio de unión al ligando, seguido de siete dominios transmembrana y un extremo C-terminal intracelular que permite su asociación a segundos mensajeros.

### 2.4.3. Excitabilidad neuronal y excitotoxicidad

#### La excitabilidad intrínseca de las neuronas

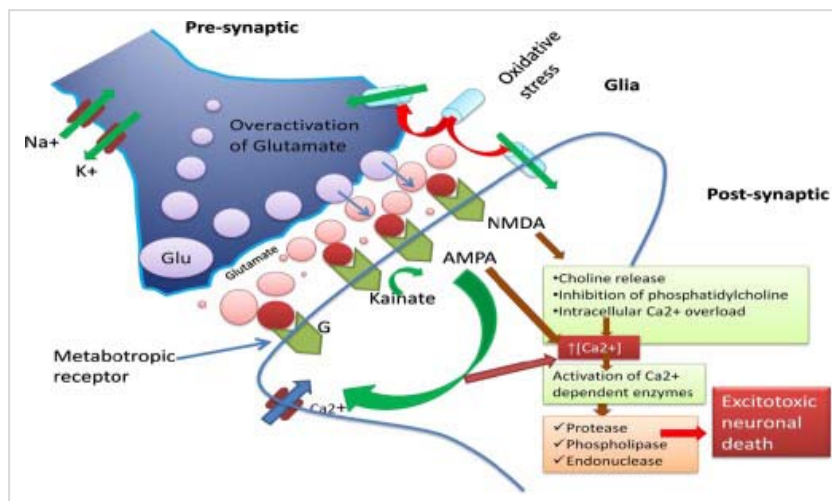
Una excitabilidad neuronal apropiada y una correcta transmisión sináptica son dos factores clave para el buen funcionamiento del SNC (Kandel, 2000). La excitabilidad neuronal depende de las condiciones en que se encuentra la célula en el momento de su estimulación. En situación basal, el compartimento intracelular de la neurona se encuentra cargado negativamente en relación al espacio extracelular. Cuando los canales iónicos dependientes de voltaje se abren permiten la difusión de iones entre ambos compartimentos, modificando el potencial de membrana (Rutecki, 1992). Una neurona debe integrar las múltiples señales excitatorias e inhibitorias que recibe de manera que si el sumatorio da lugar a una despolarización por encima del umbral de voltaje, se generará el potencial de acción. Este potencial, que se produce tras un breve influjo de Na<sup>+</sup> seguido de un eflujo de K<sup>+</sup>, es el principal mecanismo para la transmisión sináptica entre neuronas. El número de potenciales de acción y la forma de éstos determinarán la cantidad de calcio que entra al terminal presináptico y la eficacia de la transmisión (ver (Berridge, 2012) para revisión). Cualquier cambio en la excitabilidad de la neurona dará lugar a cambios en su función.

#### Mecanismos de excitotoxicidad celular

El concepto de excitotoxicidad fue propuesto por el Dr. Olney en 1969 (Olney, 1969) para referirse a los efectos tóxicos derivados de una estimulación excesiva o prolongada de los receptores de glutamato por aminoácidos excitatorios (EAAs). Se considera uno de los principales mecanismos de muerte celular en un gran número de enfermedades isquémicas y neurodegenerativas que afectan al SNC (Dong et al., 2009, Mehta et al., 2013). A día de hoy se han realizado experimentos *in vitro* e *in vivo* de administración de EAAs en el sistema nervioso que han permitido esclarecer los múltiples efectos adversos de la sobreestimulación glutamatérgica (ver (Dong et al., 2009, Wang and Qin, 2010) para revisión).

La exposición prolongada a glutamato produce el flujo excesivo de iones de calcio al espacio intracelular y también a organelas sensibles como el RE o la mitocondria (Berliocchi et al., 2005). Este incremento en la concentración de Ca<sup>2+</sup> lleva a la activación mantenida de proteasas dependientes de calcio (p.e. calpaínas y caspasas) y quinasas (p.e. la proteína quinasa A (PKA), la calcio calmodulina quinasa (CaMKII), proteínas tirosina quinasa (PTK) o MAPK) (Mehta et al., 2013). Estas quinasas inician una cascada de eventos que da lugar a la activación de vías de señalización (Finkbeiner and Greenberg, 1996, Wang and Qin, 2010) (Aarts and Tymianski, 2004) y factores de transcripción de genes de respuesta temprana (p.e. proteína activadora-1 (AP-1)) implicados en procesos de muerte celular por necrosis, apoptosis o incluso autofagia (Martin et al., 1998, Wang and Qin, 2010). Estos eventos incluyen la despolarización de la membrana mitocondrial, la activación de la vía de las caspasas y el incremento en la producción de óxido nítrico (NO) y radicales libres (Lafon-Cazal et al., 1993, Yamauchi et al., 1998) (Figura 15).

Las estrategias terapéuticas destinadas a reducir la excitotoxicidad mediante antagonistas de los receptores o transportadores de glutamato han resultado ir asociados a gran cantidad de efectos secundarios. En consecuencia, se están investigando alternativas más específicas dirigidas a mecanismos concretos implicados en el desarrollo de la excitotoxicidad. Entre ellos encontramos agentes antioxidantes, bloqueantes o neutralizantes del flujo de calcio intracelular o bloqueantes de la señalización de muerte celular, entre otros (Meldrum, 2000).



**Figura 15. Mecanismo de excitotoxicidad.** La sobreestimulación de los receptores de glutamato en el terminal postsináptico da lugar a una cascada de eventos que incrementan la concentración de calcio intracelular. Los niveles elevados de Ca<sup>2+</sup> suponen la activación de enzimas dependientes de este catión y la consecuente activación de vías de muerte celular por excitotoxicidad. Fuente: (Mehta et al., 2013).

#### 2.4.4. Función de PrP<sup>C</sup> en la sinapsis: antecedentes

Existen varias evidencias que sugieren que PrP<sup>C</sup> puede estar jugando un papel importante en la sinapsis neuronal mediante la regulación de los receptores de glutamato y, consecuentemente, la regulación de la excitabilidad neuronal. Las principales se resumen a continuación:

1. La degeneración sináptica es una de las principales características neuropatológicas de la enfermedad priónica (Clinton et al., 1993).
2. PrP<sup>C</sup> se localiza en la sinapsis, formando parte de complejos de señalización junto a los receptores y canales iónicos de las membranas pre y post-sinápticas (Fournier et al., 1995, Fournier et al., 2000, Moya et al., 2000, Fournier, 2008).
3. PrP<sup>C</sup> es capaz de unir cobre a través de los *octarepeats*, lo que le involucra en el mantenimiento del estado de oxidación-reducción y la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> en el terminal sináptico (Vassallo and Herms, 2003).

4. PrP<sup>C</sup> participa en la liberación de neurotransmisores en la sinapsis mediante su interacción con proteínas asociadas como la sinapsina Ib o la sinaptofisina (Keshet et al., 2000, Spielhauer and Schatzl, 2001).
5. PrP<sup>C</sup> es capaz de modular la actividad de diferentes tipos de receptores de glutamato. Se ha descrito que PrP<sup>C</sup> puede estar regulando la expresión de subunidades de receptores AMPA/KA (Rangel et al., 2007) además de interactuar con la subunidad NR2D (Khosravani et al., 2008), GluR1/GluR2 (Watt NT, 2012) o mGluR1/5 (Beraldo et al., 2011) de los receptores de glutamato.
6. Tanto el ratón *Prnp-knockout* como el Tg20 presentan defectos electrofisiológicos en potenciación a largo plazo (LTP) y facilitación sináptica (Collinge et al., 1994, Maglio et al., 2004, Rangel et al., 2009).

Todos estos indicios, la mayoría descritos a partir de estudios *knockout in vivo e in vitro*, sugieren un papel importante de la proteína priónica celular en el mantenimiento de la función sináptica (Collinge et al., 1994, Brown, 2001). No hay que olvidar, que muchas de las otras funciones asociadas a PrP<sup>C</sup> (Figura 7), están íntimamente asociadas al rol sináptico de la proteína. Esto es debido a que PrP<sup>C</sup>, desde su ubicación en membrana, concretamente en las *rafts* lipídicos (Taylor and Hooper, 2006, Lewis and Hooper, 2011), actúa como una proteína transdutora de señales intracelulares a través de la modulación de vías principales de señalización (p.e. ERK1/2 o PI3K/AKT) (Hugel et al., 2004, Linden et al., 2008). Estas quinasas reguladas por PrP<sup>C</sup> actúan a su vez sobre múltiples dianas implicadas en gran diversidad de procesos celulares, algunos de ellos esenciales durante el proceso de neurogénesis y posterior formación y mantenimiento de los circuitos neuronales. No sorprende, por lo tanto, que la falta de PrP<sup>C</sup> en el animal *Prnp-knockout* produzca alteraciones funcionales en aquellas estructuras cerebrales en las que PrP<sup>C</sup> está expresada de forma preferente, como es el hipocampo y otras estructuras del sistema límbico. De ahí que PrP<sup>C</sup> se asocie a procesos de aprendizaje y consolidación de la memoria a corto y largo plazo (Criado et al., 2005) o al mantenimiento de los ritmos circadianos y el patrón del sueño (Tobler et al., 1996, Tobler et al., 1997, Huber et al., 1999).

### **Función neuroprotectora de PrP<sup>C</sup>**

Hemos mencionado anteriormente que alteraciones en la transmisión sináptica y la excitabilidad neuronal pueden dar lugar a muerte celular por excitotoxicidad. En consecuencia, si asumimos que PrP<sup>C</sup> tiene un rol en el mantenimiento de la integridad sináptica estamos indirectamente asociando a esta proteína una función neuroprotectora en el organismo (Chiarini et al., 2002, Roucou et al., 2003).

Una de las principales evidencias del rol neuroprotector de PrP<sup>C</sup> la encontramos en el ratón *Prnp-knockout*. Este animal transgénico carente de la proteína priónica presenta una susceptibilidad incrementada a estrés oxidativo (Brown et al., 2002) así como a fenómenos de excitotoxicidad derivados de tratamiento con agonistas de glutamato (p.e. KA (Walz et al., 1999, Rangel et al., 2007) o NMDA (Khosravani et al., 2008)). Este fenotipo va acompañado de

una reorganización de la arquitectura neuronal del hipocampo (Colling et al., 1997, Steele et al., 2007) para revisión).

Dejando de lado la posible toxicidad de formas truncadas (Baumann et al., 2007, Li et al., 2007a), transmembrana (Stewart et al., 2005) o citosólicas de PrP<sup>C</sup> (Ma et al., 2002), PrP<sup>C</sup> se ha visto también involucrada en mecanismos de supervivencia neuronal, lo que complementa las evidencias su función neuroprotectora.

Este rol en la supervivencia celular viene mediado por: i) su función antiapoptótica, suprimiendo la muerte celular mediada por Bax (Proteína X asociada a Bcl-2) (Bounhar et al., 2001); ii) su interacción con la proteína inducible por estrés (ST11) (Lopes et al., 2005) iii) su papel antioxidante (Brown and Besinger, 1998, Brown et al., 2002) o iv) la activación de la quinasa Fyn, asociada con mecanismos de supervivencia celular y proliferación (Mouillet-Richard et al., 2000), entre otros. Algunas de estas funciones serán detalladas en el apartado de discusión de este trabajo.

Este rol neuroprotector de PrP<sup>C</sup> sugiere que la disminución de sus niveles endógenos observada en las prionopatías produce una disminución de la neuroprotección dependiente de PrP<sup>C</sup> en el organismo. Tal y como propone la hipótesis de la pérdida de función, este hecho puede ser una de las múltiples causas que dan lugar al desarrollo de la patología priónica (Hetz et al., 2003).

#### **2.4.5. Alteraciones en la excitabilidad neuronal: la epilepsia**

Uno de los principales modelos experimentales utilizados en el estudio de la función neuroprotectora de PrP<sup>C</sup> es la epilepsia del lóbulo temporal o TLE. Esta patología, ha sido reproducida tanto *in vitro* como *in vivo*, ya sea mediante la administración de drogas epileptogénicas como el ácido kaínico (KA), NMDA o la pilocarpina, o mediante una estimulación eléctrica prolongada del cerebro, conocida como *kindling*. Estos modelos suelen reproducir el proceso fisiopatológico en tres fases: una fase inicial de crisis aguda derivada del daño cerebral producido, seguido de un periodo de latencia con ausencia de crisis y seguido de una fase crónica con presencia de crisis espontáneas recurrentes (García García et al., 2010)..

Actualmente, la TLE experimental también está siendo de gran utilidad para entender el rol de PrP<sup>C</sup> en la regulación de la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica.

#### **Introducción a la fisiopatología de la epilepsia**

Entre las enfermedades del SNC que cursan con excitotoxicidad encontramos la epilepsia, una patología cerebral caracterizada por la aparición de episodios o crisis epilépticas repetitivas resultantes de un desequilibrio entre los mecanismos excitatorios (transmisión glutamatérgica) e inhibitorios (transmisión gabaérgica) neuronales. Esta alteración en la comunicación neuronal, ya sea por una excitación excesiva o un déficit inhibitorio, resulta en descargas excitatorias sincronizadas, prolongadas y desordenadas de una o más poblaciones neuronales (ver (Engel, 1996, Dalby and Mody, 2001) para revisión).

Desde un punto de vista clínico, se conocen más de 40 tipos de epilepsia en los seres humanos. Se considera que la susceptibilidad genética está implicada al menos en un 30% de ellas (epilepsias idiopáticas), con mutaciones descritas en varios genes, entre los que se encuentra *Prnp* (Steinlein, 2004). El resto son epilepsias adquiridas (o epilepsias sintomáticas), resultantes de traumatismos cerebrales, tumores, enfermedades cerebro-vasculares, infecciones del SNC o trastornos metabólicos, entre otras (Delorenzo et al., 2005).

Hasta el momento, no se conocen con certeza los mecanismos y factores que transforman un cerebro normal en epiléptico. Sin embargo, a nivel experimental, se ha propuesto la participación de los siguientes factores: i) alteración de la actividad CaMKII; ii) peroxidación lipídica y formación de nitritos; iii) alteración de los niveles de acetilcolina; iv) estrés oxidativo en el hipocampo; v) cambios en el sistema histaminérgico; vi) reducción de neuropéptidos anticonvulsivos endógenos e incremento de los convulsionantes y vii) pérdida de la inhibición de las sinapsis gabaérgicas y aceleración de la internalización de los receptores GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) (Wasterlain et al., 2002, Freitas et al., 2004, Freitas et al., 2005, Lintunen et al., 2005, Singleton et al., 2005).

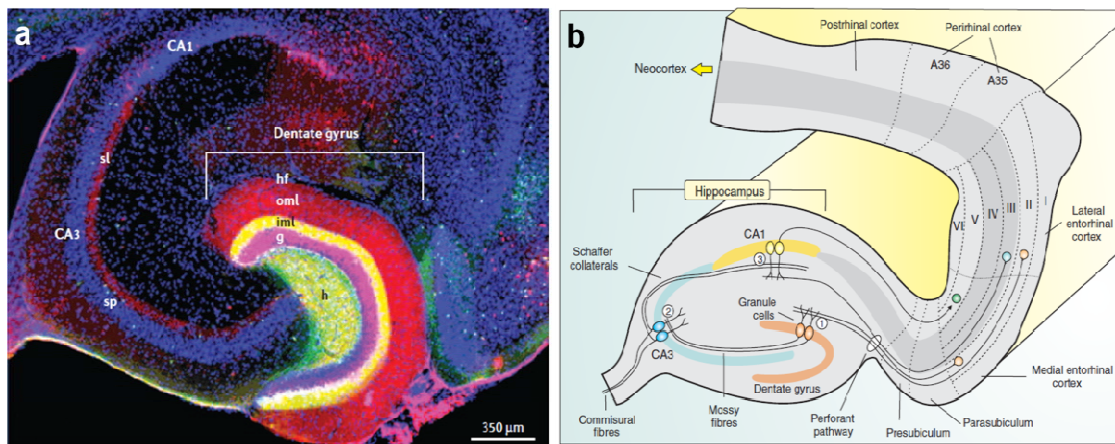
A nivel anatómico y celular, las regiones más susceptibles a generar un foco epiléptico son aquellas que están altamente interconectadas, reguladas por interneuronas de carácter inhibitorio, de citoarquitectura compleja y encargadas de procesar gran cantidad de información. Así, tanto el neocórtex, el hipocampo o la amígdala se presentan como las principales estructuras afectadas (Pastor et al., 2006).

### **El hipocampo como diana en los procesos epilépticos**

Tanto desde el punto electrofisiológico como anatomopatológico, el hipocampo es la estructura cerebral más estudiada en la epilepsia del lóbulo temporal o TLE, que es la principal y más predominante causa de epilepsia focal adquirida (ver (Engel, 1996, Pastor et al., 2006, Ono and Galanopoulou, 2012) para revisión) (Figura 16).

La esclerosis es la alteración más típica del hipocampo epiléptico, aunque existe cierta controversia sobre si ésta es la causa de la actividad epiléptica o la consecuencia de episodios epilépticos recurrentes. Se caracteriza por: i) una muerte neuronal extensa y gliosis principalmente a nivel de las regiones CA3 y CA1, el hilus del giro dentado y las capas superficiales de la corteza entorrinal (aunque también puede observarse en otros estratos del hipocampo) y ii) la reinervación de la capa supragranular del giro dentado por las fibras musgosas, favoreciendo la sincronización neuronal y amplificando las descargas resultantes de una crisis epiléptica (Scharfman et al., 2003). Estos circuitos reinervados son de naturaleza glutamatérgica y, según se ha descrito, van acompañados de incrementos en las subunidades NR1 y NR2 de los NMDARs (Mikuni et al., 2000) así como de la subunidad KA1 de los KARs (Hikiji et al., 1993), lo que sugiere una respuesta mayoritaria a través de estos receptores. Igualmente, se han detectado alteraciones en los niveles de la subunidad GluR2 del receptor AMPA en la región CA3, que se asocian a una mayor permeabilidad de  $\text{Ca}^{2+}$  (Friedman and Veliskova, 1998).

Hasta el día de hoy, las investigaciones se han centrado en esclarecer el rol del giro dentado en la fisiopatología de la epilepsia, ya que esta estructura es la ruta obligada de entrada de las descargas epilépticas al hipocampo a través del circuito trisináptico (vía perforante, fibras musgosas y fibras colaterales de Schaffer). Los resultados sugieren una alta reorganización dinámica de los circuitos hipocámpicos en estricta relación con la epileptogénesis. Esta remodelación incluye la desconexión glutamatérgica de una población de interneuronas del hilus que origina una desinhibición del giro dentado y la región CA3, causando la hiperexcitabilidad de las células granulares y facilitando la generación de descargas epilépticas (Sloviter, 1992).



**Figura 16. El hipocampo: estructura laminar y conexiones.** a) Visualización de las neuronas y proyecciones del hipocampo por combinación de técnicas inmunohistoquímicas. Las células musgosas del hilus (h) se marcan en verde por marcaje con calretinina. Sus dendritas hacen sinapsis con las células granulares del giro dentado (g) y sus axones proyectan sobre la capa molecular interna (im1) formando la proyección comisural. En la capa molecular externa (om1) termina, entre otras, la conexión procedente de la corteza entorrinal (vía perforante). Los cuerpos neuronales se marcan en azul (DAPI), y destacan la capa piramidal (sp) de la región CA1 y CA3 (células piramidales) y la capa granular del giro dentado (g). Estas células granulares también se marcan por calbindina en rojo, por lo que se muestran en este color sus dendritas, extendiéndose hacia la fisura hipocámpica (hf), y sus axones, las fibras musgosas, que atraviesan el hilus para contactar con las dendritas de las células piramidales de la región CA3 en el estrato *lucidum* (sl). Éstas últimas dirigen sus axones ramificados a las neuronas de la región CA1 (colaterales de Schaffer) b) Representación esquemática de las conexiones intrínsecas del hipocampo: vía perforante, fibras musgosas, fibras colaterales de Schaffer y fibras comisurales. Adaptado de (Berridge, 2012) y (Forster et al., 2006).

# OBJETIVOS

---





Hace ya varias décadas que PrP empezó a ser objeto de estudio. El impacto social que causó la epidemia de EEB en los años 70-80 situó esta proteína en el foco de atención como principal sospechosa y responsable del desarrollo de la enfermedad (Woolhouse and Anderson, 1997). Esta patología neurodegenerativa del SNC estaba resultando letal para el ganado, lo que suponía no solo importantes pérdidas económicas sino también una alarma social considerable al afectar la cadena alimentaria. La aparición de casos relacionados en humanos así como la similitud ya descrita con otras enfermedades como CJD, GSS o IFF, hizo evidente la necesidad de conocer y entender la fisiopatología de las EETs (Aguzzi et al., 2001).

Desde entonces y hasta el día de hoy, el camino no ha sido precisamente fácil. El descubrimiento del agente infeccioso por Stanley B. Prusiner (Prusiner, 1982) ya supuso una revolución *per se*. No solo se trataba de un agente de naturaleza proteica sino que, además, se trataba de una proteína endógena que adquiría patogenicidad como consecuencia de un cambio conformacional. Por si fuese poco, esta proteína podía replicarse en el huésped a expensas de la forma endógena, transmitirse por diferentes vías a otro organismo y propagar la enfermedad.

La generación de animales *knockout* para PrP<sup>C</sup> (Bueler et al., 1992, Manson et al., 1994, Steele et al., 2007) permitió dar un paso de gigante en la investigación de las EETs al observar que la transmisibilidad era totalmente dependiente de la presencia de la proteína endógena (Bueler et al., 1993). Este hecho dejaba entrever que el mecanismo patogénico que se estaba buscando era probablemente el resultado de la conversión de dos factores: 1) la pérdida de la función fisiológica de PrP<sup>C</sup> y 2) la neurotoxicidad derivada de la agregación de PrP<sup>SC</sup> en el SNC. Basándose pues en las hipótesis de pérdida o ganancia de función, la investigación sobre PrP<sup>C</sup> se dividió en dos líneas, una centrada en la búsqueda de la función fisiológica de PrP<sup>C</sup> y la otra en los mecanismos de infectividad y propagación de PrP<sup>SC</sup>.

Desde hace varios años, nuestro laboratorio ha utilizado diferentes modelos celulares y líneas de ratones transgénicos para estudiar el rol fisiológico de PrP durante el desarrollo y en el organismo adulto (Bribian et al., 2012), así como su relación con otras enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Gavin et al., 2008). En el momento de iniciar este trabajo, ya existían evidencias de un posible rol de PrP<sup>C</sup> en la regulación de mecanismos de proliferación y diferenciación celular (Steele et al., 2006, Liang et al., 2007, Morel et al., 2008) así como un papel citoprotector ante estímulos excitotóxicos (Rangel et al., 2007). Sin embargo, el cómo PrP<sup>C</sup> podía regular estos procesos celulares todavía era una cuestión sin responder.

En base a estos hechos, el principal objetivo planteado en esta Tesis Doctoral fue el de **determinar los mecanismos moleculares mediante los cuales PrP<sup>C</sup> podía estar ejerciendo una función neuroprotectora y reguladora del ciclo celular.**

Alcanzar este objetivo implicaba dirigir o enfocar nuestra línea de investigación a objetivos más específicos, los cuales se indican a continuación:

## Objetivos

---

- Objetivo 1.** **Analizar los resultados de perfil de expresión génica** descritos en diferentes modelos celulares y animales para determinar la implicación de PrP en diferentes procesos fisiológicos.
- Objetivo 2.** **Estudiar los cambios en proliferación y progresión del ciclo celular** en una línea de neuroblastoma (N2a) modificada para la expresión transitoria de PrP<sup>C</sup>.
- Objetivo 3.** **Identificar alteraciones en la morfología celular** asociados a la sobreexpresión o silenciamiento de la proteína priónica celular.
- Objetivo 4.** **Profundizar en el rol de PrP<sup>C</sup> como regulador de la transmisión sináptica y la excitabilidad neuronal** mediante modelos *in vivo* de epilepsia del lóbulo temporal (TLE).
- Objetivo 5.** **Describir los mecanismos moleculares mediante los cuales PrP<sup>C</sup> ejerce un papel neuroprotector** frente a excitotoxicidad por kainato (KA).

# RESULTADOS

---





La presente Tesis Doctoral, titulada “*La proteína priónica celular: análisis de su función neuroprotectora y reguladora del ciclo celular*”, se presenta como un compendio de las siguientes publicaciones:

### Capítulo I

Franc Llorens, Patricia Carulla, Ana Villa, Juan M. Torres, Puri Fortes, Isidre Ferrer y José Antonio del Río. **PrP<sup>C</sup> regulates epidermal growth factor receptor function and cell shape dynamics in Neuro2a cells.**

Manuscrito publicado en *The Journal of Neurochemistry*, 2013 May 2. Doi:10.1111/jnc. 12283. [Epub ahead of print]

### Capítulo II

Patricia Carulla, Ana Bribián, Alejandra Rangel, Rosalina Gavín, Isidro Ferrer, Carme Caelles, José Antonio del Río y Franc Llorens. **Neuroprotective role of PrP<sup>C</sup> against kainate-induced epileptic seizures and cell death depends on the modulation of JNK3 activation by GluR6/7–PSD-95 binding.** *Mol Biol Cell*. 2011 September 1; 22(17): 3041–3054.

Manuscrito publicado en *Molecular Biology of the Cell*, 2011 September 1; 22(17): 3041–3054.



## PrP<sup>C</sup> regula la función del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y la morfología celular en células Neuro2a.

Franc Llorens\*, Patricia Carulla\*, Ana Villa, Juan M. Torres, Puri Fortes, Isidre Ferrer & José A. del Río

### Resumen:

La conversión de la forma endógena de la proteína priónica celular (PrP<sup>C</sup>) a su forma patógena (PrP<sup>SC</sup>) supone el evento principal responsable del desarrollo de las prionopatías. Aunque la participación de PrP<sup>SC</sup> en estas enfermedades ha sido estudiada extensamente, existe cierta controversia sobre el papel fisiológico que lleva a cabo la proteína sana en el organismo. Hasta el día de hoy, esta glicoproteína ha sido involucrada en múltiples procesos celulares por su interacción con proteínas de membrana y la consecuente regulación de complejos de señalización intracelular. Sin embargo es poca y dispar la información disponible sobre los cambios en expresión génica derivados de la acción de PrP<sup>C</sup>, ya sea a partir de modelos celulares o animales.

En este trabajo presentamos el perfil de expresión génica PrP<sup>C</sup>-dependiente en células N2a y la participación de esta proteína en las principales funciones celulares representadas: i) ciclo celular, ii) crecimiento celular y proliferación y iii) mantenimiento de la morfología celular. Hemos observado que la sobreexpresión de PrP<sup>C</sup> en este tipo celular actúa positivamente sobre el proceso de proliferación y favorece la entrada en ciclo celular tras la estimulación con suero. Por lo contrario, el silenciamiento de PrP<sup>C</sup> entorpece la progresión a lo largo del ciclo. Nuestros resultados indican que estos efectos son derivados de la acción reguladora de PrP<sup>C</sup> sobre las vías de señalización MAPK y AKT tanto en células asincrónicas como tras estimulación mitogénica.

También hemos demostrado que esta regulación está mediada, en parte, por la interacción de PrP<sup>C</sup> con el receptor de EGF (EGFR) en la membrana plasmática, donde ambas proteínas constituyen un complejo multimérico.

Finalmente, PrP<sup>C</sup> también ejerce un rol modulador de la morfología celular, pues su sobreexpresión en células N2a produce un incremento en el número de filopodios. La formación de estas estructuras es consecuencia de la acción de PrP<sup>C</sup> sobre el citoesqueleto de actina mediante la regulación de las Rho GTPAsas, concretamente a través de la activación de la vía AKT-Cdc42-N-WASP.

### Referencia:

Llorens F, Carulla P, Villa A, Torres JM, Fortes P, Ferrer I, Del Río JA (2013a) PrP regulates epidermal growth factor receptor function and cell shape dynamics in Neuro2a cells. *Journal of neurochemistry* [Epub ahead of print].



ORIGINAL  
ARTICLEPrP<sup>C</sup> regulates epidermal growth factor receptor  
function and cell shape dynamics in Neuro2a cellsFranc Llorens,<sup>\*†‡§<sup>1</sup></sup> Patricia Carulla,<sup>\*†‡<sup>1</sup></sup> Ana Villa,<sup>¶</sup> Juan M. Torres,<sup>¶</sup>  
Puri Fortes,<sup>\*\*</sup> Isidre Ferrer<sup>‡§</sup> and José A. del Río<sup>\*†‡</sup><sup>\*</sup>*Molecular and Cellular Neurobiotechnology Group, Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC),  
Barcelona Science Park, Barcelona, Spain*<sup>†</sup>*Department of Cell Biology, University of Barcelona (UB), Barcelona, Spain*<sup>‡</sup>*Center for Networker Biomedical Research in Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Barcelona,  
Spain*<sup>§</sup>*Institute of Neuropathology, Bellvitge Biomedical Research Institute, Hospitalet de Llobregat, Spain*<sup>¶</sup>*Animal Health Research Center (CISA-INIA), Madrid, Spain*<sup>\*\*</sup>*Department of Medicine, University of Navarra, Pamplona, Spain*

## Abstract

The prion protein (PrP) plays a key role in prion disease pathogenesis. Although the misfolded and pathologic variant of this protein (PrP<sup>Sc</sup>) has been studied in depth, the physiological role of PrP<sup>C</sup> remains elusive and controversial. PrP<sup>C</sup> is a cell-surface glycoprotein involved in multiple cellular functions at the plasma membrane, where it interacts with a myriad of partners and regulates several intracellular signal transduction cascades. However, little is known about the gene expression changes modulated by PrP<sup>C</sup> in animals and in cellular models. In this article, we present PrP<sup>C</sup>-dependent gene expression signature in N2a cells and its implication in the most overrepresented functions: cell cycle, cell growth and proliferation, and maintenance of cell shape. PrP<sup>C</sup> over-expression enhances cell proliferation and cell cycle

re-entrance after serum stimulation, while PrP<sup>C</sup> silencing slows down cell cycle progression. In addition, MAP kinase and protein kinase B (AKT) pathway activation are under the regulation of PrP<sup>C</sup> in asynchronous cells and following mitogenic stimulation. These effects are due in part to the modulation of epidermal growth factor receptor (EGFR) by PrP<sup>C</sup> in the plasma membrane, where the two proteins interact in a multimeric complex. We also describe how PrP<sup>C</sup> over-expression modulates filopodia formation by Rho GTPase regulation mainly in an AKT-Cdc42-N-WASP-dependent pathway.

**Keywords:** cell signaling, cellular prion protein, filopodia, gene expression, microarray, proliferation.

*J. Neurochem.* (2013) 10.1111/jnc.12283

The normal, cellular isoform of the prion protein, PrP<sup>C</sup>, is a highly conserved glycoprotein tethered to the cell membrane by a glycosyl phosphatidyl inositol anchor (GPI) (see Linden *et al.* 2008; Aguzzi *et al.* 2008 for review). Expression of PrP<sup>C</sup> is required for prion propagation, since deletion of the *Prnp* gene in mice, specifically in neurons, entails complete protection against scrapie infection (Bueler *et al.* 1993). Many efforts have been made to increase knowledge of PrP<sup>Sc</sup>, the misfolded and pathogenic form of PrP<sup>C</sup>, and to determine the molecular mechanisms by which the prion may promote the misfolding of more protein into PrP<sup>Sc</sup>. However, understanding the physiological role of PrP<sup>C</sup> remains a challenging issue, because of the many roles described for it (Linden *et al.* 2008). It has been reported that PrP<sup>C</sup> plays a role in several cellular

processes, including proliferation and cell–cell adhesion (Aguzzi *et al.* 2008; Linden *et al.* 2008). Moreover, PrP<sup>C</sup> has been found to be a copper-binding protein (Brown *et al.*

Received December 27, 2012; revised manuscript received April 26, 2013; accepted April 27, 2013.

Address correspondence and reprint requests to José Antonio Del Río, Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), Barcelona Science Park, 08028 Barcelona, Spain. E-mail: jadelrio@ibecbarcelona.eu

<sup>1</sup>These authors contributed equally to this study.

**Abbreviations used:** AKT/PKB, protein kinase B; cdc42, cell division cycle 42; EGF, epidermal growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinases; FBS, fetal bovine serum; N2a, Neuro2a; N-WASP, Neural Wiskott–Aldrich syndrome protein; PrP<sup>C</sup>, cellular prion protein; PrP<sup>Sc</sup>, scrapie prion protein; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis;

1997), which reveals new physiological functions as an antioxidant and in cell homeostasis (Viles *et al.* 2008). Several lines of research point to a role in neuroprotection against a wide range of insults, such as excitotoxicity and serum starvation (Llorens and Del Rio 2012).

Studies using various mouse models have demonstrated the pleiotropic phenotype of the *Prnp* gene that extends from changes in gene expression profiles to particular cellular functions (Steele *et al.* 2007; Rangel *et al.* 2009; Benvegnu *et al.* 2011). In fact, *Prnp*<sup>-/-</sup> mice present cognitive deficits, depressive-like behavior, anxiety-related disorders and alterations in circadian activity (Steele *et al.* 2007). In contrast, *Prnp*-over-expressing mice present some deficiencies, such as cell degeneration in the PNS and CNS at more advanced stages (Westaway *et al.* 1994) but without the age-related behavioral impairments observed in knock-out mice, some immunological defects (Jouvin-Marche *et al.* 2006), and enhanced synaptic facilitation (Rangel *et al.* 2009). In addition, data obtained from mice expressing eGFP under the *Prnp* promoter (Baillly *et al.* 2004; Barmada *et al.* 2004) as well as *Prnp*-over-expressing mice (Westaway *et al.* 1994) showed some differences in PrP<sup>C</sup> expression. This reinforces the idea that *Prnp* expression can be modulated in specific cells by a highly regulated process during development and adult life (Benvegnu *et al.* 2011). To gain insight into the molecular mechanisms under the control of PrP<sup>C</sup> expression, multiple gene expression approaches have been carried out in transgenic *Prnp* mice (Rangel *et al.* 2009; Chadi *et al.* 2010; Benvegnu *et al.* 2011) and in neuronal and non-neuronal stably transfected cell lines (Sato *et al.* 2000; Sato and Yamamura 2004). In these studies, there was no coincidence in gene regulation data, and there was a lack of shared signaling pathways over-represented by gene expression changes. This reinforces the notion that the role of PrP<sup>C</sup> may depend on the cell type and its environment.

In parallel, a lack of knowledge about the events triggered by PrP<sup>C</sup> in baseline conditions and its expression changes in physiological conditions hinders understanding of the molecular mechanisms under its regulation. Several signaling pathways have been implicated in the transmission of the effects downstream from PrP<sup>C</sup>, mainly through its interaction with extracellular partners (Santuccione *et al.* 2005; Santos *et al.* 2011) and neurotransmitter receptors (Khosravani *et al.* 2008; Carulla *et al.* 2011). Indeed, it is suggested that PrP<sup>C</sup> may be located in specialized membrane environments such as lipid rafts (Harmey *et al.* 1995; Taylor and Hooper 2006; Lewis and Hooper 2011) and in post-synaptic density (Carulla *et al.* 2011) forming multimeric complexes with several interacting partners involved in multiple cellular functions. In this regard, PrP<sup>C</sup> clustering, as a model of PrP<sup>C</sup>-mediated signaling, modulates the downstream activation of Fyn-ERK1/2 and protein kinase B (AKT) pathways (Mouillet-Richard *et al.* 2000; Santuccione *et al.* 2005; Toni *et al.* 2006).

In this study, we analyzed the PrP<sup>C</sup>-dependent gene expression signature of neuroblastoma (N2a) cells after transient acute up-regulation and down-regulation of PrP<sup>C</sup>. To functionally validate the transcriptomic approach, we analyzed the implication of PrP<sup>C</sup> expression in two of the molecular functions over-represented in our gene expression analysis: cell growth and proliferation, and cell shape maintenance. Finally, to evaluate the molecular mechanisms regulated by PrP<sup>C</sup>, we examined the activation of ERK1/2 and AKT signaling pathways and the role of PrP<sup>C</sup> in epidermal growth factor/epidermal growth factor receptor (EGF/EGFR)-dependent mitogenic stimulation and neurite formation in an AKT-Cdc42-N-WASP-dependent pathway.

## Materials and methods

### Reagents and antibodies

EGF, cytochalasin D, and wortmannin were from Sigma (Poole, UK). Cycloheximide, anti-cyclin D1, anti-SNAP25, anti-p-EGFR (Tyr1173), total anti-ERK, anti-p-p44/42 MAPK(Erk1/2)(Thr202/Tyr204), anti-p-AKT-1(Ser473), anti-PARP, anti-Grb2, and anti-p-Src(Tyr416) were from Cell Signalling (Beverly, MA, USA). Anti-cyclin E, anti-Cdk2, anti-Egr1, anti-p-Elk1(Ser383), and anti-AKT were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), anti-Gap43, anti-actin, and anti-tubulin were from Millipore (Billerica, MA, USA) and anti-c-fos was from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Anti-PrP-SAF61 (immunoprecipitation/immunofluorescence/PrP<sup>C</sup> clustering) was from Spi-Bio&Cayman Chemical (Massy Cedex, France) and anti-PrP-6H4 (western blot) was from Prionics (Schlieren, Switzerland). Anti-Ki67-MM1 was from Novocastra (Newcastle-upon-Tyne, UK). Anti-Flotilin-1 was from BD Bioscience (San Diego, CA, USA).

### Cell culture and treatments

PrP<sup>C</sup> siRNA used for prion silencing and the Scramble siRNA sequence used as a control were obtained from (Daude *et al.* 2003) and were synthesized by Dharmacon (Lafayette, LA, USA). pcDNA3.1-PrP<sup>C</sup> and pcDNA3.1-PrP-ΔF35 were kind gifts from Prof. D. Harris (Boston University) and Prof. A. Aguzzi (University Hospital of Zurich). N2a (N2a) and SK-N-SH (SK) neuroblastoma cell lines with low PrP<sup>C</sup> expression levels were grown at 37°C, 5.5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 4.5 g/L glucose, 10% fetal bovine serum (FBS), and antibiotics (all from Invitrogen-Life Technologies, Barcelona, Spain).

For siRNA transfection, cells were plated at 0.25 × 10<sup>6</sup> cells/mL and transfected the next day using Lipofectamine 2000 reagent in OptiMem™ medium, following the manufacturer's instructions (Invitrogen-Life Technologies). Four hours after transfection, cells were washed and the medium was replaced with DMEM containing 10% FBS. PrP<sup>C</sup> up-regulation and down-regulation was checked by western blot analysis and RT-qPCR. For serum restimulation experiments, the day after transfections cells were serum-starved for 24 h and restimulated with medium containing 10% FBS or EGF (150 ng/μL) for the indicated times.

For N2a differentiation analysis, transfected cells were serum-starved for 24 h and fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min at

20°C. Coverslips were processed for immunofluorescence assays, as indicated.

#### Cell proliferation analysis

The proliferation of N2a cells was analyzed using the colorimetric WST-1 assay (Roche, Mannheim, Germany) and Ki67 labeling. WST-1 ((4-[3-(4-Iodophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene-disulfonate) is cleaved to formazan salts, which are soluble in the culture medium and analyzable in a PowerWave™ XS Microplate spectrophotometer (Biotek® Instruments, Inc., Winooski, CA, USA). Ki67 analysis was carried out using the Ki67-MM1 monoclonal antibody, which recognizes the Ki67 antigen that is only present during active phases of the cell cycle and absent in G0.

#### Microarray analysis

Total RNA for the microarray analysis was quantified with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer, followed by quality assessment with the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Acceptable quality values were in the 1.8–2.2 range for A260/A280 ratios, > 0.9 for the rRNA ratio (28S/18S) and > 8.0 for RIN (RNA Integrity Number). Biotinylated cRNA was prepared using the Illumina RNA Amplification Kit (Ambion, Austin, TX, USA), according to the manufacturer's instructions, starting with 200 ng total RNA from each sample. cRNA was purified and each sample was hybridized on Illumina mouse-6 v1.1 expression bead chips, following the manufacturer's instructions. After 16 h of hybridization, the arrays were washed, dried, stained with Cy3-Streptavidin, and scanned using Illumina BeadScan software on the Illumina BeadArray scanning system (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). The raw data were summarized per probe using BeadStudio Gene Expression software, and the summary data file was processed using the Lumi package (Du *et al.* 2008), developed within the Bioconductor project in the R statistical programming environment (Gentleman *et al.* 2004). Data were normalized using robust spline normalization (RSN) and variance stabilizing transformation (VST) methods. The log<sub>2</sub> intensities were media-centered and log ratios were computed as differences in log<sub>2</sub> intensities for each probe. Whole genome expression data results were filtered, with criteria selection of a 1.2- or 1.5-fold change, as indicated, and a *Q*-value of less than 5%.

#### Network and pathway analysis

Ingenuity pathway analysis 3.1 software (IPA; Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA) was used to evaluate the functional significance of PrP<sup>C</sup>-induced gene profiles. Specified lists of genes identified by RankProd as being affected by PrP<sup>C</sup> expression were used for the network generation and pathway analyses implemented in IPA tools. HUGO official gene symbols for the selected gene lists were uploaded into the IPA suite, and were then mapped to the Ingenuity Pathway Knowledge Base. The so-called focus genes were then used to generate biological networks. A score was calculated for each network, according to the fit of the original set of significant genes. This score reflects the negative logarithm of the *p*-value, which indicates the likelihood of the focus genes in a network being found together by random chance. The significance for biological functions was then assigned to each network by determining a *p*-value for the enrichment of the genes in the network

for such functions, compared with the whole Ingenuity Pathway Knowledge Base as a reference set.

#### RT-qPCR

RT-qPCR was performed on total RNA extracted from N2a cells with the miRVana isolation kit (Ambion). Purified RNAs were used to generate the corresponding cDNAs, which served as PCR templates for the mRNA quantification. The primers used in this study for RT-qPCR validation are given in Figure S7. PCR amplification and detection were performed with the Roche LightCycler 480 detector, using 2x SYBR Green Master Mix (Roche, Barcelona, Spain) as a reagent, following the manufacturer's instructions. The reaction profile was as follows: denaturation–activation cycle (95°C for 10 min) followed by 40 cycles of denaturation–annealing–extension (95°C, 10 min; 72°C, 1 min; 98°C, continuous). mRNA levels were calculated using the LightCycler 480 software (Roche). The data were analyzed using the  $\Delta\Delta C_t$  method, which provides the target gene expression values as fold changes in the problem sample compared with a calibrator sample. Both problem and calibrator samples were normalized with the relative expression of a housekeeping gene [glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)].

#### Western blotting

N2a cells were lysed with ice-cold lysis buffer – 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% (wt/vol) Triton X-100, 0.5% (wt/vol) Nonidet P-40 (IGEPAL; Sigma), glycerol 10%, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, and protease and phosphatase inhibitors – and centrifuged at 15 000 *g* for 20 min. After protein quantification, samples were boiled in Laemmli sample buffer at 100°C for 5 min, followed by 8–15% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) electrophoresis. They were then electrotransferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Millipore) and processed for immunoblotting with the ECL Plus kit (Amersham-Pharmacia Biotech, GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, USA).

#### Immunoprecipitation

N2a cells were lysed with ice-cold lysis buffer – 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% (wt/vol) Triton X-100, 0.5% (wt/vol) Nonidet P-40 (IGEPAL; Sigma), glycerol 10%, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, and protease and phosphatase inhibitors – and centrifuged at 15 000 *g* for 20 min. A total of 1 mg of protein extract was mixed with 10  $\mu$ L of protein A/G-Sepharose (Sigma) previously equilibrated with lysis buffer for 2 h (pre-clearing). Samples were centrifuged, and the supernatant was mixed with the indicated immunoprecipitation antibodies plus 10  $\mu$ L of protein A/G-Sepharose overnight at 4°C. The immunocomplexes were washed in lysis buffer three times and once in lysis buffer plus 0.25 M NaCl. Proteins attached to Sepharose beads were eluted with SDS-PAGE sample buffer, subjected to SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes and probed with the indicated antibodies.

#### FACS analysis

Subconfluent N2a cells were harvested 24 or 48 h after transfection. Briefly, cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS), trypsinized, centrifuged, and pellet washed in PBS. Cells were re-suspended in 0.5 mL of PBS, added to 4.5 mL of 70%

cold-ethanol and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis. Cells were centrifuged for 5 min at 200 *g*, washed once in PBS and centrifuged again. The pellet was re-suspended in 1 mL of propidium iodide/Triton X-100/RNAsa solution [Triton 0.1% (Sigma), 0.2 mg/mL RNAsa A DNAsa free (Sigma) and 0.02 mg/mL (Molecular Probes, Life Technologies) in PBS]. Samples were processed using a Beckman Coulter Epics XL flow cytometer and analyzed with Summitv4.3 software (Brea, CA, USA). The proliferative index (PI) was determined as the  $[(S + G2)/(S + G2 + G1)]$  value.

#### Immunofluorescence

For the immunocytochemistry assays on cell cultures, N2a cells were grown on glass coverslips, and transfected as described above. At the indicated times, cells were rinsed twice with cold PBS and fixed with paraformaldehyde 4% for 10 min at  $20^{\circ}\text{C}$ . After 1 h of blocking with 10% FBS-PBS-0.2% gelatin, coverslips were incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with indicated antibodies in 10% FBS-PBS-0.2% gelatin. Successive washes with 1% FBS-PBS-0.2% gelatin were carried out to reduce non-specific reactivity and were followed by 45 min incubation with Alexa Fluor-488 secondary antibodies (Molecular Probes) in 10% FBS-PBS-0.2% gelatin. Cells were washed in 10% FBS-PBS-0.2% gelatin. They were then mounted on coverslips with Vectashield containing 150 ng/mL Hoechst and analyzed on a LEICA DMR microscope (LEICA, Wetzlar, Germany).

#### Lipid raft isolation

Lipid raft isolation was performed as described in (Macdonald and Pike 2005). N2a cells were scraped in PBS, centrifuged at 250 *g* for 5 min at  $4^{\circ}\text{C}$  and re-suspended in 500 mM sodium carbonate, pH 11.0 containing protease and phosphatase inhibitors. Cells were lysed using a Dounce homogenizer (20 strokes) followed by 10 passages through a 27-gauge needle. The sample was mixed with an equal volume of 90% sucrose in MES buffer (25 mM MES, pH 6.5, 150 mM NaCl). It was placed at the bottom of a centrifuge tube and followed by 35% and 5% sucrose layers. The gradient was centrifuged at 175 000 *g* for 20 h. It was then divided into twelve fractions and processed for western blot.

## Results

### PrP<sup>C</sup>-dependent gene expression signature in N2a cells

N2a cells were selected for their endogenous expression of PrP<sup>C</sup> and their potential prion infectivity (e.g., Chesebro *et al.* 1993) compared to other cell lines. Global transcriptional profiling was used to obtain a snapshot of the state of N2a cells with endogenous low levels of PrP<sup>C</sup> 24 h after ectopic silencing and over-expression of PrP<sup>C</sup>. The modulation of PrP<sup>C</sup> expression levels was confirmed by RT-qPCR (siRNA-PrP<sup>C</sup>/Scramble =  $-3.66$ -fold decrease and pcDNA-PrP<sup>C</sup>/pcDNA =  $34.91$ -fold increase) (Figure S1). PrP<sup>C</sup> levels returned to the initial endogenous expression around 84–96 h post-transfection (data not shown). To evaluate the genes whose transcription was regulated, three sets of experiments were analyzed. RNA was extracted and hybridized on Illumina Sentrix 6 mouse v2 bead arrays. Normalized and raw data from these experiments are accessible in the GEO database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> under accession

number GSE38887. We used significance analysis of microarray software (SAM) to identify genes differentially expressed in the two treatments (siRNA-PrP<sup>C</sup>/Scramble and pcDNA-PrP<sup>C</sup>/pcDNA). Using a 1.5-fold change threshold and a false discovery rate at 5%, we found 259 and 357 mapped IDs, regulated as a consequence of PrP<sup>C</sup> silencing and over-expression, respectively (Figure S2). IPA identified the set of molecular functions that were overrepresented in our experiments by integrating gene expression profiles using gene ontology (GO). The top molecular function overrepresented in both treatments was cell cycle, although cell growth and proliferation also appeared among the top five (Table 1). A set of 27 genes was analyzed that represent key molecules in terms of the respective molecular functions overrepresented in the IPA analysis. Data on these genes were validated by RT-qPCR on the same samples used in the microarray experiments. Results for the 27 analyzed genes were concordant with the microarray results, which included genes involved in cell cycle and proliferation, differentiation, neurite outgrowth, and intracellular trafficking, among other

**Table 1** Functional analysis of differentially expressed PrP<sup>C</sup>-dependent genes in N2a cells

<i>siRNA-PrP versus Scramble (259 Mapped IDs)</i>		
Molecular and cellular functions		
Name	<i>p</i> -value	# Molecules
Cell cycle	2.45E-06 – 4.01 E-02	33
Cellular assembly and organization	3.00E-06 – 4.01 E-02	42
Cell morphology	1.52E-05 – 4.01 E-02	30
Molecular transport	4.57E-05 – 3.53E-02	24
Protein trafficking	4.57E-05 – 1.35E-02	14
Associated network functions		
Name	Score	
Cellular assembly and organization, cellular function and maintenance	45	
Cell morphology, nervous system development and function	42	
<i>pcDNA-PrP versus pcDNA (357 Mapped IDs)</i>		
Molecular and cellular functions		
Name	<i>p</i> -value	# Molecules
Cell cycle	1.41E-07 – 1.60E-02	46
Cell death	5.66E-07 – 1.60E-02	84
Gene expression	2.64E-05 – 1.16E-02	59
Cellular growth and proliferation	3.90E-05 – 1.56E-02	89
DNA replication, recombination, and repair	1.34E-04 – 1.60E-02	42
Associated network functions		
Name	Score	
Cell cycle, cellular growth and proliferation, cellular movement	43	
RNA post-transcriptional modification, cell cycle, cell morphology	43	

functions. Most of these genes showed an inverse correlation between their expression and PrP<sup>C</sup> levels (Table 2). Cyclin D1, Cyclin E, Cdk2, Egr1, c-fos, Gap43, and SNAP25 were also validated at protein level by western blot. Although proteins had lower fold changes than those observed for mRNA, they were also regulated in a PrP<sup>C</sup>-expression-dependent manner that resembled the gene expression pattern (Figure S3).

#### PrP<sup>C</sup> regulates cell cycle and proliferation in N2a cells

WST-1 assay was used to evaluate the direct effects of PrP<sup>C</sup> expression on N2a proliferation. Down-regulation of PrP<sup>C</sup> inhibited cell proliferation in asynchronous and serum-restimulated cells. In contrast, PrP<sup>C</sup>-transfected cells increased proliferation in both experimental conditions (Fig. 1a). Next, we examined the cell cycle at 24 and 48 h after serum restimulation in serum-starved cells, using FACS analysis. The PI indicated that PrP<sup>C</sup> silencing inhibited cell cycle progression (Scramble PI =  $0.39 \pm 0.04$  vs. siRNA-PrP<sup>C</sup> PI =  $0.27 \pm 0.02$ , mean  $\pm$  SEM), while PrP<sup>C</sup> over-expression slightly enhanced G1 entrance and progress throughout the cell cycle (pcDNA PI =  $0.40 \pm 0.03$  vs. pcDNA-PrP<sup>C</sup> PI =  $0.46 \pm 0.04$ , mean  $\pm$  SEM) (Fig. 1b). In parallel, we used Ki67 immunostaining to study the role of PrP<sup>C</sup> in cell cycle re-entrance after serum stimulation. Serum-starved N2a cells (0% FBS-Control) lacked Ki67 labeling (Fig. 1c). After 6 h of serum stimulation (10% FBS) in Scramble and pcDNA transfected cells, numerous Ki67+ cells were observed. PrP<sup>C</sup> silencing decreased the number of Ki67+ cells, while PrP<sup>C</sup>-transfected cells had higher Ki67 expression (Fig. 1c). Since regulation of PrP<sup>C</sup> expression has been implicated in some apoptotic mechanisms, we next analyzed whether the decrease in cell number observed after a PrP<sup>C</sup> decrease was related with increased cell death. This hypothesis was ruled out because of a lack of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage, which is a marker for apoptotic processes, by western blot (Fig. 1d). In addition, the octapeptide region and the central domain of PrP<sup>C</sup> play a key role in PrP<sup>C</sup>-dependent proliferation, since their deletion using over-expression of the F35 truncated form ( $\Delta$ 33-134) (Shmerling *et al.* 1998) abolished the enhanced proliferation caused by *Prnp* overexpression (Fig. 1e). Thus, all proliferative analysis methods supported the conclusion that PrP<sup>C</sup> down-regulation reduces cell growth and proliferation, while increased PrP<sup>C</sup> expression promotes proliferation and cell cycle progression in N2a cells.

#### ERK1/2 and AKT signal pathways are regulated by PrP<sup>C</sup> expression

Changes in PrP<sup>C</sup> expression may mediate changes in the activation state of AKT and ERK1/2 signal pathways in specific tissues and cell lines and under specific effectors (Schmalzbauer *et al.* 2008; Carulla *et al.* 2011). Since both pathways are critical for proliferative and differentiation

processes in neuroblastoma cell lines, and both cellular functions are altered in our model after modulation of PrP<sup>C</sup> expression, we examined whether these kinase pathways are regulated in non-synchronous N2a cells and after serum restimulation conditions. Densitometry values of p-antibody/total antibody indicated that in non-synchronous PrP<sup>C</sup>-silenced cells, ERK1/2 and AKT activity was markedly decreased. In contrast, p-ERK1/2 remained unaltered while p-AKT was significantly increased after PrP<sup>C</sup> over-expression (Fig. 2a). Downstream effectors of ERK1/2, p-Elk-1 levels, resembled ERK1/2 activation, indicating that the effect was transmitted downstream (Fig. 2a). In agreement with these results, we also observed a marked decrease in ERK1/2 phosphorylation after PrP<sup>C</sup> silencing in the SK-N-SH neuroblastoma cell line and a marginal effect when PrP<sup>C</sup> was over-expressed (Figure S4). This suggests a common PrP<sup>C</sup>-dependent regulating mechanism in neuroblastoma cell lines. Since some of the physiological effects after acute regulation of PrP<sup>C</sup> expression were also observed after serum restimulation of synchronized cells, we analyzed the activation kinetics of ERK1/2 and AKT under these conditions. ERK1/2 presented activation peaks at 5 min, 1 h, and 24 h after serum stimulation, while AKT presented a smooth activation peak starting at 30-min post-serum stimulation and decreasing at 24 h. PrP<sup>C</sup> silencing induced a reduction in ERK1/2 activation at 6 h and 24 h after serum stimulation, without affecting earlier times. PrP<sup>C</sup> silencing decreased AKT phosphorylation. However, in contrast to ERK1/2 activation, this inhibition appeared shortly after 30 min following serum stimulation (Fig. 2b). In these conditions, Egr1 expression and p-Elk-1 levels were also down-regulated after serum restimulation, which resembles the effects on ERK and AKT activation (Fig. 2c). When PrP<sup>C</sup> was over-expressed in the same cellular conditions, we observed marginal effects on ERK1/2 phosphorylation, while an increase in p-AKT was observed at 6 h and 24 h after serum restimulation (Fig. 2d).

#### Plasma membrane PrP<sup>C</sup> is required for ERK1/2 regulation

PrP<sup>C</sup> is an N-linked glycoprotein attached to the cell surface by a GPI anchor. Besides its plasma membrane location, PrP<sup>C</sup> has been described in endosomes via a high turnover, clathrin-dependent mechanism. Moreover, PrP<sup>C</sup> has been observed in rough endoplasmic reticulum and Golgi, probably by internalization from non-raft domains (Harris 2003). Indeed, in N2a cells, PrP<sup>C</sup> labeling can be observed both in plasma membranes and in perinuclear/reticular compartments (data not shown). PrP<sup>C</sup> silencing causes a decrease in both cellular fractions, indicating a constant PrP<sup>C</sup> trafficking between reticule and membrane. To establish which PrP<sup>C</sup> fraction is responsible for the effects over the ERK1/2 pathway, we used the ability of some monoclonal anti-PrP<sup>C</sup> antibodies to cluster PrP<sup>C</sup> into the cell membrane (Mouillet-Richard *et al.* 2000). PrP<sup>C</sup> clustering and aggregation

**Table 2** Experimental validation of microarray data by RT-qPCR

Gene	Gene name	Condition	Array	RT-qPCR	Function
<i>ccnd1</i>	Cyclin D1	siRNA-PrP/Scramble	-1.30	-1.61	Regulation of cell cycle: G1 transition
		pcDNA-PrP/pcDNA	1.23	1.51	
<i>ccne2</i>	Cyclin E2	siRNA-PrP/Scramble	1.74	2.24	Regulation of cell cycle: G1 transition
		pcDNA-PrP/pcDNA	-2.23	-2.13	
<i>Cdkn2a</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	siRNA-PrP/Scramble	-1.30	-1.22	Regulation of cell cycle: G1 progression
		pcDNA-PrP/pcDNA	1.70	5.17	
<i>Cdk2</i>	Cyclin-dependent kinase 2	siRNA-PrP/Scramble	1.50	1.60	Regulation of cell cycle: G1/S transition
		pcDNA-PrP/pcDNA	-1.50	-3.10	
<i>Egr1</i>	Early growth response 1	siRNA-PrP/Scramble	-1.91	-1.36	Regulation of mitogenesis & differentiation
		pcDNA-PrP/pcDNA	1.86	1.93	
<i>Insig1</i>	Insulin-induced gene 1	siRNA-PrP/Scramble	1.68	2.54	Regulation of cell cycle: G0/G1 transition & cholesterol biosynthesis
		pcDNA-PrP/pcDNA	-1.64	-2.52	
<i>Txnip</i>	Thioredoxin interacting protein	siRNA-PrP/Scramble	-2.06	-2.47	Regulation of cell cycle: G0/G1 transition & oxidative stress mediator
		pcDNA-PrP/pcDNA	2.10	1.79	
<i>Appbpl</i>	Amyloid beta precursor protein binding 1	siRNA-PrP/Scramble	1.02	1.09	Regulation of cell cycle: S/M progression & apoptosis
		pcDNA-PrP/pcDNA	-1.45	-2.52	
<i>ATF3</i>	Activating transcription factor 3	siRNA-PrP/Scramble	-1.10	-1.18	Regulation of cell cycle & cell death
		pcDNA-PrP/pcDNA	1.61	1.47	
<i>AurKB</i>	Aurora kinase B	siRNA-PrP/Scramble	1.87	3.19	Regulation of cell cycle: M progression and completion
		pcDNA-PrP/pcDNA	-1.72	-2.38	
<i>Akap12</i>	A kinase (PRKA) anchor protein 12	siRNA-PrP/Scramble	1.21	2.04	Cell growth
		pcDNA-PrP/pcDNA	-1.30	-1.24	
<i>c-fos</i>	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homotog	siRNA-PrP/Scramble	-1.10	1.20	Cell proliferation, differentiation & apoptosis
		pcDNA-PrP/pcDNA	1.71	1.30	
<i>ldb2</i>	Inhibitor of DNA binding 2	siRNA-PrP/Scramble	1.00	1.18	Negatively regulator of cell differentiation
		pcDNA-PrP/pcDNA	2.00	2.16	
<i>Gap43</i>	Growth-associated protein 43	siRNA-PrP/Scramble	3.96	8.09	Regulation of neuronal growth cones during development and axonal regeneration
		pcDNA-PrP/pcDNA	-1.29	-1.21	
<i>Nm1</i>	Neuritin 1	siRNA-PrP/Scramble	1.40	2.00	Regulation of neurite outgrowth and arborization
		pcDNA-PrP/pcDNA	-1.60	-1.20	
<i>Nsdhl</i>	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like	siRNA-PrP/Scramble	1.60	1.91	Cholesterol biosynthesis
		pcDNA-PrP/pcDNA	-1.30	-1.97	
<i>Aacs</i>	Acetoacetyl-CoC synthetase	siRNA-PrP/Scramble	2.00	4.27	Fatty acid synthesis
		pcDNA-PrP/pcDNA	1.57	-2.32	
<i>Cyp51</i>	Cytochrome P450, family 51, subfamilyA	siRNA-PrP/Scramble	1.68	1.54	Drug metabolism and cholesterol biosynthesis
		pcDNA-PrP/pcDNA	-1.92	-2.36	
<i>Rab7</i>	RAB7A, member RAS oncogene family	siRNA-PrP/Scramble	2.12	4.68	Vesicular transport
		pcDNA-PrP/pcDNA	1.00	1.15	
<i>Snx2</i>	Sorting Nexin 2	siRNA-PrP/Scramble	1.00	1.02	Intracellular trafficking
		pcDNA-PrP/pcDNA	-1.60	-2.71	
<i>Stx7</i>	Syntaxin 7	siRNA-PrP/Scramble	1.67	1.38	Intracellular trafficking
		pcDNA-PrP/pcDNA	-1.50	-1.60	
<i>Stx8</i>	Syntaxin 8	siRNA-PrP/Scramble	-1.56	-1.43	Intracellular trafficking
		pcDNA-PrP/pcDNA	-1.20	-1.12	
<i>Tcp1</i>	t-complex 1	siRNA-PrP/Scramble	1.11	-1.08	Intracellular trafficking & Chaperone activity
		pcDNA-PrP/pcDNA	-2.06	-2.69	
<i>Sgol2</i>	Shugoshin 2	siRNA-PrP/Scramble	1.14	1.09	Gametogenesis
		pcDNA-PrP/pcDNA	-2.32	-1.61	
<i>SNAP25</i>	Synaptosomal-associated protein 25	siRNA-PrP/Scramble	1.56	2.99	Synaptic Function
		pcDNA-PrP/pcDNA	-1.53	-3.08	
<i>Lbr</i>	Lamin B receptor	siRNA-PrP/Scramble	1.84	2.85	Anchoring of laminin and heterochromatin to Hie inner nuclear membrane
		pcDNA-PrP/pcDNA	-1.34	-2.38	
<i>ldhl</i>	Isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble	siRNA-PrP/Scramble	2.31	2.09	NADPH production
		pcDNA-PrP/pcDNA	-2.46	-2.44	

provokes a well-described increase in ERK1/2 phosphorylation and Fyn kinase activation (Mouillet-Richard *et al.* 2000; Toni *et al.* 2006). We treated control and PrP<sup>C</sup>-silenced cells for 10 min with SAF61 antibody. Western blot analysis of p-ERK1/2 indicated that SAF61 can induce ERK1/2 phosphorylation, which is significantly reduced after PrP<sup>C</sup> silencing (Scramble  $1.9 \pm 0.29$  vs. siRNA-PrP<sup>C</sup>  $1.3 \pm 0.21$ ) (Fig. 3). These results show that the PrP<sup>C</sup> located at the cell membrane was responsible for the downstream effects on ERK1/2 pathway.

#### PrP<sup>C</sup> regulates EGF-dependent ERK1/2 and AKT activation

Given the ability of PrP<sup>C</sup> to regulate ERK1/2 and AKT pathways, we searched for putative mitogenic components present in the serum and their respective receptors responsible for these effects. PrP<sup>C</sup> has been proposed as a potential functional partner of EGFR (Monnet *et al.* 2004), and a direct interaction has been described between PrP<sup>C</sup> and the adaptor protein Grb2 (Spielhaupter and Schatzl 2001), suggesting a link between EGFR and downstream MAPK pathway activation. In our experiments, restimulation of PrP<sup>C</sup>-silenced cells with EGF inhibited p-ERK1/2 and p-AKT activity. Moreover, EGF stimulation increased AKT activation in PrP<sup>C</sup> over-expressed cells, with marginal effects on p-ERK1/2 (Fig. 4a). This indicates that EGF/EGFR may be one of the main components of the PrP<sup>C</sup>-dependent ERK1/2 and AKT pathway regulation after serum stimulation.

In addition, inhibition of p-AKT activity with the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor wortmannin in EGF-stimulated cells decreased the PrP<sup>C</sup>-mediated enhancement of cell proliferation, indicating that there is a direct link between PrP<sup>C</sup>-mediated proliferation induced by EGF and the AKT pathway (Fig. 4b). In contrast, wortmannin treatment of serum-stimulated cells did not significantly affect cell proliferation in PrP<sup>C</sup> over-expressed cells (data not shown).

#### PrP<sup>C</sup> binds to the EGFR macromolecular complex

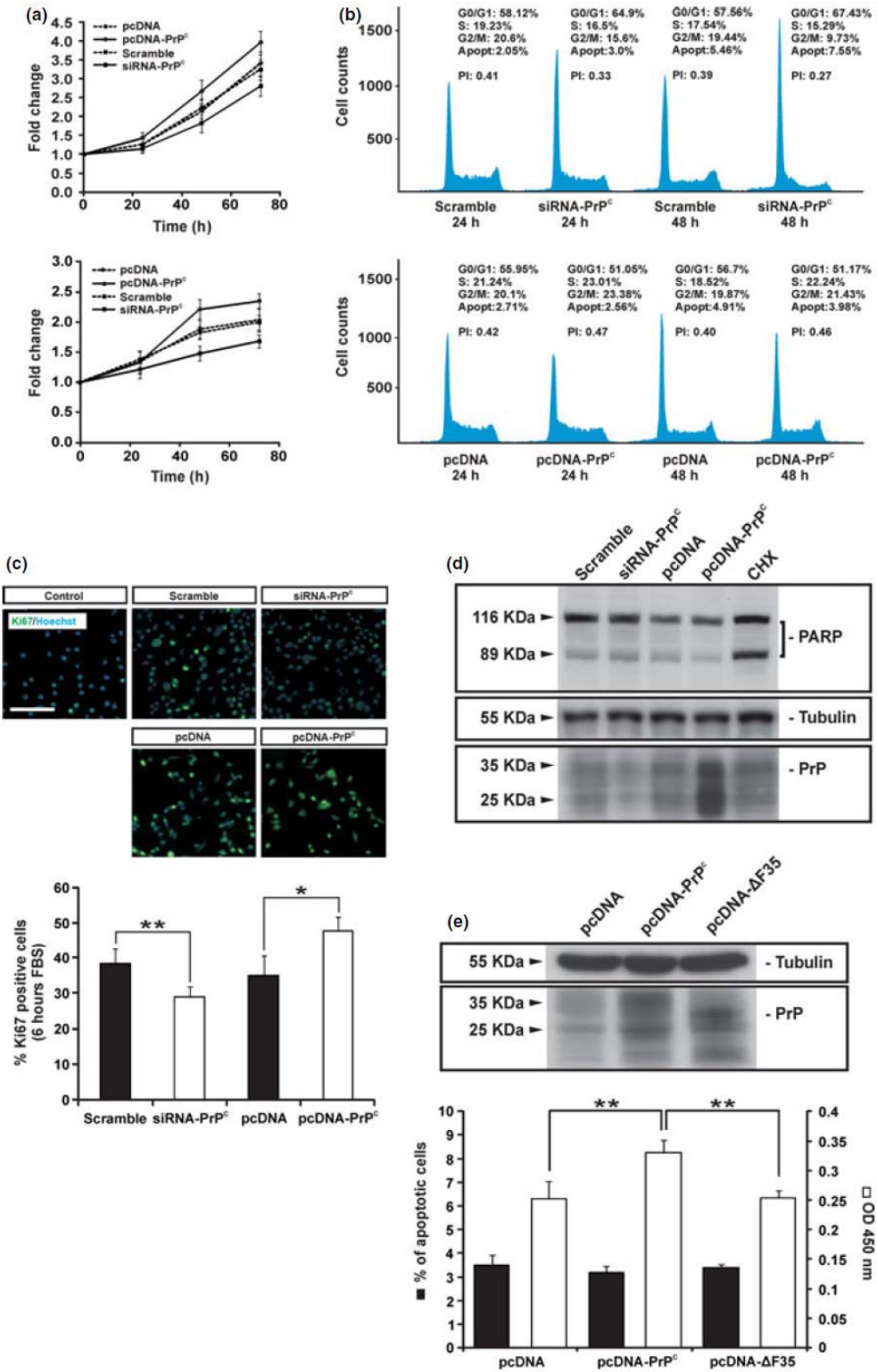
These results suggest a role for PrP<sup>C</sup> in regulating EGFR activity, either by modulating its phosphorylation state or through direct interaction between the two proteins. At the time points when PrP<sup>C</sup> affected ERK1/2 and AKT signaling, we could not observe EGFR phosphorylation (Fig. 5a). Consequently, we explored the possibility of regulation through potential interaction. Endogenous co-immunoprecipitation experiments in N2a cell extracts detected PrP<sup>C</sup> and EGFR in EGFR and PrP<sup>C</sup> immunocomplexes, respectively (Fig. 5b). Co-localization of the two proteins was observed in the lipid raft fraction in a sucrose gradient fractionation (Fig. 5c) and with double immunolabeling (Fig. 5d). Furthermore, confocal serial sections in Z-plane of A431 cells (with elevated levels of endogenous EGFR) transfected with PrP<sup>C</sup> also demonstrated the presence of EGFR and PrP<sup>C</sup> in intracellular vesicles after immunocytochemical detection of

both proteins (Figure S5). This supports the specificity of EGFR and PrP<sup>C</sup> interaction in cellular compartments. We also observed interaction between PrP<sup>C</sup> and two components of the EGFR macromolecular complex, Grb2 and p-Src. This indicates that PrP<sup>C</sup> may be part of the cell membrane complexes that regulate EGF/EGFR signaling (Fig. 5e). To assess whether PrP<sup>C</sup> interaction with EGFR was altered in the conditions in which ERK and AKT activity was modulated by PrP<sup>C</sup> in response to EGF (Fig. 4a), we co-immunoprecipitated PrP<sup>C</sup> and EGFR at 0 h and 24 h post-EGF stimulation in double transfected cells (Fig. 5f). Interestingly, EGFR-PrP<sup>C</sup> interaction was increased at 24 h post-EGF stimulation, which correlates with changes in high AKT activation and maintenance of ERK1/2 activation when compared to serum-starved cells (Fig. 5f). Thus, it is reasonable to consider that in absence of PrP<sup>C</sup>, EGF-treated cells showed decreased ERK1/2 and AKT activation (Fig. 4a). Taken together, the present data support the notion that PrP<sup>C</sup>-EGFR interaction modulates EGFR receptor activity and dynamics, reinforcing previous data (Monnet *et al.* 2004; Solis *et al.* 2012).

#### PrP<sup>C</sup>-dependent filopodia formation in N2a cells signals through PI3K, Rho-subfamily GTPases, and N-WASP

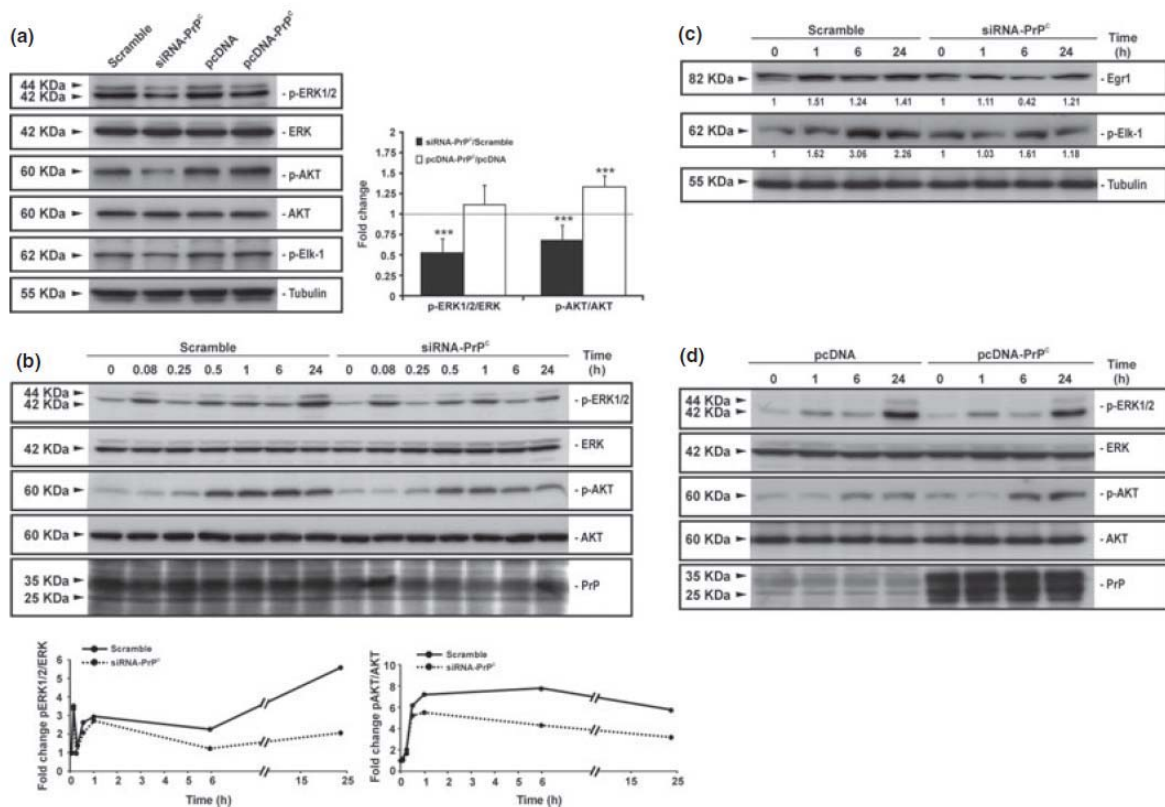
PrP<sup>C</sup> has been shown to regulate neurite outgrowth in several cell lines and hippocampal neurons (e.g., Bodrikov *et al.* 2011; Loubet *et al.* 2012). Moreover, in this study, we found several genes involved in neuritogenesis and cellular morphology, regulated by both PrP<sup>C</sup> silencing and over-expression in our microarray analysis (Table 2). To evaluate the effects of PrP<sup>C</sup> expression on the morphology of N2a transfected cells, we carried out actin immunofluorescence labeling of cell cultures. In asynchronous cells, PrP<sup>C</sup> over-expression significantly enhanced filopodia formation (Fig. 6a), in agreement with previous observations (Schrock *et al.* 2009). These filopodia are also modulated in N2a cells by several proteins such as Delta 1 (Sugiyama *et al.* 2010), the G protein-coupled receptor kinase 5 (GRK5), and the actin cross-linking family protein 7 (ACF7) (Sanchez-Soriano *et al.* 2009). In contrast, PrP<sup>C</sup> silencing does not generate significant phenotypical changes in N2a cells compared to control. This is in contrast to previously published data on other cell types: IC11 cells (Loubet *et al.* 2012) and primary hippocampal neurons (Bodrikov *et al.* 2011; Loubet *et al.* 2012).

To define the cellular protrusions induced by PrP<sup>C</sup> over-expression, we treated cells with cytochalasin D, a potent inhibitor of actin polymerization. Cytochalasin D inhibited PrP<sup>C</sup>-induced protrusions (Fig. 6b), indicating that these are mainly composed of actin filaments. Actin dynamics depends on Rho-subfamily GTPases and downstream effectors (e.g., N-WASP). Therefore, we analyzed filopodia formation in PrP<sup>C</sup>-transfected N2a co-transfected with the wild type and the dominant-negative forms of Cdc42 (Cdc42 N17), RhoA



**Fig. 1** Cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) expression regulates cell proliferation and cell cycle progression in N2a cells. (a) Growth curves of asynchronous (left graph) and serum-restimulated (right graph) N2a cells measured using the WST-1 assay. N2a cells were transfected with Scramble, siRNA-PrP<sup>C</sup>, pcDNA, and pcDNA-PrP<sup>C</sup>, as described in the Material and methods section, and cell proliferation was measured for the next 72 h. Error bars indicate  $\pm$  SEM. (b) Cell cycle distribution of serum-restimulated N2a transfected with Scramble, siRNA-PrP<sup>C</sup>, pcDNA, and pcDNA-PrP<sup>C</sup> analyzed by propidium iodide staining and FACS. The mean proliferative index (PI) for each condition is shown. (c) Ki67 immunostaining (green fluorescent signal) and Hoescht staining (blue fluorescent signal) of serum starved (Control) and 6 h serum-restimulated N2a cells transfected with

Scramble, siRNA-PrP<sup>C</sup>, pcDNA, and pcDNA-PrP<sup>C</sup>. The percentage of Ki67+ cells is expressed relative to its respective controls. Asterisks indicate statistical significance (\*\* $p < 0.01$ , ANOVA test). (d) Western blot analysis of N2a cells transfected for 48 h with Scramble, siRNA-PrP<sup>C</sup>, pcDNA, and pcDNA-PrP<sup>C</sup> developed with PARP and tubulin (loading control) antibodies. Cycloheximide (CHX) (0.01 mg/mL) was used as a positive control of PARP cleavage, as evidence of apoptosis induction. (e) N2a cells were transfected with pcDNA, pcDNA-PrP<sup>C</sup>, and pcDNA- $\Delta$ F35 and analyzed for proliferation and apoptosis as described above. A total of 400 nuclei were analyzed. Asterisks indicate statistical significance (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , ANOVA test). Scale bar in d: 100  $\mu$ m.



**Fig. 2** Regulation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) and protein kinase B (AKT) activity by cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) expression in N2a cells. (a) Western blot analysis of asynchronous N2a cells transfected for 24 h with Scramble, siRNA-PrP<sup>C</sup>, pcDNA, and pcDNA-PrP<sup>C</sup>, developed with p-ERK1/2, ERK, p-AKT, AKT, and p-Elk-1 antibodies. Densitometric analysis of five independent experiments is shown as the fold change between siRNA-PrP<sup>C</sup>/Scramble and pcDNA-PrP<sup>C</sup>/pcDNA. Tubulin was used as a loading control. (b) Western blot analysis of N2a cells transfected for 24 h with Scramble and siRNA-PrP<sup>C</sup>, serum-restimulated with 10% fetal bovine serum (FBS) for the indicated times and developed with p-ERK1/2, ERK, p-AKT, AKT, and PrP antibodies. Densitometric analysis of five

independent experiments is shown as the fold change relative to control samples (serum-starved cells). (c) Western blot analysis of N2a cells transfected for 24 h with Scramble and siRNA-PrP<sup>C</sup>, serum-restimulated with 10% FBS for the indicated times and developed with Egr1 and p-Elk-1. Tubulin was used as a loading control. Densitometric analysis of five independent experiments is shown as the fold change relative to control samples (serum-starved cells). (d) Western blot analysis of N2a cells transfected for 24 h with pcDNA and pcDNA-PrP<sup>C</sup>, serum-restimulated with 10% FBS for the indicated times and developed with p-ERK1/2, ERK, p-AKT, AKT and PrP antibodies. Asterisks indicate statistical significance (\*\* $p < 0.001$ , ANOVA test).

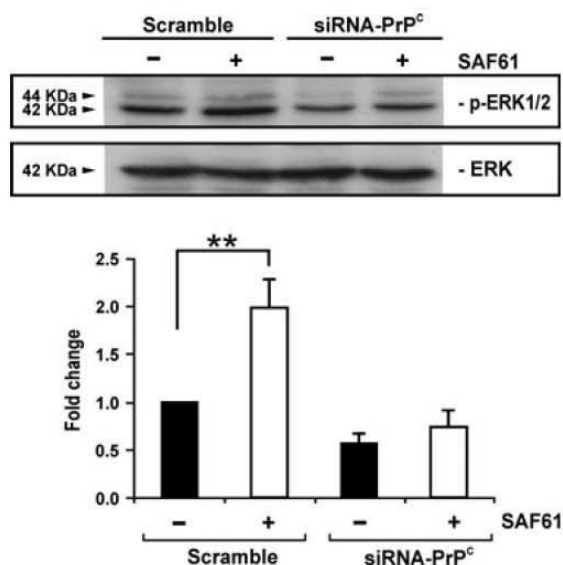


Fig. 3 Cell surface cellular prion protein (PrP<sup>c</sup>) mediates extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) regulation. Western blot analysis of N2a cells transfected for 24 h with Scramble and siRNA-PrP<sup>c</sup> and treated with phosphate-buffered saline (PBS) (-) or SAF61 (+). Membranes were developed with p-ERK1/2 and ERK antibodies. Densitometric analysis of three independent experiments is shown as the fold change between SAF61-treated and untreated cells. Asterisks indicate statistical significance (\*\**p* < 0.01, ANOVA test).

(RhoA N19), and Rac1 (Rac1 N17) (Fig. 6c). In all cases, a reduction in the total number of N2a-displaying actin bundles in filopodia was observed (Fig. 6c). However, dominant-

negative forms of Cdc42 and RhoA significantly reduced PrP<sup>c</sup>-dependent filopodia formation. In addition, N-WASP (N-WASP-ΔGBD) transfection also reduced PrP<sup>c</sup>-dependent filopodia formation. Moreover, inhibition of PI3K with wortmannin also decreased the amount of filopodia. This suggests that both the Rho/ROCK and AKT-Cdc42-N-WASP pathways play a role in PrP<sup>c</sup>-dependent enhanced filopodia formation (Fig. 6c and d). It has been described how N2a cells exhibit enhanced neurite outgrowth after serum deprivation, mainly dependent on EGFR transactivation independently of EGF (e.g., Evangelopoulos *et al.* 2005). Thus, we aimed to determine whether changes in PrP<sup>c</sup> expression *per se* might affect this well-described process (Figure S6). Results indicate that neither PrP<sup>c</sup> silencing nor over-expression-impaired neuritogenesis compared to control and Scramble treated cells; reinforcing the notion of the putative role of PrP<sup>c</sup> expression levels modulating neuritogenesis in EGF-stimulated cells.

### Discussion

Opposing effects of PrP<sup>c</sup> expression on cell proliferation and variable expression levels in different types of proliferating cells have been reported (see below). Although highly associated with epitope determination and technical resolution, some proliferating cells can be labeled using PrP<sup>c</sup> antibodies (Linden *et al.* 2008) while others cannot (Steele *et al.* 2006). However, neural cell lines (Kim *et al.* 2005) and oligodendrocyte precursors *in vitro* (Bribian *et al.* 2012) from *Prnp*<sup>-/-</sup> mice showed high rates of proliferation. Moreover, PrP<sup>c</sup> levels may change from elevated to lower

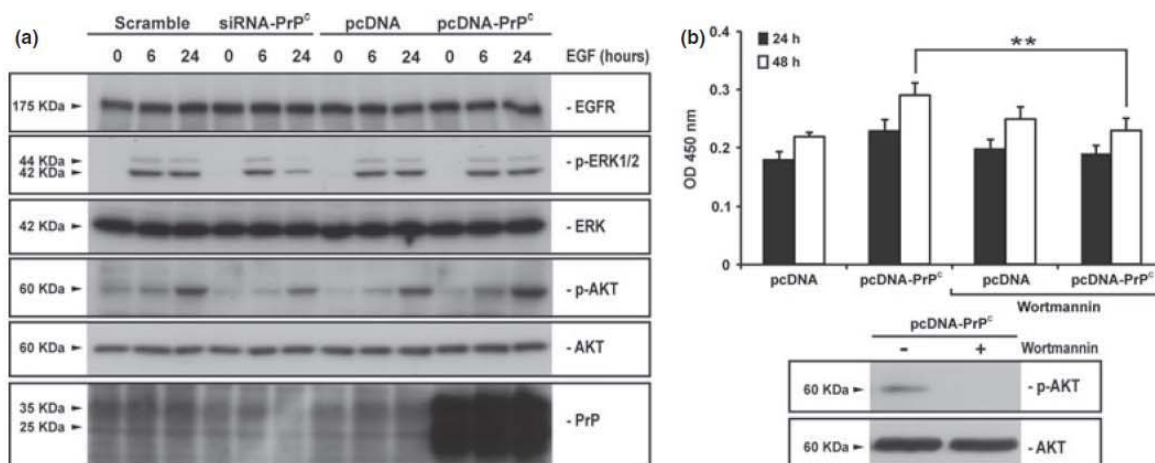
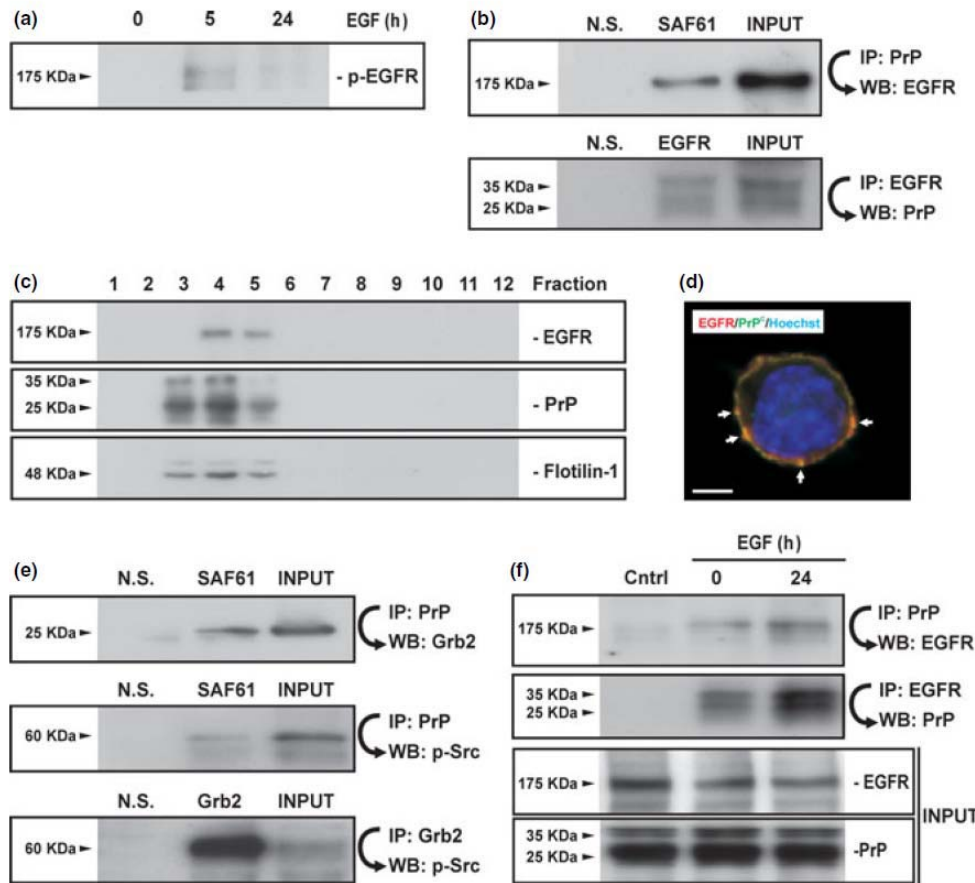


Fig. 4 Regulation of the epidermal growth factor receptor(EGFR)-extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) pathway by cellular prion protein (PrP<sup>c</sup>) expression in EGF restimulated N2a cells. (a) Western blot analysis of N2a cells transfected for 24 h with Scramble, siRNA-PrP<sup>c</sup>, pcDNA, and pcDNA-PrP<sup>c</sup>, restimulated with EGF for the indicated times and developed with EGFR, p-ERK1/2, ERK, p-AKT,

AKT, and PrP antibodies. (b) Cell proliferation analysis using WST-1 in N2a cells transfected with pcDNA and pcDNA-PrP<sup>c</sup> in the absence and presence of wortmannin and western blot analysis of cell extracts from N2a cells in the absence and presence of wortmannin for 6 h and developed with p-AKT and AKT antibodies. Asterisks indicate statistical significance (\*\**p* < 0.01, ANOVA test).

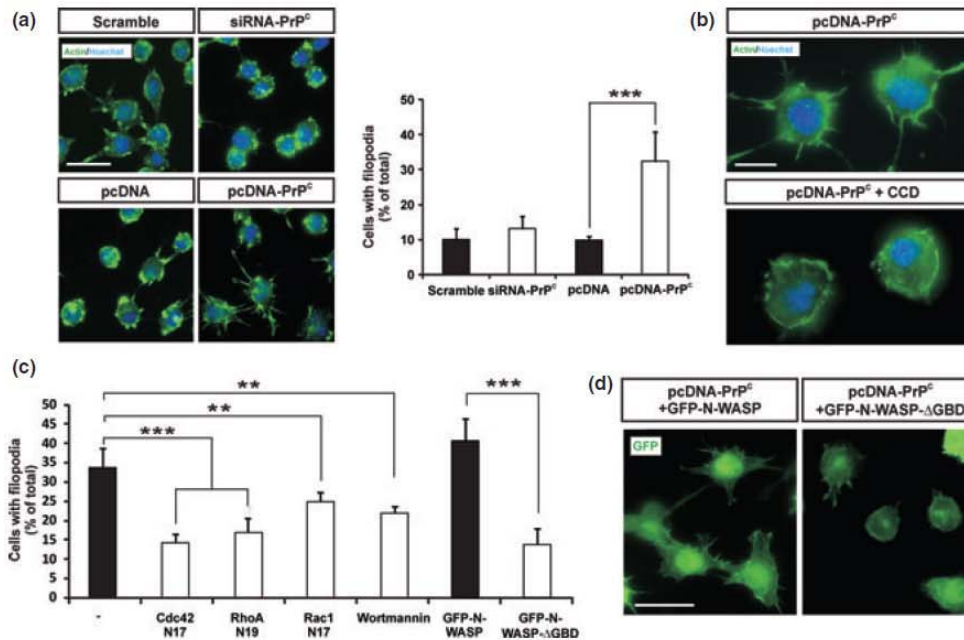


**Fig. 5** Epidermal growth factor receptor (EGFR) binds and co-localizes with cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>). (a) Western blot analysis of p-EGFR in N2a cells after EGF stimulation at indicated times. (b) Co-immunoprecipitation (IP) assay and western blot analysis of endogenous EGFR and PrP<sup>C</sup> in N2a cells. N2a cell extracts were immunoprecipitated with SAF61 (PrP) antibody and immunoblotted with anti-EGFR antibody (upper panel), and immunoprecipitated with EGFR antibody and immunoblotted with 6H4 (PrP) antibody. An aliquot of the cell extract was used as the assay input. (c) Western blot analysis of N2a detergent-free raft fractions transfected with PrP<sup>C</sup> with the sucrose gradient method in PrP<sup>C</sup> transfected N2a cells. Protein distribution in the carbonate step gradient procedure. Membranes were developed with EGFR, PrP<sup>C</sup>, and Flotilin-1 (lipid raft marker) antibodies.

(d) Confocal immunofluorescence images of N2a cells transfected for 24 h with EGFR and PrP<sup>C</sup> and labeled with SAF61 (PrP) antibody and EGFR. (e) Co-immunoprecipitation (IP) assay and western blot analysis of Grb2 and p-Src in N2a cells. N2a cell extracts were immunoprecipitated with SAF61 (PrP) and Grb2 antibodies and immunoblotted with Grb2 and p-Src antibodies. (f) Co-immunoprecipitation (IP) assay and western blot analysis of N2a cells transfected with EGFR and PrP<sup>C</sup> and restimulated with EGF at the indicated times. N2a cell extracts were immunoprecipitated with SAF61 (PrP) antibody, immunoblotted with anti-EGFR antibody (upper panel), immunoprecipitated with EGFR antibody and immunoblotted with 6H4 (PrP) antibody. An aliquot of the different cell extracts was used as the assay inputs. Scale bar in d: 5  $\mu$ m.

expression in proliferating cell types (e.g., Steele *et al.* 2006; Liang *et al.* 2007). Thus, it is reasonable to consider that PrP<sup>C</sup> expression may modulate cell cycle control dynamics and differentiation by acting along with additional factors in a cell-specific way (e.g., in the nervous system Steele *et al.* 2006; Bribian *et al.* 2012). In fact, data obtained from mutant mice and *in vitro* cellular models have failed to reveal a clear genomic signature modulated by PrP<sup>C</sup> (see Introduction and Steele *et al.* 2007 for details).

In this study, we demonstrate that increased PrP<sup>C</sup> expression enhances cell proliferation in N2a cells, while PrP<sup>C</sup>-silenced cells decrease cell cycle and proliferation without inducing cell death. Our microarray data support these observations, since key genes in cell growth and proliferation are regulated after acute PrP<sup>C</sup> up-regulation. Interestingly, Cyclin D1, required for cell cycle G1/S transition, is up-regulated in PrP<sup>C</sup> over-expressed cells and down-regulated in PrP<sup>C</sup>-silenced cells. This result is one of the few



**Fig. 6** Cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) enhances filopodia formation in N2a cells in an protein kinase B (AKT)-Cdc42-N-WASP-dependent manner (a) N2a cells were transfected with Scramble, siRNA-PrP<sup>C</sup>, pcDNA, and pcDNA-PrP<sup>C</sup> as described in the Material and methods section. Twenty-four hours post-transfection, cells were fixed and immunostained for anti-actin and stained with Hoescht. A total of 400 cells were analyzed for each condition. (b) N2a cells were transfected with pcDNA-PrP<sup>C</sup> and 24 h post-transfection treated with cytochalasin D (CCD) at 10 μg/mL for 2 h, fixed and immunostained for anti-actin and stained with Hoescht. (c) N2a cells were transfected with

pcDNA-PrP<sup>C</sup>, pcDNA-PrP<sup>C</sup>/Cdc42 N17, pcDNA-PrP<sup>C</sup>/RhoA N19, pcDNA-PrP<sup>C</sup>/Cdc42 N17, pQBI25-GFP-N-WASP, and pQE-GFP-N-WASP-ΔGDB and 24 h post-transfection were treated or untreated with wortmannin (10 ng/μL) (\*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, ANOVA test). A total of 400 cells were analyzed for each condition. (d) N2a cells were transfected with pcDNA-PrP<sup>C</sup> and pQBI25-GFP-N-WASP or pQE-GFP-N-WASP-ΔGDB. Twenty-four hours post-transfection, cells were fixed and immunostained for anti-actin. Scale bars a and c: 20 μm, b: 10 μm.

coincidences so far between several gene expression studies and proteomic analyses. Indeed, Cyclin D1 has been observed to be up-regulated after stable over-expression of PrP<sup>C</sup> and down-regulated after PrP<sup>C</sup> depletion in gastric cancer cell lines (Liang *et al.* 2007), and down-regulated in the adult brain of *Pmp*<sup>-/-</sup> mice (Brown *et al.* 2002) and *Pmp*<sup>-/-</sup>-derived fibroblasts (Benvegnu *et al.* 2011). More relevantly, Liang and coworkers demonstrated that PrP<sup>C</sup> over-expression stimulates promoter activity of Cyclin D1 (Liang *et al.* 2007). Together, these observations demonstrate that regulation of Cyclin D1 by PrP<sup>C</sup> is one of the common mechanisms in different cell types and tissues by which PrP<sup>C</sup> may regulate cell cycle progression. Increased presence of PrP<sup>C</sup> in the cytosol has been considered neurotoxic (e.g., Ma *et al.* 2002; Fioriti *et al.* 2005), although there is some controversy on this point. In this study, we have demonstrated that kinase activation (e.g., ERK1/2) is mediated by GPI-anchored plasma membrane PrP<sup>C</sup>, thereby ruling out unspecific effects because of cytosolic protein accumulation. In our experiments, transfections clearly increased the amount of plasma membrane

PrP<sup>C</sup>, but only slightly increase cytosolic PrP<sup>C</sup> (data not shown).

PrP<sup>C</sup> has been associated with several effectors and proteins in plasma membrane complexes, such as neurotransmitter receptors (e.g., Carulla *et al.* 2011), adhesion molecules (Schmitt-Ulms *et al.* 2001; Santuccione *et al.* 2005), and copper. These interactions can modulate a diverse array of cellular functions and signaling pathways such as PrP<sup>C</sup>-Laminin-mediated neuritegenesis (Beraldo *et al.* 2011), PrP<sup>C</sup>-STII-mediated neural progenitor/stem cells self-renewal (Santos *et al.* 2011) and GluR6/PSD-95 interaction, as well as further JNK3 activation in response to kainate (see Llorens and Del Rio 2012 for details).

Here, we demonstrate that PrP<sup>C</sup> is present in the macromolecular complexes associated with EGFR, and also that it is associated with proteins implicated in the downstream transmission of the mitogenic stimuli (Grb2, Src). In addition, PrP<sup>C</sup> modulates the activity of two EGFR-related pathways, MAPK and AKT, whose activity is critical for G1 cell cycle progression and Cyclin D1 expression (Humtsoe and Kramer 2010). PrP<sup>C</sup> regulates the second wave of

sustained activity that persists throughout the G1 phase for MAPK and the AKT activity peak after serum and EGF restimulation in serum-starved and asynchronous cells. Whether these effects on the EGFR pathway and cell proliferation involve other unknown components or specific cellular compartments warrants further research.

In this regard, we observed that PrP<sup>C</sup> co-localizes with EGFR in lipid raft fractions and modulates the expression of lipid raft proteins (such as Gap43) and proteins involved in vesicular transport and intracellular trafficking (e.g., syntaxins, nexin-2, t-complex1, and Rab7) (Table 2). Interestingly, Zafar and co-workers demonstrated reciprocal regulation of Rab7 on PrP<sup>C</sup> expression levels (Zafar *et al.* 2011). Taken together, these observations reinforce an active role of PrP<sup>C</sup> in lipid raft dynamics and vesicular trafficking. Indeed, Bodrikov and co-workers demonstrated reduced exocytic vesicle transport to growth cones in cultured hippocampal neurons lacking PrP<sup>C</sup>, reinforcing the notion that PrP<sup>C</sup> is necessary for proper neurite extension and growth cone dynamics (Bodrikov *et al.* 2011). In our experiments using N2a, PrP<sup>C</sup> deficiency did not lead to significant changes in neurite extension as in other studies (Schrock *et al.* 2009; Bodrikov *et al.* 2011; Miranda *et al.* 2011; Loubet *et al.* 2012). This could be explained by cellular type specificity, because of the non-sustained effect of transient transfection, or because siRNA inhibition reduced but did not eliminate PrP<sup>C</sup> expression in our cellular system.

Among other regulatory mechanisms, filopodia dynamics involves AKT, which activates the small GTPase of the Rho-subfamily Cdc42. Cdc42 then interacts with N-WASP, an activator of the Arp2/3 complex, to form actin bundles that enhance filopodia formation (Carrier *et al.* 1999). Under the cellular conditions in which PrP<sup>C</sup> enhances filopodia formation and neuritogenesis, AKT activity is enhanced in contrast to ERK1/2. In addition, we observed that both the pharmacological inactivation of AKT and the transfection of mutated forms of RhoA, Rac1, Cdc42, and N-WASP reduced filopodia protrusion induced by PrP<sup>C</sup> over-expression (especially Cdc42, RhoA, and N-WASP). Loubet and co-workers demonstrated increased membrane clustering of  $\beta$ 1 integrin, RhoA over-activation, and impaired neuritogenesis in IC11 neuroectodermal cells as well as in PC12 cells lacking PrP<sup>C</sup> (Loubet *et al.* 2012). It has been generally accepted that N-WASP, as an effector of Cdc42, modulates filopodia formation (Takenawa and Miki 2001). Thus, our results expand these previous observations indicating that the AKT-Cdc42-N-WASP pathway is also regulated by PrP<sup>C</sup> and EGFR signaling and that it promotes neuritogenesis. Neuritogenesis, axon guidance and cell migration share to some extent many features during development, from the use of substrates to the specific cues regulating chemotaxis and cytoskeleton dynamics. In this scenario, the present data support the notion that PrP<sup>C</sup> plays crucial roles in proliferation and neuritogenesis. However, we also believe that

future cell-specific studies combining gene expression data and functional analysis will reveal new mechanisms involving PrP<sup>C</sup>.

## Acknowledgements

The authors thank Prof. Antoni Camins (Universitat de Barcelona) for Cdk2 and Cyclin E antibodies, Prof. Xavier Navarro (Universitat Autònoma de Barcelona) for Gap43 antibody, Prof. Carles Enrich (Universitat de Barcelona) for pQB125-GFP-N-WASP-WT, pQE-GFP-N-WASP- $\Delta$ GBD constructions, Prof. David Harris (University of Boston) for pcDNA-PrP<sup>C</sup> plasmid and Prof. Adriano Aguzzi (University Hospital of Zurich) for pcDNA- $\Delta$ F35 plasmid. The authors declare no conflict of interest.

## Funding

This study was supported by the Seventh Framework Programme of the European Commission [grant number 222887] FP7-PRIORITY to JADR and JMT and [grant number 278486] DEVELAGE to IF. The Spanish Ministry of Science and Innovation [grant numbers BFU2009-10848 and BFU2012-32617], the Generalitat de Catalunya [grant number SGR2009-366], 'La Caixa' Obra Social Foundation and the Instituto Salud Carlos III [grant number PI11/03028] to JADR. PC is supported by the FPI program of MICINN.

## Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

**Figure S1.** Regulation of PrP<sup>C</sup> expression levels after transient silencing and over-expression in N2a cells.

**Figure S2.** List of regulated genes in the microarray analysis.

**Figure S3.** Validation of microarray and RT-qPCR data by western blot.

**Figure S4.** Regulation of ERK1/2 activity by PrP<sup>C</sup> expression in SK-N-SH cells.

**Figure S5.** PrP<sup>C</sup> and EGFR co-localization in vesicles of A431 cells.

**Figure S6.** Neuritogenesis in serum-starved N2a.

**Figure S7.** List of primers used in the study.

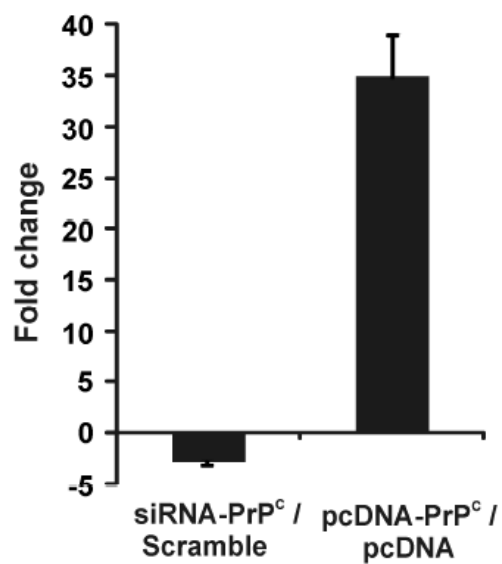
## References

- Aguzzi A., Baumann F. and Bremer J. (2008) The prion's elusive reason for being. *Annu. Rev. Neurosci.* **31**, 439–477.
- Bailly Y., Haeblerle A. M., Blanquet-Grossard F. *et al.* (2004) Prion protein (PrP<sup>C</sup>) immunocytochemistry and expression of the green fluorescent protein reporter gene under control of the bovine PrP gene promoter in the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* **473**, 244–269.
- Barmada S., Piccardo P., Yamaguchi K., Ghetti B. and Harris D. A. (2004) GFP-tagged prion protein is correctly localized and functionally active in the brains of transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* **16**, 527–537.
- Benevise S., Roncaglia P., Agostini F., Casalone C., Corona C., Gustincich S. and Legname G. (2011) Developmental influence of the cellular prion protein on the gene expression profile in mouse hippocampus. *Physiol. Genomics* **43**, 711–725.

- Beraldo F. H., Arantes C. P., Santos T. G. *et al.* (2011) Metabotropic glutamate receptors transduce signals for neurite outgrowth after binding of the prion protein to laminin gamma1 chain. *FASEB J.* **25**, 265–279.
- Bodrikov V., Solis G. P. and Stuermer C. A. (2011) Prion protein promotes growth cone development through reggie/flotillin-dependent N-cadherin trafficking. *J. Neurosci.* **31**, 18013–18025.
- Bribian A., Fontana X., Llorens F., Gavin R., Reina M., Garcia-Verdugo J. M., Torres J. M., de Castro F. and del Rio J. A. (2012) Role of the cellular prion protein in oligodendrocyte precursor cell proliferation and differentiation in the developing and adult mouse CNS. *PLoS One* **7**, e33872.
- Brown D. R., Qin K., Herms J. W. *et al.* (1997) The cellular prion protein binds copper *in vivo*. *Nature* **390**, 684–687.
- Brown D. R., Nicholas R. S. and Canevari L. (2002) Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. *J. Neurosci. Res.* **67**, 211–224.
- Bueler H., Aguzzi A., Sailer A., Greiner R. A., Autenried P., Aguet M. and Weissmann C. (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**, 1339–1347.
- Carlier M. F., Ducruix A. and Pantaloni D. (1999) Signalling to actin: the Cdc42-N-WASP-Arp2/3 connection. *Chem. Biol.* **6**, R235–R240.
- Carulla P., Bribian A., Rangel A., Gavin R., Ferrer I., Caelles C., Del Rio J. A. and Llorens F. (2011) Neuroprotective role of PrPC against kainate-induced epileptic seizures and cell death depends on the modulation of JNK3 activation by GluR6/7-PSD-95 binding. *Mol. Biol. Cell* **22**, 3041–3054.
- Chadi S., Young R., Le Guillou S. *et al.* (2010) Brain transcriptional stability upon prion protein-encoding gene inactivation in zygotic or adult mouse. *BMC Genomics* **11**, 448.
- Chesebro B., Wehrly K., Caughey B., Nishio J., Ernst D. and Race R. (1993) Foreign PrP expression and scrapie infection in tissue culture cell lines. *Dev. Biol. Stand.* **80**, 131–140.
- Daude N., Marella M. and Chabry J. (2003) Specific inhibition of pathological prion protein accumulation by small interfering RNAs. *J. Cell Sci.* **116**, 2775–2779.
- Du P., Kibbe W. A. and Lin S. M. (2008) lumi: a pipeline for processing Illumina microarray. *Bioinformatics* **24**, 1547–1548.
- Evangelopoulos M. E., Weis J. and Kruttgen A. (2005) Signalling pathways leading to neuroblastoma differentiation after serum withdrawal: HDL blocks neuroblastoma differentiation by inhibition of EGFR. *Oncogene* **24**, 3309–3318.
- Fioriti L., Dossena S., Stewart L. R., Stewart R. S., Harris D. A., Forloni G. and Chiesa R. (2005) Cytosolic prion protein (PrP) is not toxic in N2a cells and primary neurons expressing pathogenic PrP mutations. *J. Biol. Chem.* **280**, 11320–11328.
- Gentleman R. C., Carey V. J., Bates D. M. *et al.* (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* **5**, R80.
- Harmey J. H., Doyle D., Brown V. and Rogers M. S. (1995) The cellular isoform of the prion protein, PrPc, is associated with caveolae in mouse neuroblastoma (N2a) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210**, 753–759.
- Harris D. A. (2003) Trafficking, turnover and membrane topology of PrP. *Br. Med. Bull.* **66**, 71–85.
- Humtsoe J. O. and Kramer R. H. (2010) Differential epidermal growth factor receptor signaling regulates anchorage-independent growth by modulation of the PI3K/AKT pathway. *Oncogene* **29**, 1214–1226.
- Jouvin-Marche E., Attuil-Audenis V., Aude-Garcia C. *et al.* (2006) Overexpression of cellular prion protein induces an antioxidant environment altering T cell development in the thymus. *J. Immunol.* **176**, 3490–3497.
- Khosravani H., Zhang Y., Tsutsui S. *et al.* (2008) Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. *J. Cell Biol.* **181**, 551–565.
- Kim B. H., Kim J. I., Choi E. K., Carp R. I. and Kim Y. S. (2005) A neuronal cell line that does not express either prion or doppel proteins. *NeuroReport* **16**, 425–429.
- Lewis V. and Hooper N. M. (2011) The role of lipid rafts in prion protein biology. *Front. Biosci.* **16**, 151–168.
- Liang J., Pan Y., Zhang D. *et al.* (2007) Cellular prion protein promotes proliferation and G1/S transition of human gastric cancer cells SGC7901 and AGS. *FASEB J.* **21**, 2247–2256.
- Linden R., Martins V. R., Prado M. A., Cammarota M., Izquierdo I. and Brentani R. R. (2008) Physiology of the prion protein. *Physiol. Rev.* **88**, 673–728.
- Llorens F. and Del Rio J. A. (2012) Unraveling the neuroprotective mechanisms of PrP (C) in excitotoxicity. *Prion* **6**, 245–251.
- Loubet D., Dakowski C., Pietri M. *et al.* (2012) Neuritogenesis: the prion protein controls beta1 integrin signaling activity. *FASEB J.* **26**, 678–690.
- Ma J., Wollmann R. and Lindquist S. (2002) Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science* **298**, 1781–1785.
- Macdonald J. L. and Pike L. J. (2005) A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. *J. Lipid Res.* **46**, 1061–1067.
- Miranda A., Pericuesta E., Ramirez M. A. and Gutierrez-Adan A. (2011) Prion protein expression regulates embryonic stem cell pluripotency and differentiation. *PLoS One* **6**, e18422.
- Monnet C., Gavard J., Mege R. M. and Sobel A. (2004) Clustering of cellular prion protein induces ERK1/2 and stathmin phosphorylation in GT1-7 neuronal cells. *FEBS Lett.* **576**, 114–118.
- Mouillet-Richard S., Ermonval M., Chebassier C., Laplanche J. L., Lehmann S., Launay J. M. and Kellermann O. (2000) Signal transduction through prion protein. *Science* **289**, 1925–1928.
- Rangel A., Madronal N., Gruart A., Gavin R., Llorens F., Sumoy L., Torres J. M., Delgado-García J. M. and Del Rio J. A. (2009) Regulation of GABA(A) and glutamate receptor expression, synaptic facilitation and long-term potentiation in the hippocampus of prion mutant mice. *PLoS One* **4**, e7592.
- Sanchez-Soriano N., Travis M., Dajas-Bailador F., Goncalves-Pimentel C., Whitmarsh A. J. and Prokop A. (2009) Mouse ACF7 and drosophila short stop modulate filopodia formation and microtubule organisation during neuronal growth. *J. Cell Sci.* **122**, 2534–2542.
- Santos T. G., Silva I. R., Costa-Silva B., Lepique A. P., Martins V. R. and Lopes M. H. (2011) Enhanced neural progenitor/stem cells self-renewal via the interaction of stress-inducible protein 1 with the prion protein. *Stem Cells* **29**, 1126–1136.
- Santuccione A., Sytnyk V., Leshchynska I. and Schachner M. (2005) Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* **169**, 341–354.
- Satoh J. and Yamamura T. (2004) Gene expression profile following stable expression of the cellular prion protein. *Cell. Mol. Neurobiol.* **24**, 793–814.
- Satoh J., Kuroda Y. and Katamine S. (2000) Gene expression profile in prion protein-deficient fibroblasts in culture. *Am. J. Pathol.* **157**, 59–68.
- Schmalzbauer R., Eigenbrod S., Winoto-Morbach S., Xiang W., Schutze S., Bertsch U. and Kretschmar H. A. (2008) Evidence for an association of prion protein and sphingolipid-mediated signaling. *J. Neurochem.* **106**, 1459–1470.
- Schmitt-Ulms G., Legname G., Baldwin M. A. *et al.* (2001) Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. *J. Mol. Biol.* **314**, 1209–1225.

- Schrock Y., Solis G. P. and Stuermer C. A. (2009) Regulation of focal adhesion formation and filopodia extension by the cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>). *FEBS Lett.* **583**, 389–393.
- Shmerling D., Hegyi I., Fischer M. *et al.* (1998) Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell* **93**, 203–214.
- Solis G. P., Schrock Y., Hulsbusch N., Wiechers M., Plattner H. and Stuermer C. A. (2012) Reggies/flotillins regulate E-cadherin-mediated cell contact formation by affecting EGFR trafficking. *Mol. Biol. Cell* **23**, 1812–1825.
- Spielhauer C. and Schatzl H. M. (2001) PrP<sup>C</sup> directly interacts with proteins involved in signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **276**, 44604–44612.
- Steele A. D., Emsley J. G., Ozdinler P. H., Lindquist S. and Macklis J. D. (2006) Prion protein (PrP<sup>C</sup>) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 3416–3421.
- Steele A. D., Lindquist S. and Aguzzi A. (2007) The prion protein knockout mouse: a phenotype under challenge. *Prion* **1**, 83–93.
- Sugiyama K., Nishide K., Matsuo H., Okigawa S., Okano M., Ishitani T., Matsumoto K. and Itoh M. (2010) Delta1 family members are involved in filopodial actin formation and neuronal cell migration independent of Notch signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **398**, 118–124.
- Takenawa T. and Miki H. (2001) WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J. Cell Sci.* **114**, 1801–1809.
- Taylor D. R. and Hooper N. M. (2006) The prion protein and lipid rafts. *Mol. Membr. Biol.* **23**, 89–99.
- Toni M., Spisni E., Griffoni C., Santi S., Riccio M., Lenaz P. and Tomasi V. (2006) Cellular prion protein and caveolin-1 interaction in a neuronal cell line precedes Fyn/Erk 1/2 signal transduction. *J. Biomed. Biotechnol.* **2006**, 69469.
- Viles J. H., Klewpatinond M. and Nadal R. C. (2008) Copper and the structural biology of the prion protein. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 1288–1292.
- Westaway D., DeArmond S. J., Cayetano-Canlas J., Groth D., Foster D., Yang S. L., Torchia M., Carlson G. A. and Prusiner S. B. (1994) Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins. *Cell* **76**, 117–129.
- Zafar S., von Ahsen N., Oellerich M., Zerr I., Schulz-Schaeffer W. J., Armstrong V. W. and Asif A. R. (2011) Proteomics approach to identify the interacting partners of cellular prion protein and characterization of Rab7a interaction in neuronal cells. *J. Proteome Res.* **10**, 3123–3135.

## SUPPLEMENTARY FIGURE 1



**Supplementary Figure 1. Regulation of PrP<sup>C</sup> expression levels after transient silencing and overexpression in N2a cells.** RT-qPCR analysis of N2a cells transfected for 24 hours with Scramble, siRNA-PrP<sup>C</sup>, pcDNA and pcDNA-PrP<sup>C</sup>. Samples were normalized by the relative expression of GAPDH.

**SUPPLEMENTARY FIGURE 2**

**Supplementary Figure 2.** List of regulated genes in the microarray analysis. Mapped ID regulated in the microarray analysis after transient PrP<sup>C</sup> silencing and overexpression using a 1.5 fold change threshold and a false discovery rate at 5%.

siRNA-PrPc / scramble					
Total ID (Mapped & unmapped)		1.5 Fold Change	Total ID (Mapped & unmapped)		1.5 Fold Change
A630046C11Rik		1,59	D330037H05Rik		1,78
A630082K20Rik		1,63	D3Jfr1		1,82
A930008A22Rik		1,55	D7ErtD156e		1,54
Aacs		2,00	D8ErtD325e		1,55
Acas2		1,91	Dazap2		1,98
Actn4		1,81	Diras2		1,62
Actn4		1,69	Dpysl5		1,64
Adam9		1,73	E130304D01		1,72
Agps		1,68	E2f2		1,61
Ahcy1		1,57	E430024F02Rik		1,52
AI429612		1,60	E430030L01Rik		1,65
AI854251		1,50	Eif1ay		1,57
Ampd3		2,03	Eif4a1		1,84
Arpc1a		1,66	Elavl3		1,59
Arpc1a		1,60	Elovl6		1,96
Atp1b1		1,78	Emp1		1,69
AU016693		1,73	Facf5		1,55
Aurkb		1,87	Fbxw5		1,71
AW046396		1,53	Fliih		1,81
B230209E15Rik		1,51	Flot2		2,00
B3bp		1,91	Fmnl2		2,19
Basp1		1,90	Fmnl2		2,01
Basp1		1,55	Fubp1		1,72
BC010304		1,62	Gabrb3		2,67
BC061928		1,73	Gabrb3		1,73
BC065123		1,56	Gap43		3,96
Bcas1		1,50	Gnao		1,61
Bdh		1,81	Gng10		1,56
Bloc1s1		1,79	Gpr22		1,67
Bloc1s1		1,74	Grc3f		1,55
Bmi1		1,55	Grip1		1,59
BQ952480		1,82	Gtf2h1		1,52
C130033B18Rik		1,51	Gtf3a		2,01
C330023M02Rik		1,52	Gtf3a		1,61
C920011N12Rik		1,61	H2afz		2,04
Camk1d		1,55	Hist1h1c		1,79
Ccne1		1,67	Hmgb1		1,68
Ccne2		1,74	Hmgcs1		1,86
Cdk2		1,60	Hrb		1,60
Cdk2		1,52	Hspa2		2,15
Cdk2		1,52	Hspca		1,51
Cdk8		1,51	Iap		1,63
Chic2		2,28	Idh1		2,68
Chic2		1,66	Idh1		1,94
CKlfsf7		1,52	Igsf4a		1,65
Cox10		1,78	Ina		1,52
Crmp1		1,61	Insig1		1,75
Csnk1g3		1,77	Insig1		1,60
Cyb561		2,68	Jup		2,19
Cyp51		1,61	Lbr		2,28
D10ErtD438e		1,93	LOC208092		1,57
D12Wsu95e		1,81	LOC209405		1,56
D2Bwg1356e		1,80	LOC223594		1,61

LOC225456	1,96	Sdcbp	1,64
LOC233401	1,60	Sdcbp	1,54
LOC238943	1,62	Sdpr	1,68
LOC268569	2,57	Sertad4	1,55
LOC269401	2,01	Sfmbt2	2,24
LOC271505	1,87	Sfrs3	1,77
LOC276809	1,54	Sfrs3	1,61
LOC277016	1,69	Slc2a6	1,52
LOC280487	1,70	Slc6a6	1,76
LOC328703	1,64	Smarca3	1,50
LOC331102	1,63	Smc211	1,84
LOC331259	1,50	Smpd3	1,74
LOC381269	1,85	Snap25	1,56
LOC382020	2,04	Snopc3	1,59
LOC382063	1,84	Snx27	1,76
LOC382911	1,50	Socs2	1,62
LOC383189	1,98	Sort1	1,73
LOC385780	1,69	Sqle	1,92
LOC386218	1,54	Sqle	1,79
Lrrn3	1,71	Srebf2	2,66
Lss	2,08	Srebf2	1,50
Marcks	2,50	Ssa2	1,89
Mbnl1	1,72	Ssbp4	1,95
Mbnl2	1,71	Stmn2	1,77
Mest	2,06	Stx7	1,67
Mod1	1,55	Sult4a1	1,75
Mtch2	1,59	Syn2	1,67
Mycbp	1,95	Syt1	1,82
Myt1	1,83	Syt4	1,52
Nap115	1,54	Tcf4	1,58
Ncam1	1,63	Tiam1	1,68
Nckap1	1,68	Tm7sf2	1,61
Nme7	1,74	Top1	1,52
Nos3as	1,81	Ttc19	2,03
Nsdhl	1,94	Ttc8	1,66
Nsdhl	1,65	Tuba1	1,55
Ogfr	2,54	Twsg1	2,24
Pak4	1,64	Txndc1	1,80
Papss1	1,66	Ubc	1,60
Peg3	1,56	Ubl3	1,62
Phf10	1,63	Usp52	1,61
Phf10	1,55	Vapa	1,79
Phf2	2,27	Wdr6	1,75
Pkia	1,61	Wdt3-pending	2,24
Plekhc1	1,52	Wnt5a	1,52
Pop4	1,57	Zcchc12	2,03
Ppm1d	1,50	Zdhhc12	1,64
Prkx	2,16	Zfp265	1,58
Prom1	2,47	Actn2	-1,59
Ptbp2	1,77	Adpgk	-1,53
Rab11a	1,51	Adprt12	-1,52
Rab7	2,97	Akr7a5	-1,57
Rab7	1,75	Anapc13	-1,65
Rab7	1,66	Arbp	-2,41
Rbms1	1,54	Arrdc4	-1,76
Rnf38	1,52	Atp5k	-1,55
Rtn4	1,73	Atp6v1f	-1,52
Rutbc2	1,82	AW539964	-1,92
Sc4mol	1,67	B930041F14Rik	-1,79
Scamp1	2,03	BC006705	-1,63
Scarb2	1,58	BC008155	-1,80
Scd1	1,54	BC046404	-1,54
Scm1	1,53	Bfar	-1,62

C130022K22Rik	-1.62	Ndufs5	-1.62
C330018L13Rik	-1.57	Nfyb	-1.78
Ccdc5	-1.59	Nola3	-1.67
Cecr5	-1.50	Nrm	-2.04
Cenph	-1.53	Pbx2	-1.68
Cggbp1	-1.53	Pdcd5	-1.51
Chchd7	-1.58	Pfdn5	-1.70
Cnot4	-1.58	Pfdn5	-1.61
Cox17	-1.52	Phlda1	-1.52
Cox6a1	-1.57	Plekhh1	-1.98
Cox6b	-1.73	Polr2l	-1.67
Cox6b	-1.56	Ppp1r11	-1.74
Cox7a2	-1.77	Prnp	-3.54
Cox8a	-1.53	Rnaseh2a	-1.60
Cstb	-1.64	Rpl18a	-1.55
D10Erd322e	-1.54	Rpl28	-1.50
D11Moh34	-1.55	Rpl31	-1.91
D1Bwg1363e	-1.53	Rpl35a	-1.53
D930001122Rik	-1.51	Rpl38	-1.79
Dctn1	-1.51	Rpp38	-1.73
Dctn6	-1.63	Rps6ka2	-1.56
Dguok	-1.86	Scand1	-1.68
Dpm3	-1.52	Sec61b	-1.57
Dtymk	-1.50	Shfdg1	-1.51
Dusp8	-1.56	Slc20a2	-1.89
Egr1	-1.91	Snag1	-1.51
Ethe1	-1.53	Stx8	-1.68
Fjx1	-1.57	Stx8	-1.52
Gnai2	-1.95	Tceb2	-1.52
Gstz1	-2.19	Tcte3	-1.83
Guca1a	-1.57	Timm13a	-1.54
Hexa	-1.61	Timm8b	-1.62
Hist1h3b	-2.40	Tnfrsf12a	-1.73
Hist1h3c	-1.65	Tomm7	-1.57
Hist1h3d	-1.81	Tyms	-1.51
Hist1h3e	-2.71	Ubl5	-1.53
Hist1h3i	-1.84	Upf3a	-1.52
Hist1h4a	-1.53	Uqcr	-1.58
Hist1h4f	-1.79	Wrb	-2.07
Hist1h4j	-1.92	Xpnpep1	-1.53
Hist1h4m	-1.57	Yif1	-1.52
Hist2h2be	-1.78	Zdhhc4	-1.59
Icam2	-1.60	Zfp238	-1.66
Krtcap2	-1.55	Zfpm1	-1.72
Lamp2	-1.68	Zfyve9	-1.51
LOC208768	-1.61		
Mmrp19	-1.53		
Mrpl14	-1.74		
Mrpl46	-1.52		
Mrps18a	-1.55		
Mrps21	-1.78		
Mrps28	-1.54		
Mrps33	-1.53		
MTERF	-1.64		
Ndufa1	-1.64		
Ndufa11	-1.67		
Ndufa2	-1.66		
Ndufa3	-1.86		
Ndufa5	-1.59		
Ndufb3	-1.60		
Ndufb9	-1.63		
Ndufc1	-1.56		
Ndufs3	-1.57		

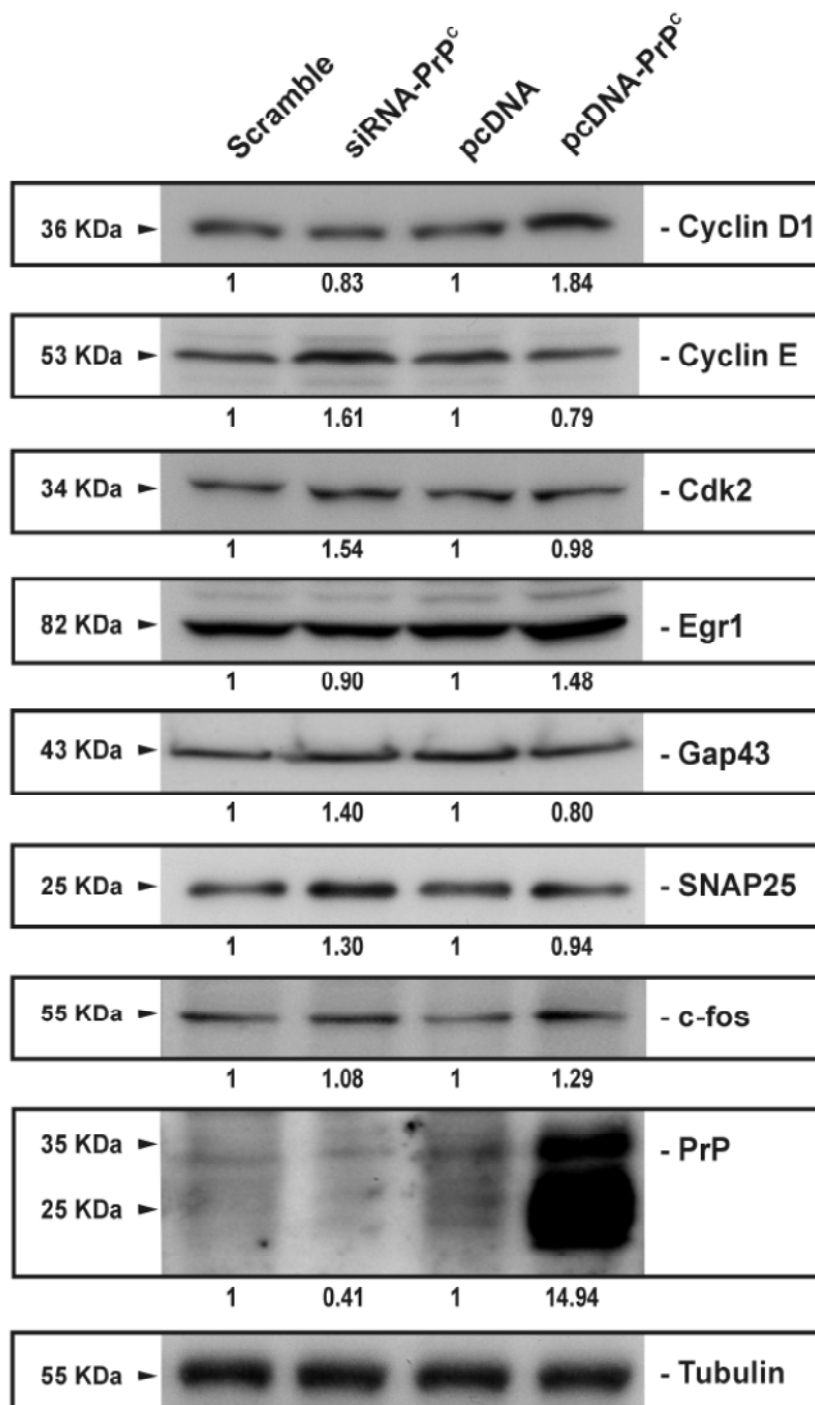
pcDNA-PrPc / pcDNA			
Total ID (Mapped & unmapped)	1.5 Fold Change	Total ID (Mapped & unmapped)	1.5 Fold Change
A130028H19Rik	1,88	Gadd45g	1,55
A130095C03Rik	1,71	Git25d1	1,53
A530025E09Rik	1,78	Gns	1,81
A530032J19Rik	3,98	Gstp1	1,63
A630084D02Rik	2,27	Gstp1	1,55
A830081L15Rik	3,75	H2afy	1,58
A930005G04Rik	1,69	H2-T23	2,14
A930027G11Rik	1,65	H47	1,64
Actb	1,50	Hexa	1,51
Akt1s1	1,86	Hist1h1a	1,64
Aldh5a1	1,50	Hist1h1b	1,78
Ap3d1	1,58	Hist1h1c	1,59
Arnt	5,53	Hist1h2ab	1,88
Ars2	1,53	Hist1h2ab	1,77
Atf3	1,61	Hist1h2ae	1,73
Atp6v0d1	1,58	Hist1h2be	1,99
Atp6v1f	1,59	Hist1h2bf	3,74
B230342N21Rik	1,95	Hist1h2bh	3,16
Bat2	1,53	Hist1h2bj	3,19
Bax	1,52	Hist1h2bk	3,35
BC050254	1,67	Hist1h2bl	3,22
Bcap37	1,58	Hist1h2bm	3,21
Brd2	1,55	Hist1h2bn	3,07
C130020C07Rik	4,34	Hist1h2bp	3,67
C130087G11Rik	1,55	Hist1h3b	2,47
C330046E03	1,61	Hist1h3d	2,54
Cdkn2a	1,81	Hist1h3e	3,12
Cdkn2a	1,63	Hist1h3h	1,91
Comt	1,52	Hist1h3i	2,04
Copeb	1,78	Hist1h4a	4,64
Cox6a2	1,67	Hist1h4a	2,48
Cox6c	1,55	Hist1h4b	1,61
Cox8a	1,55	Hist1h4b	1,52
Cpt1b	1,60	Hist1h4c	2,17
D030019N20Rik	2,72	Hist1h4d	3,63
D030026J11Rik	1,58	Hist1h4d	1,94
D10Wsu52e	1,55	Hist1h4f	2,53
D430006A07Rik	1,51	Hist1h4f	2,45
D630024O03Rik	1,60	Hist1h4h	2,92
D730044K07Rik	2,15	Hist1h4h	2,86
D830019K05Rik	2,34	Hist1h4i	3,68
Ddit3	1,59	Hist1h4j	4,60
Ddx21	1,56	Hist1h4j	2,98
Ddx24	1,76	Hist1h4k	3,17
Dpm2	1,71	Hist1h4k	3,13
Dusp8	1,67	Hist1h4m	3,73
E130112E08Rik	2,37	Hist1h4m	2,90
E430003J01Rik	6,19	Hist2h2aa1	5,24
E430033B07Rik	2,07	Hist2h2aa2	4,07
Eif3s4	1,75	Hist2h2ab	2,54
Elac2	1,51	Hist2h2be	2,71
Enah	2,19	Hist2h3b	2,55
Fkbp11	1,52	Hist2h4	1,70
Fos	1,71	Hist3h2ba	2,16
Fts	1,66	Hist4h4	1,89
Fv1	1,70	Hmox1	2,44
G1p2	1,58	Hspc171	1,55

Icosl	1,54	Serf2	1,55
Idb2	2,85	Sh3bgrl3	1,51
Idb3	1,54	Siat7b	5,24
Il1rl1l	1,59	Slc11a1	4,62
Isg20	1,75	Slc39a1	1,53
Junb	1,69	Smcx	4,14
Jund1	1,55	Srr	6,06
Lgals3	1,59	Srr	3,55
LOC213480	1,10	Stmn4	1,85
LOC236469	4,85	Taf15	1,59
LOC239727	1,84	Tax1bp3	1,54
LOC268730	1,67	Tax1bp3	1,53
LOC270017	3,19	Tceb2	1,51
LOC280487	1,70	Tcta	1,54
LOC329521	1,59	Tegt	1,66
LOC332788	1,82	Tesc	1,68
LOC382163	1,80	Tmem24	1,58
LOC383125	1,87	Tmod3	1,87
LOC383131	1,54	Tnfrsf12a	1,54
LOC384348	1,71	Ttc11	1,57
LOC385256	1,62	Txnlp	2,10
LOC385274	1,78	Ube2l3	1,76
LOC385505	1,57	Ube2l3	1,73
LOC386294	1,69	Ube2s	1,60
LOC386380	1,80	Ubtf	1,67
Lsm7	1,54	Unc5b	2,00
Map1lc3a	1,80	Vapb	1,91
Map1lc3b	1,72	Zbtb7	1,50
Mapbpip	1,57	Zfp99	1,57
Mrpl33	1,58	Zfp99	1,51
Mrpl54	1,59	A130082N24Rik	-1,82
Mrps12	1,63	A230103N10Rik	-1,60
Mrps18a	1,59	A730008H23	-1,51
Mrps28	1,54	Aacs	-1,57
mt-Co2	1,50	Acadm	-1,56
Myd116	2,22	Adam9	-1,64
NA	2,72	Adk	-1,73
NA	2,68	Adnp	-1,50
NA	2,04	A1848100	-1,50
NA	1,92	Akap11	-1,58
NA	1,73	Appbp1	-1,54
NA	1,54	Arfgef1	-1,64
NA	1,54	Arl6	-1,57
Ndufa8	1,59	Asah1	-1,68
Ndufs8	1,59	Asah1	-1,63
Nfic	1,64	Asns	-1,64
Nr1d1	1,86	Atad1	-1,61
Ormdl3	1,71	Atp5f1	-1,52
Pdrg1	1,59	Atp6a1	-1,55
Phpt1	1,66	Atp6ap2	-1,81
Pmf1	1,65	Atp6v1c1	-1,75
Polr2l	1,55	AU021838	-1,54
Pramel4	4,02	Aurkb	-1,72
Psmb5	1,59	AW549877	-1,60
Psmc5	1,51	Axot	-1,56
Psmf1	1,51	B130055D15Rik	-1,55
Purb	2,43	B230382K22Rik	-1,60
Rad23a	1,78	B630009I04Rik	-1,70
Raly	1,67	BC003885	-1,57
Rasgef1b	1,51	BC016423	-1,61
Rps13	1,53	BC020002	-1,56
Rtn2	1,54	BC031748	-1,50
Sepw1	1,81	Bcat1	-1,69

Bmi1	-2,28	Hace1	-1,52
Bmpr1a	-1,55	Hat1	-1,53
Bxdc1	-1,65	Hectd1	-1,58
C130033B18Rik	-2,02	Hmgcr	-1,80
C230050J15Rik	-1,58	Hnrph1	-1,99
C630007L23Rik	-1,52	Hnrph1	-1,93
C80879	-1,58	Hnrph1	-1,92
Cacybp	-1,50	Hnrph1	-1,84
Cbx3	-2,06	Hnrpk	-1,65
Ccnc	-1,67	Hnrpk	-1,59
Ccnc	-1,55	Hook1	-1,63
Ccne2	-2,23	Hprt	-1,68
Cdk2	-1,84	Hrb	-1,89
Cdk2	-1,67	Hrbl	-1,50
Cdk2	-1,62	Idh1	-2,60
Chrna3	-1,53	Idh1	-2,32
Ckap2	-1,56	Insig1	-1,69
Cnih	-1,50	Insig1	-1,58
Crsp9	-1,57	Ireb2	-1,51
Cugbp1	-1,63	Irs1	-1,54
Cyp51	-2,07	Isi1	-1,63
Cyp51	-1,78	Ivns1abp	-1,91
D0Kist3	-1,62	Kif3a	-1,54
D130064H19Rik	-1,53	Kpna2	-1,64
D2Bwg1356e	-1,51	Ldlr	-1,79
D330037H05Rik	-1,61	LOC209405	-1,60
D6Wsu176e	-1,52	LOC218696	-1,95
Dars	-2,06	LOC219049	-1,70
Dck	-1,80	LOC223586	-1,80
Ddc	-1,61	LOC223594	-1,87
Ddx50	-1,72	LOC224147	-1,60
Dnajc2	-1,62	LOC224632	-1,66
Dock11	-1,52	LOC225456	-1,85
Dusp6	-1,57	LOC237877	-1,57
E130303B06Rik	-1,87	LOC244421	-1,58
E2f2	-1,72	LOC245020	-1,88
E430026C09Rik	-1,61	LOC245423	-1,95
E430030L01Rik	-1,57	LOC245668	-1,70
Eif4g2	-1,64	LOC270186	-1,55
Eif5	-1,84	LOC277193	-1,51
Eif5b	-1,56	LOC328703	-1,76
Eml4	-1,50	LOC328752	-1,83
Enah	-1,55	LOC331259	-1,67
Etfa	-1,68	LOC380631	-1,53
Etfa	-1,67	LOC380634	-2,29
F830002E14Rik	-6,84	LOC380665	-1,66
F830029L24Rik	-1,62	LOC381054	-1,73
Fbxo11	-1,75	LOC381327	-2,23
Fign	-1,75	LOC381490	-1,82
Fjx1	-1,51	LOC381760	-1,67
Fmnl2	-1,84	LOC382003	-1,78
Fmnl2	-1,80	LOC382230	-1,78
Fnbp1	-1,58	LOC383249	-1,65
Fxr1h	-1,62	LOC98434	-1,55
Gas5	-1,82	Lrp8	-1,58
Gdi3	-1,56	Ltap	-1,58
Gemin6	-1,56	Lypla1	-1,60
Glb1	-2,08	Mat2a	-1,61
Git28d1	-1,72	Matr3	-1,50
Gpiap1	-1,77	Mbnl1	-1,58
Gria2	-1,58	Metap2	-1,68
Gsr	-1,56	Mrps31	-1,52
Gtpbp4	-1,74	Msh6	-1,50

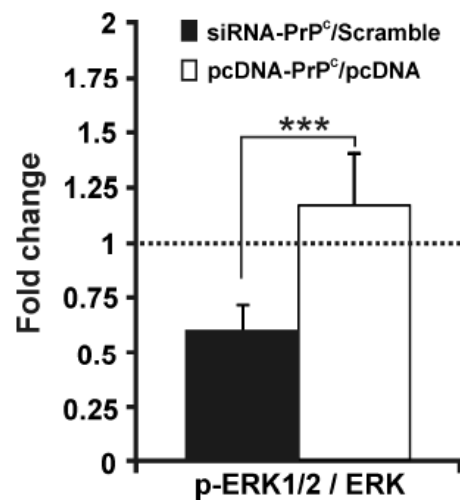
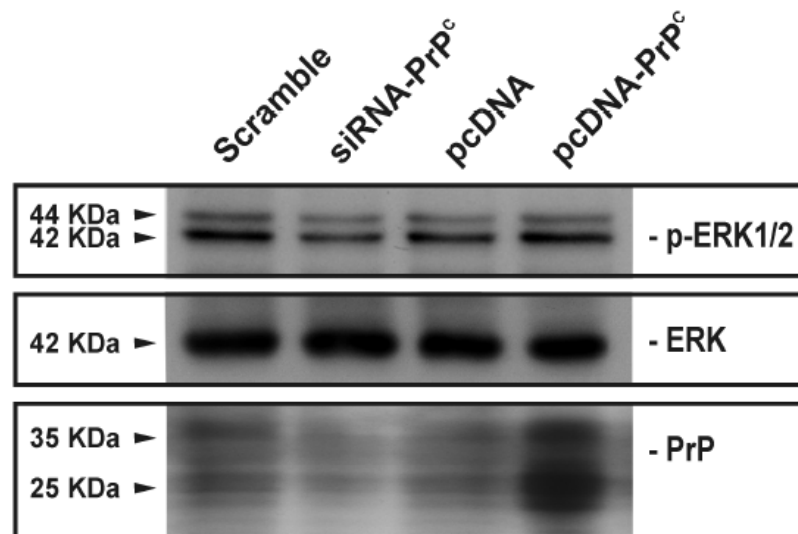
Msn	-1,50	Sgk	-1,54
Mtap1b	-1,60	Sgol2	-2,32
Mtch2	-2,02	Shcbp1	-1,90
Mtf2	-1,57	Siah1a	-1,53
mt-Nd5	-2,00	Siah1b	-1,56
Myo5a	-1,56	Slc35a3	-1,58
NA	-1,93	Slc39a6	-1,59
NA	-1,71	Slc40a1	-1,60
NA	-1,62	Slc4a8	-1,95
NA	-1,61	Slc6a15	-1,62
NA	-1,61	Smc2l1	-1,99
NA	-1,60	Snap25	-1,53
NA	-1,55	Snx2	-1,82
NA	-1,50	Snx2	-1,53
Nab1	-1,58	Spnb2	-1,55
Naca	-1,62	Spnr	-1,65
Napg	-1,53	Sqle	-1,92
Nasp	-1,89	Sqle	-1,68
Nfib	-1,55	Ssfa2	-1,56
Nsdhl	-1,55	Stard4	-1,90
Orc5l	-2,28	Sucla2	-1,51
Orc5l	-2,26	Sumo1	-1,70
Osbpl9	-1,58	Syncrip	-1,59
Otx1	-1,75	Tcp1	-2,46
Parg	-1,70	Tcp1	-1,67
Pea15	-1,75	Tmpo	-1,63
Peli1	-1,50	Top1	-1,51
Pfkip	-1,64	Top2a	-2,26
Pkia	-1,59	Traf4	-1,50
Plscr1	-1,52	Tuba1	-1,54
Pmp22	-1,70	Ube2g1	-1,60
Ppfilbp1	-1,56	Uchl5	-2,34
Ppfilbp1	-1,55	Usp47	-1,59
Ppp1cb	-1,81	Vamp3	-1,70
Ppp3ca	-1,52	Vamp4	-1,54
Psat1	-1,87	Vegfa	-1,58
Psm1	-1,67	Xpot	-1,59
Psmc1	-1,66	Yme1l1	-1,58
Psmc13	-1,55	Zfml	-1,65
Psmc7	-1,51	Zfp238	-1,70
Rab11a	-1,59	Zfp238	-1,58
Rab6	-1,59	Zfp292	-1,81
Rapgef2	-1,80		
Rars	-1,53		
Rbbp7	-1,80		
Rbbp7	-1,63		
Rnf38	-1,67		
Rnf4	-1,70		
Rock1	-1,60		
Rod1	-1,62		
Sc4mol	-1,78		
Scd1	-1,74		
Scd2	-1,53		
Schip1	-1,58		
Sdcbp	-1,71		
Sdpr	-1,72		
Sec61a2	-1,62		
Sept_15	-1,53		
Sept_15	-1,53		
Sertad4	-1,52		
Sfrs10	-1,94		
Sfrs10	-1,70		
Sfrs5	-1,65		

## SUPPLEMENTARY FIGURE 3

**Supplementary Figure 3. Validation of microarray and RT-qPCR data by western blot.**

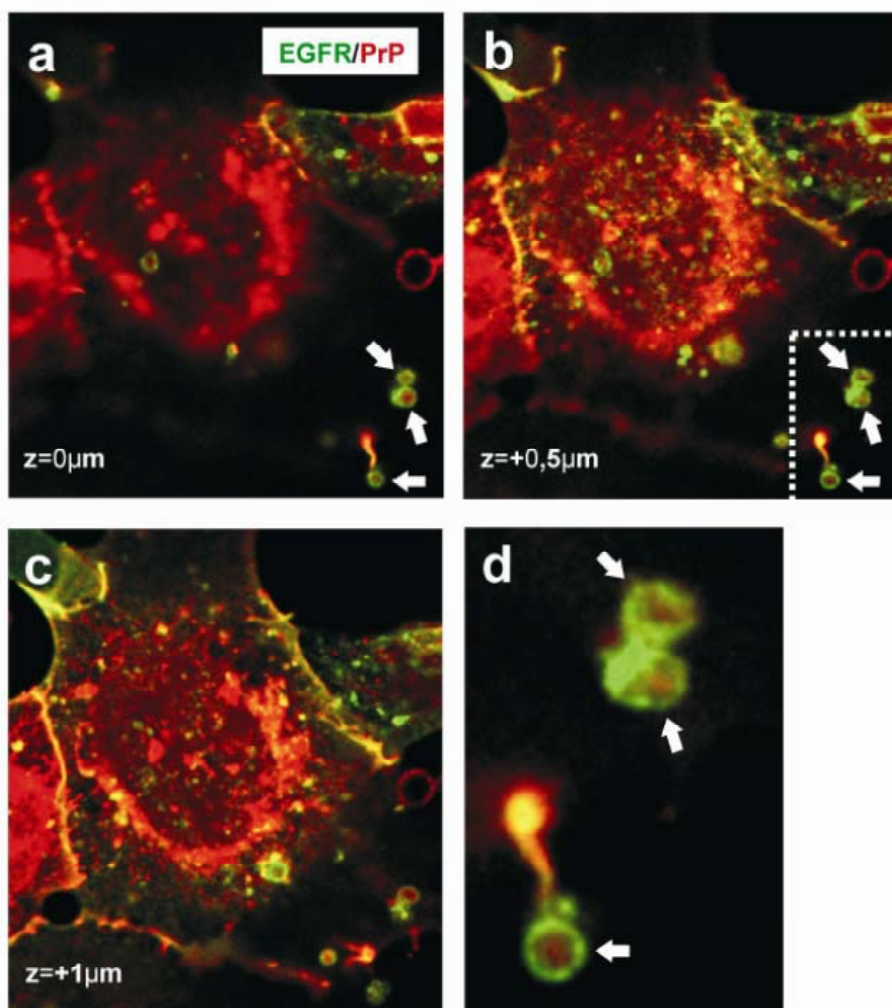
Western blot analysis of N2a cells transfected for 24 hours with Scramble, siRNA-PrP<sup>C</sup>, pcDNA and pcDNA-PrP<sup>C</sup>. A selection of proteins whose genes were differentially expressed after PrP<sup>C</sup> modulation is shown. Fold change is expressed relative to controls.

## SUPPLEMENTARY FIGURE 4



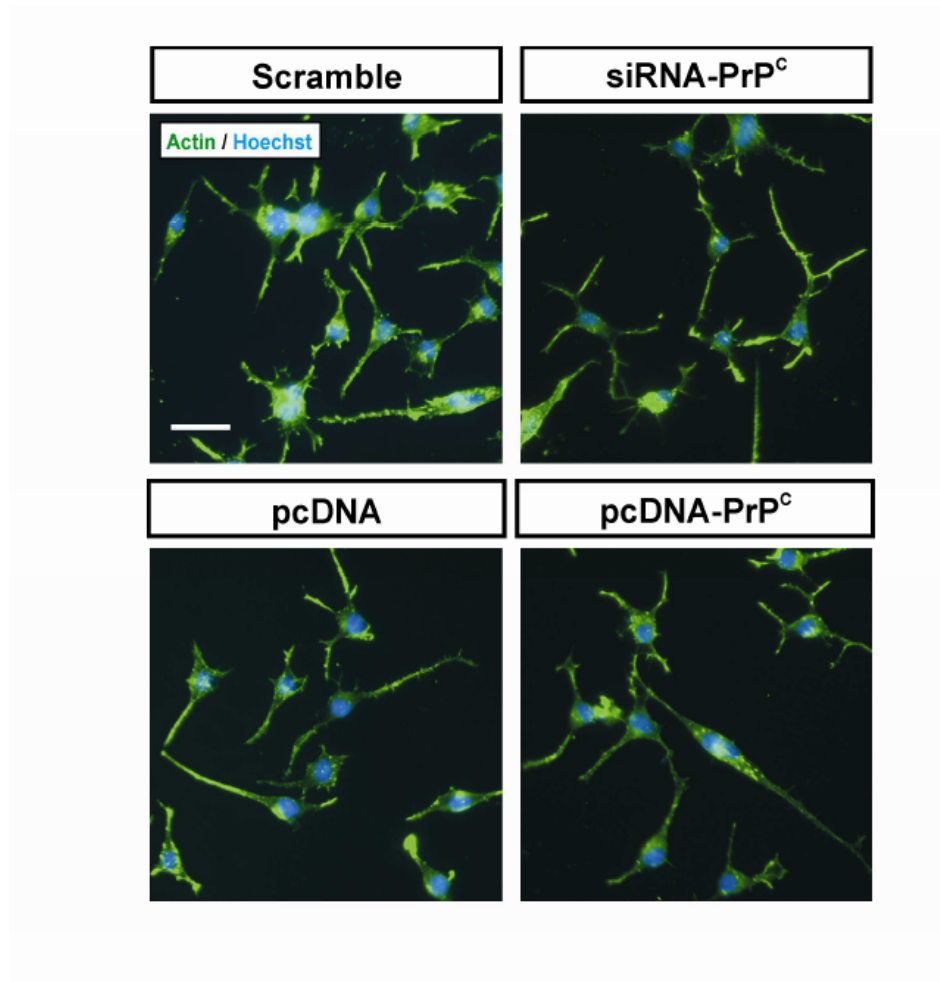
**Supplementary Figure 4. Regulation of ERK1/2 activity by PrP<sup>c</sup> expression in SK-N-SH cells.** Western blot analysis of SK-N-SH cells transfected for 24 hours with Scramble, siRNA-PrP<sup>c</sup>, pcDNA and pcDNA-PrP<sup>c</sup>, developed with p-ERK1/2 and ERK antibodies. Densitometric analyses of five independent experiments are shown (\*\*\*) p < 0.001, ANOVA test).

## SUPPLEMENTARY FIGURE 5



**Supplementary Figure 5. PrP<sup>C</sup> and EGFR co-localization in vesicles of A431 cells.** (a-c) Confocal consecutive 0.5 μm thick sections of A431 cells transfected with PrP<sup>C</sup> to determine the distribution of endogenous EGFR expression and PrP<sup>C</sup>. Arrows point to vesicles containing both proteins. (d) Magnification of the boxed area in B.

## SUPPLEMENTARY FIGURE 6



**Supplementary Figure 6. Neuritogenesis in serum-starved N2a.** N2a cells were transfected with Scramble, siRNA-PrP<sup>C</sup>, pcDNA and pcDNA-PrP<sup>C</sup> for 24 hours. Cells were serum-starved for another 24 hours, fixed and immunostained for anti-actin and stained with Hoechst. A total of 400 cells were analyzed for each condition. Scale bar: 20  $\mu$ m.

## SUPPLEMENTARY FIGURE 7

Gene		Sequence (5' -> 3')	Length
Pmp	Forward	AGTCGTTGCCAAAATGGATCA	21
	Reverse	AAAAACCAACCTCAAGCATGTGG	23
ccnd1	Forward	CCAAGTTCCTTAGCAAGCTG	20
	Reverse	CTTTCATGTCACAGGGCAGA	20
Cdkn2a	Forward	GCTCAACTACGGTGCAGATTC	21
	Reverse	GCACGATGTCTTGATGTCCC	20
ccne2	Forward	TCAGCCCTTGCATTATCATTGAA	23
	Reverse	CCAGCTTAAATCTGGCAGAGG	21
ldb2	Forward	ATGAAAGCCTTCAGTCCGGTG	21
	Reverse	AGCAGACTCATCGGGTCGT	19
Gap43	Forward	TCTGCTACTACCGATGCAGC	20
	Reverse	TGGAGGACGGGGAGTTATCAG	21
Snx2	Forward	CCTTGGACAGTCCCGAAAGAG	21
	Reverse	CGGATCTGACACACCAATTTCT	22
Nsdhl	Forward	AAGGTGTAAGCACAGTTTTCCA	22
	Reverse	GCAGGTTTCAATGACAGTCTTGG	23
Nm1	Forward	ACGACAAGACGAACATCAAGAC	22
	Reverse	GGAAATCCTCCCAGTATGTGC	21
Cdk2	Forward	CCTGCTTATCAATGCAGAGGG	21
	Reverse	TGCGGGTCACCATTTACGC	19
c-fos	Forward	ATCGGCAGAAGGGGCAAAGTAG	22
	Reverse	GCAACGCAGACTTCTCATCTTCAAG	25
Egr1	Forward	AGCGAACAACCCTATGAGCAC	21
	Reverse	TCGTTTGGCTGGGATAACTCG	21
Insig1	Forward	AGCCTAGTGCTCTTCTCATTGG	23
	Reverse	AGGGATACAGTAAACCGACAACA	23
Lbr	Forward	GAGCCACGACAACAAATCCA	21
	Reverse	AGCTGGAAATCGAGCCACTTT	21
Txnip	Forward	TCTTTTGAGGTGGTCTTCAACG	22
	Reverse	GCTTTGACTCGGGTAACTTCACA	23
Appbp1	Forward	GCTGCCAGGTATTGGATCAT	20
	Reverse	GCTCGGTTCTTGCCAATACT	20
Akap12	Forward	CTCTCTCCCCTCAATCCTCTA	21
	Reverse	TGAAGCAGGGATCTGTTCGAT	21
ATF3	Forward	GAGGATTTTGTAACTGACACC	23
	Reverse	TTGACGGTAACTGACTCCAGC	21
ldh1	Forward	ATGC AAGGAGATGAAATGACACG	23
	Reverse	GCATCACGATTCTCTATGCCTAA	23
AurKB	Forward	TTGTCCAGAGAGTCTACGG	21
	Reverse	TTGTCAATAGTGAAAGGCTGCTT	23
Rab7	Forward	AGGCTTGGTGCTACAGGAAA	21
	Reverse	CTTGGCCCGGTCATTCTTGT	20
Aacs	Forward	CCTGGCGCTTGGGAATTACAA	21
	Reverse	CCGGACAGACCAGTGGTATAAG	22
Cyp51	Forward	TGACAGGAGGCAACTTGCTTT	21
	Reverse	GGCGAGACGGAACAGGTAG	19
SNAP25	Forward	GCAAGGCGAACAACCTGGAAC	20
	Reverse	GGCCACTACTCCATCCTGATT	21
Stx7	Forward	AGCACAACGCATCTCCTCTAA	21
	Reverse	TGAGGTGTTCCAAGTTGATTACG	23
Stx8	Forward	GACCCCTGGTTCTCCACATAC	21
	Reverse	TTGGGCTATCTGACACGTAGA	21
Tcp1	Forward	GGTCCGCTCCAGAATGTTAT	21
	Reverse	GGCTGCGGGATGTTCTACC	19
Sgol2	Forward	TCTCCTGTCAGCTACCAAGAAA	22
	Reverse	CAGGCTTGCACTGCTTACTG	20

Supplementary Figure 7. List of primers used in the study.

## PrP<sup>C</sup> ejerce su papel neuroprotector ante episodios epilépticos y muerte celular inducidos por KA a través de la modulación de la activación de JNK3 por unión de GluR6/7-PSD-95.

Patricia Carulla, Ana Bibrián, Alejandra Rangel, Rosalina Gavín, Isidro Ferrer, Carme Caelles, José Antonio del Río & Franc Llorens.

### Resumen:

La proteína priónica celular o PrP<sup>C</sup> es una glicoproteína de membrana, presente en el SNC y cuyo cambio conformacional da lugar a PrP<sup>SC</sup>, una forma patógena, de plegamiento anómalo, responsable del desarrollo de las EETs. Aunque todavía no está claro el papel de PrP<sup>C</sup> en el organismo, sí se le ha involucrado en diversos procesos neuronales, entre los que destaca un rol en el mantenimiento de la estructura sináptica. Existen evidencias de que la ausencia de PrP<sup>C</sup> produce un incremento de la excitabilidad neuronal y la excitotoxicidad, tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que sugiere su participación directa en la transmisión del impulso nervioso y en la regulación de los mecanismos de muerte celular. Más concretamente, se ha descrito que PrP<sup>C</sup> actúa sobre los receptores de NMDA inhibiendo su neurotransmisión, pues los modelos de ratón transgénico *knockout* para PrP<sup>C</sup> muestran una muerte celular incrementada en respuesta a NMDA. Lo mismo se ha observado ante otros agentes excitotóxicos como el kainato (KA).

En este estudio, demostramos que la neurotoxicidad inducida por KA en el ratón *Prnp*<sup>0/0</sup> es dependiente de la activación de la vía de JNK3. La eliminación de esta quinasa en un fondo *Prnp-knockout* (*Prnp*<sup>0/0</sup> *Jnk3*<sup>0/0</sup>) revierte tanto el fenotipo como la muerte celular observada tras el tratamiento con KA. De la misma manera, el bloqueo farmacológico de la actividad JNK3 reproduce este mismo efecto *in vitro*, sobre rodajas de hipocampo.

Por otro lado, nuestros datos también muestran, por primera vez, una regulación de la actividad de JNK3 dependiente de la interacción de PrP<sup>C</sup> con la proteína PSD-95 y GluR6/7 en los *rafts* lipídicos. Esto indica, por un lado, la ubicación postsináptica de PrP<sup>C</sup> y, por otro, la participación de esta proteína en la modulación del complejo GluR6/7-PSD-95-MLK3. Nuestros resultados sugieren que, en ausencia de PrP<sup>C</sup> y tras tratamiento con KA, se favorece la formación de este complejo trimérico y la consecuente activación de la vía JNK3 de muerte celular. Nuestros datos permiten concluir que PrP<sup>C</sup> ejerce un papel neuroprotector ante la excitotoxicidad por KA a través de la regulación de la neurotransmisión mediada por GluR6/7.

### Referencia:

Carulla P, Bribian A, Rangel A, Gavín R, Ferrer I, Caelles C, Del Río JA, Llorens F (2011) Neuroprotective role of PrP<sup>C</sup> against kainate-induced epileptic seizures and cell death depends on the modulation of JNK3 activation by GluR6/7-PSD-95 binding. *Molecular biology of the cell* 22:3041-3054.



# Neuroprotective role of PrP<sup>C</sup> against kainate-induced epileptic seizures and cell death depends on the modulation of JNK3 activation by GluR6/7–PSD-95 binding

Patricia Carulla<sup>a,b,c</sup>, Ana Bribián<sup>a,b,c</sup>, Alejandra Rangel<sup>a,b,c,\*</sup>, Rosalina Gavín<sup>b,c</sup>, Isidro Ferrer<sup>c,d</sup>, Carme Caelles<sup>e,f</sup>, José Antonio del Río<sup>a,b,c</sup>, and Franc Llorens<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>Molecular and Cellular Neurobiotechnology, Institute for Bioengineering of Catalonia, Barcelona, Spain; <sup>b</sup>Department of Cell Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>c</sup>Center for Biomedical Research in Neurodegenerative Diseases, Barcelona, Spain; <sup>d</sup>Institute of Neuropathology, Bellvitge Biomedical Research Institute, University of Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>e</sup>Cellular Signalling, Institute for Research in Biomedicine, Barcelona, Spain; <sup>f</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain

**ABSTRACT** Cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) is a glycosyl-phosphatidylinositol-anchored glycoprotein. When mutated or misfolded, the pathogenic form (PrP<sup>Sc</sup>) induces transmissible spongiform encephalopathies. In contrast, PrP<sup>C</sup> has a number of physiological functions in several neural processes. Several lines of evidence implicate PrP<sup>C</sup> in synaptic transmission and neuroprotection since its absence results in an increase in neuronal excitability and enhanced excitotoxicity *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, PrP<sup>C</sup> has been implicated in the inhibition of N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)-mediated neurotransmission, and prion protein gene (*Prnp*) knockout mice show enhanced neuronal death in response to NMDA and kainate (KA). In this study, we demonstrate that neurotoxicity induced by KA in *Prnp* knockout mice depends on the c-Jun N-terminal kinase 3 (JNK3) pathway since *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup> mice were not affected by KA. Pharmacological blockage of JNK3 activity impaired PrP<sup>C</sup>-dependent neurotoxicity. Furthermore, our results indicate that JNK3 activation depends on the interaction of PrP<sup>C</sup> with postsynaptic density 95 protein (PSD-95) and glutamate receptor 6/7 (GluR6/7). Indeed, GluR6–PSD-95 interaction after KA injections was favored by the absence of PrP<sup>C</sup>. Finally, neurotoxicity in *Prnp* knockout mice was reversed by an AMPA/KA inhibitor (6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione) and the GluR6 antagonist NS-102. We conclude that the protection afforded by PrP<sup>C</sup> against KA is due to its ability to modulate GluR6/7-mediated neurotransmission and hence JNK3 activation.

Monitoring Editor  
Ramanujan Hegde  
National Institutes of Health

Received: Apr 13, 2011  
Revised: Jun 21, 2011  
Accepted: Jun 29, 2011

This article was published online ahead of print in MBoC in Press (<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E11-04-0321>) on July 14, 2011.

\*Present address: Laboratory of Persistent Viral Diseases, Rocky Mountain Laboratories, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Hamilton, MT 59840.

Address correspondence to: Franc Llorens ([fllorens@ibec.pcb.uib.cat](mailto:fllorens@ibec.pcb.uib.cat)), José Antonio del Río ([jadelrio@ibec.pcb.uib.es](mailto:jadelrio@ibec.pcb.uib.es)).

Abbreviations used: AP-1, activator protein-1; DNQX, 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione; ERK, extracellular regulated kinase; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GluR6/7, glutamate receptor 6/7; JNK3, c-Jun N-terminal kinase 3; KA, kainate; NMDA, N-methyl-D-aspartic acid; NR2D, N-methyl-D-aspartate receptor subtype 2; PI, propidium iodide; *Prnp*, prion protein gene; PrP<sup>C</sup>, cellular prion protein; PSD-95, postsynaptic density 95 protein.

© 2011 Carulla et al. This article is distributed by The American Society for Cell Biology under license from the author(s). Two months after publication it is available to the public under an Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported Creative Commons License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>); "ASCB®," "The American Society for Cell Biology®," and "Molecular Biology of the Cell®" are registered trademarks of The American Society of Cell Biology.

## INTRODUCTION

The abnormal processing of cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) gives rise to PrP<sup>Sc</sup>, or pathogenic prion, which is the etiologic agent of several transmissible spongiform encephalopathies (reviewed in Aguzzi et al., 2007; Aguzzi and Calella, 2009; Linden et al., 2008). These devastating encephalopathies are characterized by severe histological changes, including extensive neuronal death, reactive gliosis, and neuroinflammation, concomitant to the accumulation of the aggregated misfolded form of PrP<sup>C</sup> in affected brains. Although necessary for prion propagation and infectivity (Weissmann et al., 1994), the repertoire of physiological roles of PrP<sup>C</sup> remains to be fully determined. Indeed, PrP<sup>C</sup> has been implicated in a wide range of neural functions, such as copper homeostasis (Brown et al., 1997, 1998; Vassallo and Herms, 2003), neurotransmission (Maglio et al., 2004;

Prestori et al., 2008; Rangel et al., 2009), stem-cell proliferation and differentiation (Steele et al., 2006), malignant glioma proliferation (Erlich et al., 2007), neurite outgrowth (Chen et al., 2003; Santuccion et al., 2005), and, more recently, putative cross-talk between neurodegenerative diseases (Lauren et al., 2009; Gavin et al., 2010; Gunther and Strittmatter, 2010).

Early in vitro studies with prion protein gene *Prnp*<sup>0/0</sup> mice (Zürich I) (Bueler et al., 1992) showed that cultured *Pmp*<sup>0/0</sup> neurons were more prone to die than *Prnp*<sup>+/+</sup> neurons after serum withdrawal or other treatments (Kawahara et al., 1999). Subsequent studies (Brown et al., 2002; Rambold et al., 2008; Aude-Garcia et al., 2011) indicated that PrP<sup>C</sup> might play a neuroprotective function in the context of excitotoxic lesions. Indeed, it was demonstrated in rats that *Prnp* is overexpressed in ischemic brains and protects cortical neurons after ischemia (McLennan et al., 2004; Shyu et al., 2005; Spudich et al., 2005; Weise et al., 2006; Mitteregger et al., 2007). In fact, cells overexpressing PrP<sup>C</sup> show increased toxicity after endoplasmic reticulum stress (Anantharam et al., 2008). Neuroprotective effects of PrP<sup>C</sup> after central nervous system insults have been associated with both extracellular and intracellular effectors (e.g., the stress-induced-phosphoprotein 1) (Zanata et al., 2002) and are mediated by PI3K-mTOR signaling (Martins et al., 2010; Roffe et al., 2010). However, although it is involved in Alzheimer's disease (Lauren et al., 2009), PrP<sup>C</sup> does not act as a major modulator in a panel of neurodegenerative disease models (Steele et al., 2009).

In neurons, PrP<sup>C</sup> has been localized in axons at the synapse (Fournier et al., 2000; Fournier, 2008), which might be consistent with reports of deficits in neurotransmission in *Pmp* knockout mice (Maglio et al., 2004, 2006; Khosravani et al., 2008; Prestori et al., 2008; Rangel et al., 2009). Indeed, PrP<sup>C</sup> knockout mice are more prone to cell death after kainate (KA) injections than are *Prnp*<sup>+/+</sup> animals (Walz et al., 1999; Rangel et al., 2007, 2009). In addition, *Prnp*<sup>0/0</sup> neurons are also highly susceptible to acute N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) or KA treatment in hippocampal slices (Rangel et al., 2007; Khosravani et al., 2008). These findings suggest that PrP<sup>C</sup> can modulate signaling cascades by activating stress-protective pathways, or by inhibiting cytotoxic pathways (reviewed in Westergaard et al., 2007; Nicolas et al., 2009). Although the exact mechanism(s) are unknown, the neuroprotective function may be associated with differential expression of glutamate receptor subunits or the modulation of ligand/receptor affinities (Maglio et al., 2004; Khosravani et al., 2008; Rangel et al., 2009). In particular, it remains to be established whether PrP<sup>C</sup> alters KA receptor-mediated neurotransmission at the neuron membrane. In fact, PrP<sup>C</sup>-binding proteins include, among others, membrane receptors (Rutishauser et al., 2009), and two recent studies reported cell-specific effects of glutamate and the role of PrP<sup>C</sup> in these processes. Indeed, group I metabotropic glutamate receptors are involved in the transduction of cellular signals triggered by PrP<sup>C</sup>, which modulates neurite outgrowth (Beraldo et al., 2011). In addition, in NMDA-mediated toxicity, the protective role of PrP<sup>C</sup> is mediated by the silencing of NMDA receptors containing N-methyl-D-aspartate receptor subtype 2 (NR2D) subunits (Khosravani et al., 2008).

In a previous study, we reported the increased presence of phosphorylated c-Jun N-terminal kinase 3 (JNK) in dying pyramidal neurons in the CA1 of the hippocampus of *Pmp* knockout mice after KA treatment (Rangel et al., 2007). Here we show that KA-induced excitotoxicity in *Pmp* knockout mice depends on JNK3 activity, by developing a double-knockout mouse lacking PrP<sup>C</sup> and JNK3 expression and analyzing it by using gene expression and pharmacological approaches. Furthermore, we propose a mechanism by which PrP<sup>C</sup> regulates the KA receptor function through interaction,

at the postsynaptic level, with the glutamate receptor 6/7 (GluR6/7) and the postsynaptic density 95 protein (PSD-95), which in turn modulates JNK3 activity.

## RESULTS

### Enhanced susceptibility to KA-induced seizures in *Prnp* knockout mice and its reversion in *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup> mice

The thresholds for onset of seizure behavior in response to identical intraperitoneal KA injections (6 mg/kg body weight) in the four mouse genotypes *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup>, *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup>, *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup>, and *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup> were analyzed. After the first KA injection, *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> animals developed profound hypoactivity and immobility (grades I–II). After successive injections, hyperactivity (grade III) and scratching (grade IV) were often observed. Some mice progressed to a loss of balance control (grade V) and further chronic whole-body convulsions (grade VI). The bouncing activity commonly referred to as “popcorn” behavior was included in grade VI. After the behavioral study, mice were numbered and kept in separate boxes until histological or biochemical studies; see later discussion. Twelve hours after KA treatment, *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> and *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup> animals showed normal behavior. KA-treated *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup> mice displayed hypoactivity, immobility, and sensitivity to external stimuli (e.g., box handling) (Table 1).

*Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> mice were highly susceptible to KA, showing a greater number (from five to eight) of severe seizures (grade VI). In addition, they maintained grade IV–VI seizures for 2–3 h after the first episode, whereas *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> and *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup> mice displayed only grade III seizure. Furthermore, three *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> animals died during the experiments. These data corroborate previous results (Walz et al., 1999; Rangel et al., 2007, 2009) indicating increased sensitivity to KA in *Prnp* knockout mice. We established that the minimal concentration of KA required to induce seizures in the *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> animals was 35–40 mg/kg body weight, which is similar to that required for *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup>. At this concentration, all *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> animals died shortly after a second injection. These results suggested an active role of JNK3 in *Prnp*<sup>0/0</sup> susceptibility to KA. Indeed, *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup> and *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup> mice were not affected by KA treatment as described (Yang et al., 1997).

### Decreased seizures in *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup> mice correlated with lower number of dying cells in the hippocampus

Protein expression was analyzed by Western blot (Figure 1A), which showed that PrP<sup>C</sup> expression was similar in *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> and *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup> mice. In addition, JNK3 expression was similar in *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> and *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> mice, and neither of these proteins was detected in the double-knockout mice, as expected (Figure 1A). Next we analyzed in more detail the time course of the seizure score after KA injection (Figure 1B). *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> mice showed maximum scores (V–VI) between 90 and 180 min after the first KA injection. To determine whether the severity of seizure observed in *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> correlates with neuronal loss and reactive glial changes in the hippocampus after KA injection, we carried out several histochemical and immunohistochemical analyses (Figure 1, C and D).

First, we analyzed the pattern of neurodegeneration in the *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup>, *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup>, and *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup> mice 24 h after KA treatment by using Fluoro-Jade B staining (Schmued and Hopkins, 2000; Figure 1C). Numerous Fluoro-Jade B–positive pyramidal neurons were observed in the CA1 and CA3 regions of *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> hippocampus. In the other genotypes Fluoro-Jade B labeling was rare and generally pale (Figure 1C). To further corroborate the death of these neurons, we applied in parallel

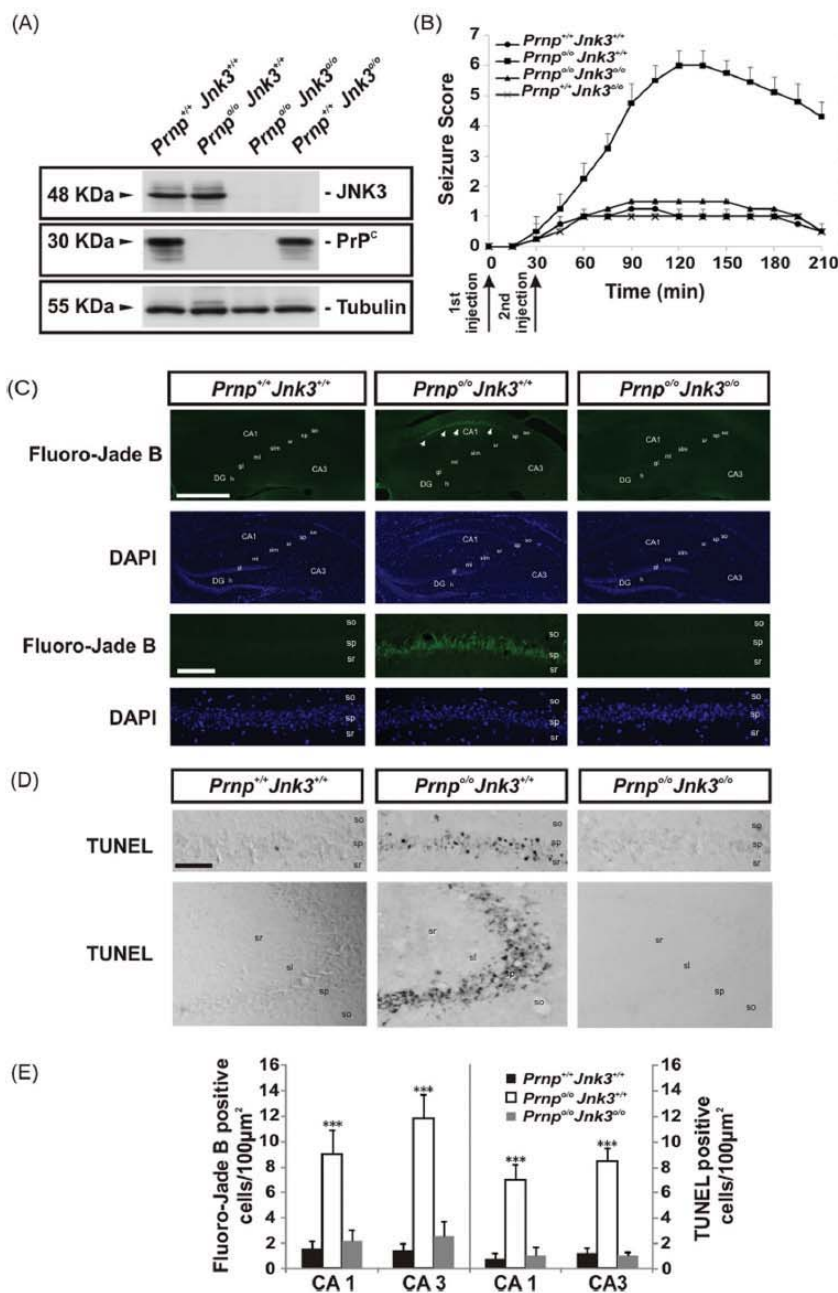
Genotype.	Animal	Number of seizures	Number of blinkings	Behavioral stages	Prioritary stage
<i>Prnp<sup>+/+</sup>Jnk3<sup>+/+</sup></i>	1	1	0	I-II	II
<i>Prnp<sup>+/+</sup>Jnk3<sup>+/+</sup></i>	2	0	0	I-II	II
<i>Prnp<sup>+/+</sup>Jnk3<sup>+/+</sup></i>	3	1	1	I-II	II
<i>Prnp<sup>+/+</sup>Jnk3<sup>+/+</sup></i>	4	1	0	I-II	II
<i>Prnp<sup>+/+</sup>Jnk3<sup>+/+</sup></i>	5	0	0	I-II	II
<i>Prnp<sup>+/+</sup>Jnk3<sup>+/+</sup></i>	6	0	0	I-II	II
<i>Prnp<sup>+/+</sup>Jnk3<sup>+/+</sup></i>	7	0	0	I-II	II
<i>Prnp<sup>+/+</sup>Jnk3<sup>+/+</sup></i>	8	0	0	I-II	II
<i>Prnp<sup>+/+</sup>Jnk3<sup>+/+</sup></i>	9	0	0	I-II	II
<i>Prnp<sup>+/+</sup>Jnk3<sup>+/+</sup></i>	10	1	0	I-III	II
<i>Prnp<sup>+/+</sup>Jnk3<sup>+/+</sup></i>	11	0	0	I-II	II
<i>Prnp<sup>+/+</sup>Jnk3<sup>+/+</sup></i>	12	0	0	I-II	II
<i>Prnp<sup>o/o</sup>Jnk3<sup>+/+</sup></i>	13	8	4	I-VI	†
<i>Prnp<sup>o/o</sup>Jnk3<sup>+/+</sup></i>	14	5	3	I-VI	IV-VI
<i>Prnp<sup>o/o</sup>Jnk3<sup>+/+</sup></i>	15	6	4	I-VI	V-VI
<i>Prnp<sup>o/o</sup>Jnk3<sup>+/+</sup></i>	16	6	3	I-VI	†
<i>Prnp<sup>o/o</sup>Jnk3<sup>+/+</sup></i>	17	5	2	I-VI	V-VI
<i>Prnp<sup>o/o</sup>Jnk3<sup>+/+</sup></i>	18	6	3	I-VI	†
<i>Prnp<sup>o/o</sup>Jnk3<sup>+/+</sup></i>	19	6	4	I-VI	V-VI
<i>Prnp<sup>o/o</sup>Jnk3<sup>+/+</sup></i>	20	5	2	I-VI	IV-VI
<i>Prnp<sup>o/o</sup>Jnk3<sup>+/+</sup></i>	21	4	2	I-VI	V-VI
<i>Prnp<sup>o/o</sup>Jnk3<sup>+/+</sup></i>	22	8	5	I-VI	V-VI
<i>Prnp<sup>o/o</sup>Jnk3<sup>+/+</sup></i>	23	6	3	I-VI	IV-VI
<i>Prnp<sup>o/o</sup>Jnk3<sup>+/+</sup></i>	24	7	5	I-VI	V-VI
<i>Prnp<sup>o/o</sup>Jnk3<sup>o/o</sup></i>	25	1	1	I-II	II
<i>Prnp<sup>o/o</sup>Jnk3<sup>o/o</sup></i>	26	2	0	I-II	II
<i>Prnp<sup>o/o</sup>Jnk3<sup>o/o</sup></i>	27	1	0	I-II	II
<i>Prnp<sup>o/o</sup>Jnk3<sup>o/o</sup></i>	28	0	0	I-II	II
<i>Prnp<sup>o/o</sup>Jnk3<sup>o/o</sup></i>	29	0	0	I-II	II
<i>Prnp<sup>o/o</sup>Jnk3<sup>o/o</sup></i>	30	0	0	I-II	II
<i>Prnp<sup>o/o</sup>Jnk3<sup>o/o</sup></i>	31	0	0	I-II	II
<i>Prnp<sup>o/o</sup>Jnk3<sup>o/o</sup></i>	32	2	2	I-III	II
<i>Prnp<sup>o/o</sup>Jnk3<sup>o/o</sup></i>	33	0	0	I-II	II
<i>Prnp<sup>o/o</sup>Jnk3<sup>o/o</sup></i>	34	1	1	I-II	II
<i>Prnp<sup>o/o</sup>Jnk3<sup>o/o</sup></i>	35	0	0	I-II	II
<i>Prnp<sup>o/o</sup>Jnk3<sup>o/o</sup></i>	36	0	0	I-II	II
<i>Prnp<sup>+/+</sup>Jnk3<sup>+/+</sup></i>	37	0	0	I-II	II
<i>Prnp<sup>+/+</sup>Jnk3<sup>+/+</sup></i>	38	0	0	I-II	II
<i>Prnp<sup>+/+</sup>Jnk3<sup>+/+</sup></i>	39	0	0	I-II	II
<i>Prnp<sup>+/+</sup>Jnk3<sup>+/+</sup></i>	40	0	0	I-II	II

See Results for stage classification.

TABLE 1: Effect of KA-induced status epilepticus and death in *Prnp<sup>+/+</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>*, *Prnp<sup>o/o</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>*, *Prnp<sup>o/o</sup>Jnk3<sup>o/o</sup>*, and *Prnp<sup>+/+</sup>Jnk3<sup>o/o</sup>* mice.

sections the in situ nick-translation technique with biotinylated-UTP to determine the DNA fragmentation level (TUNEL technique, by using ApopTag kit; Heatwole, 1999; Figure 1D). Distribution of TUNEL-positive nuclei largely correlated with the pattern of Fluoro-

Jade B labeling observed in the CA1 and CA3 of *Prnp<sup>o/o</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>* mice (Figure 1, D and E). Cell counts showed statistical significance (see *Materials and Methods* for details) when comparing data of *Prnp<sup>o/o</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>* mice with any of the other two genotypes.



**FIGURE 1:** KA-dependent sensitivity, seizure behavior, neurotoxicity and apoptosis in the different genotypes studied. (A) Western blot of JNK3, PrP<sup>C</sup>, and tubulin in protein extract from the hippocampi of the different mouse strains used in this study (*Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup>, *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup>, *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup>, and *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup>); tubulin was used as a loading control. (B) Comparison of seizure responses in littermates of *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup>, *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup>, *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup>, and *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup> mice to intraperitoneal injection of KA (6 mg/kg body weight) or 0.1 M PBS. KA-injection timing is indicated below the graph. Seizures were scored as indicated in *Materials and Methods*. Eight mice in each group were observed and scored to determinate the time-dependent seizure score. (C) Photomicrographs showing examples of the pattern of Fluoro-Jade B and DAPI staining of hippocampal region of *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup>, *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup>, and *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup> mice after 24 h of KA treatment. Dying cells positive for Fluoro-Jade B are located in the pyramidal cell layer of *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> (arrows). (D) Examples of TUNEL-positive cells in CA1–CA3 hippocampal regions of *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup>, *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup>, and *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup> mice after 24 h of KA treatment. (E) Quantification of Fluoro-Jade B and TUNEL-positive cells in the CA1 and CA3 regions of the hippocampus in *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup>, *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup>, and *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup> mice after 24 h

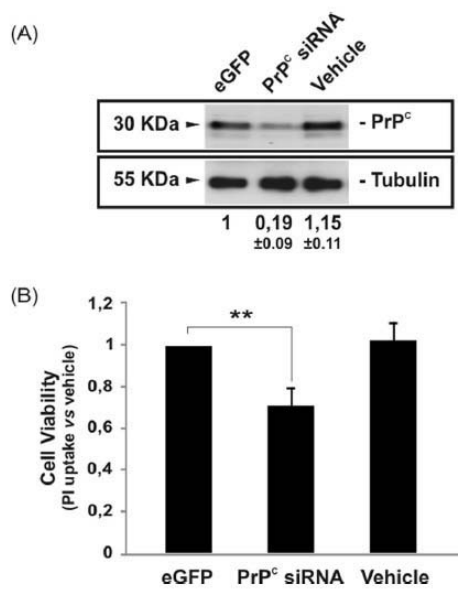
### Acute down-regulation of PrP<sup>C</sup> expression in *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> primary neuronal cultures increased susceptibility to KA

We examined whether the neurotoxic effects of KA are modified when PrP<sup>C</sup> expression levels are acutely altered in *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> neurons. Thus, *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> primary cortical neurons were infected with a lentivirus carrying a small interfering RNA (siRNA) interference sequence for *Prnp*. Cells infected with lentivirus showed an 81% decrease in PrP<sup>C</sup> expression (Figure 2A). After exposure to KA, cells infected with lentivirus showed a statistically significant 29% decrease in survival (Figure 2B) compared with parallel enhanced green fluorescent protein (eGFP)-infected cultures (Figure 2B). Thus, although similar data were previously described in neuroblastoma cells (N<sub>2</sub>A) using interference RNA against *Prnp* (Rangel et al., 2007), this is the first observation of KA-mediated cell death after acute PrP<sup>C</sup> down-regulation in *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> neurons. This finding reinforces the notion that decreased expression of PrP<sup>C</sup> compromises neuronal viability after acute KA treatment.

### Differential activation of JNK3 and extracellular regulated kinases 1/2 in *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> mouse hippocampus treated with KA

Because genetic deletion of *Jnk3* on a *Prnp*<sup>0/0</sup> background overcomes the intrinsic susceptibility to KA of PrP<sup>C</sup>-deficient mice, we next developed several experiments to identify changes in JNK3 activation in the hippocampus after KA treatment (Figure 3). Mice were injected with KA as described and killed 6 h later (see *Materials and Methods* for details). Activation of extracellular regulated kinase (ERK) 1/2, JNK3, c-Jun, and p53 was analyzed in protein samples from the hippocampus of treated mice by Western blot and compared with vehicle-injected mice. In the absence of KA, ERK1/2 was activated in *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> and *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup> hippocampus compared with *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> mice (Figure 3A). These data corroborate the reported data of

of KA treatment. Results are obtained from nine mice per genotype. DG, dentate gyrus; CA1–3, hippocampal regions 1 and 3; gl, granule cell layer; h, hilus; ml, molecular layer; sl, stratum lucidum; slm, stratum lacunosum-moleculare; so, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum. Scale bar, C, top, 200 µm; C, bottom, 100 µm; D, 100 µm. Asterisks in E indicate statistical significance (\*\*\*) (p < 0.001, ANOVA test).



**FIGURE 2:** Decrease in PrP<sup>C</sup> expression–enhanced KA neurotoxicity in primary hippocampal neurons. Primary hippocampal neurons were infected with lentivirus containing eGFP or siRNA for *Prnp* for 24 h. Next, neurons were treated with 150 μM KA for 8 h, and cell viability was analyzed after further 24 h with the WST-1 method as indicated in *Materials and Methods*. (A) Western blot for PrP<sup>C</sup> and tubulin expression after lentiviral infection with eGFP and siRNA *Prnp*. Note the decrease of the PrP<sup>C</sup> expression after lentiviral infection vs. vehicle and eGFP. (B) Histogram illustrating cell viability infection and KA exposure. No differences were observed between vehicle and eGFP. Data are expressed as fold increase ± SEM of three independent experiments. Asterisks in B indicate statistical significance (\*\*p < 0.01, ANOVA test).

ERK1/2 activation in *Prnp* knockout mice (Brown et al., 2002). In parallel to the phosphorylation of ERK1/2 in all genotypes after KA treatment, an increase in p-JNK3 and p-c-Jun Ser<sup>63</sup> was observed in *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> hippocampus (Figure 3A). This phosphorylation was undetectable in vehicle-treated mice and in *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup>, as well as in *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup> mice (Figure 3A) and *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup> (unpublished data), as expected. Total c-Jun protein was slightly increased in *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> but strongly increased in both *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> and *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup> after KA treatment (Figure 3A). Finally, p53, which was recently reported to be activated in a JNK-dependent manner in dying hippocampal neurons after glutamate and/or KA (Choi et al., 2011), was phosphorylated at Ser-15 and activated in *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> hippocampus after KA treatment.

These results suggest that signaling pathways other than the JNK3 pathway are activated after KA treatment. Indeed, we determined the cellular expression of ERK1/2 in detail in treated mice (Figure 3, B and C). p-ERK1/2 staining was strong in hippocampal mossy fibers at the *stratum lucidum* in *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> and *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup>, with low levels in *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup>, after 24 h of KA treatment. Double-labeling techniques with glial fibrillary acidic protein (GFAP) and p-ERK1/2 revealed a second group on p-ERK1/2–stained cells at CA1 and CA3 regions (Figure 3C). However, detailed observation of astroglial cells in these mutants revealed an increased reactivity of astrocytes in *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> hippocampus (relevant GFAP content and thick glial expansions), in contrast to moderate reactivity in *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup> and absence in *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> mice

(Figure 3D). Thus these data indicate that most p-ERK1/2 staining observed in *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> and *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup> after KA treatment is mainly associated with mossy fiber staining with the participation of GFAP-reactive cells.

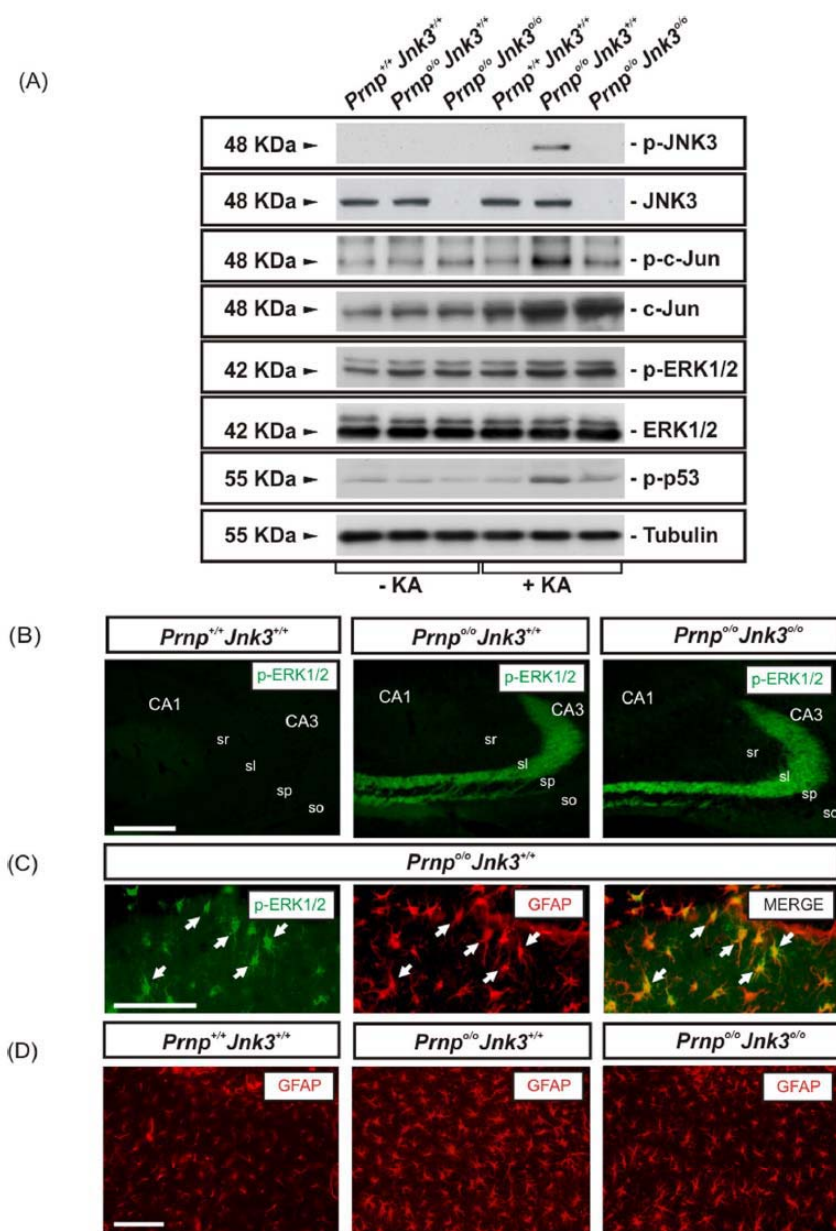
The JNK3 pathway is implicated in *c-fos* and *c-jun* activation after glutamate treatment (Brami-Cherrier et al., 2007). To discriminate the particular contribution of JNK3 to *c-jun* and *c-fos* expression in our experiments, we performed quantitative real-time PCR (RT-qPCR; Figure 4). Data obtained demonstrate that both *c-jun* and *c-fos* were overexpressed in the hippocampus of *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> mice 6 h after KA administration (4.10- and 49.2-fold increase, respectively; Figure 4A). Deletion of *Jnk3* in *Prnp*<sup>0/0</sup> mice offset the *c-jun* and *c-fos* increase by 34 and 25% respectively, compared with *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> levels. These results support the idea that other KA-activated pathways are the main contributors to the overexpression of both early genes. To examine this hypothesis, we analyzed the differential expression of cyclooxygenase-2 (*cox-2*), a molecular target of JNK activation in neurodegeneration and inflammation activated by activator protein-1 (AP-1; Hunot et al., 2004). RT-qPCR of *cox-2* revealed statistically significant overexpression in the *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> hippocampus after KA treatment. Furthermore, the stronger decrease of *cox-2* was observed in *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup> (60% compared with those reported by *c-jun* and *c-fos*) (Figure 4B). The results indicate that the absence of *Jnk3* is not the only factor mediating the early changes in gene expression mediated by KA.

**Pharmacological inhibition of JNK in *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> hippocampal slices overcame the neurotoxic effect of KA**

To ascertain whether neurotoxic differences are cell specific or associated with an increased glutamatergic input from the entorhinal cortex, we performed a parallel study in isolated hippocampal slices (Figure 5). *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> and *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> hippocampal slices were treated with KA or phosphate-buffered saline (PBS), following the addition (when indicated) of two different JNK inhibitors: the pharmacological inhibitor SP600125 and the peptide TAT-JIP, a specific inhibitor derived from the minimal JNK-binding region of the scaffold protein JNK-interacting protein 1 (JIP-1) coupled to the short cell-permeable TAT sequence (Bonny et al., 2001; Figure 5A). After propidium iodide (PI) incubation, we observed few randomly distributed, labeled cells in the CA1–CA3 of *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup>–derived hippocampal slices. However, *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> slices showed a statistically significant 71% increase of PI fluorescence compared to *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> cultures (Figure 5B). The inhibition of JNK activity with SP600125 and TAT-JIP in *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup>–derived slices decreased the fluorescence levels by 54 and 42%, respectively, compared with parallel KA-treated slices without the inhibitors (Figure 5, B and C). These data indicate that increased cell death of hippocampal *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> neurons is associated with intrinsic synaptic properties.

**Coimmunoprecipitation of PrP<sup>C</sup> with PSD-95 and GluR6/7 in the PSD fractions**

To investigate the participation of PrP<sup>C</sup> in the neurotoxic effects of KA, we examined whether PrP<sup>C</sup> exerts its neuroprotective function by modulating the intracellular signaling triggered by KA receptor after ligand binding. Because neuronal depolarization mediated by KA requires the interaction of the GluR6/7 subunit of KA receptor with PSD-95 and MLK3 to form a trimeric complex (Pei et al., 2006; Li et al., 2010), we analyzed biochemically the distribution of GluR6/7 and PrP<sup>C</sup> in the *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup>, *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup>, and *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup> hippocampus and whether changes in JNK3 alter the normal distribution of



**FIGURE 3:** KA-induced neurotoxicity in *Prnp* knockout hippocampal mouse correlates with JNK3 activation. (A) Western blot for p-JNK, JNK3, p-ERK1/2, ERK1/2, p-c-Jun, c-Jun, p-p53, and tubulin from hippocampus extracts of *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup>, *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup>, and *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup> mice after 6 h of KA treatment (6 mg/kg body weight). KA-induced neurotoxicity in the *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> hippocampus is cell-specific and dependent on JNK3 activity. (B) Photomicrograph illustrating the pattern of p-ERK1/2 in the different phenotypes after 24 h of KA treatment. Notice the relevant increase of p-ERK1/2 in *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> and *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup> hippocampus. (C) High magnification of the CA1 region of hippocampus from *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup>, after 24 h of KA treatment, immunostained with p-ERK1/2 and GFAP antibodies. Note that numerous cells are double labeled (arrows). (D) Photomicrograph illustrating examples of the CA1 region of the three genotypes analyzed after 24 h of KA treatment and immunostained for GFAP. Levels of reactive glia are not completely abolished by the genetic deletion of *Jnk3*. Abbreviations as in Figure 1. Scale bars, B, 150 μm; C, 100 μm; and D, 100 μm.

PrP<sup>C</sup>. Enriched PSD fractions were isolated from the hippocampus of *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup>, *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup>, and *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>0/0</sup> mice 6 h after administration of KA and processed for GluR6/7, PSD-95,

and PrP<sup>C</sup> by Western blot (Figure 6A). Correct purification of the PSD fractions was corroborated since the percentage of PSD-95 in this fraction was 91.6% of total PSD-95. Results revealed no changes in subcellular distribution of these proteins among genotypes. As expected, PrP<sup>C</sup> was detected in all cell compartments but enriched in PSD fractions, where GluR6/7 and PSD-95 were also found.

These results suggested a putative interaction between GluR6/7 and PrP<sup>C</sup>. To explore this possibility, we performed coimmunoprecipitation experiments from whole *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> hippocampus protein extracts and PSD fractions using two different PrP<sup>C</sup> antibodies (6H4 and SAF61; see *Materials and Methods*; Figure 6B). Results indicated that PrP<sup>C</sup> interacts with PSD-95 and GluR6/7 both in whole-hippocampus extracts and in purified PSD. As expected, both interactions were stronger in the PSD fraction (Figure 6B). Taken together, these results implicate PrP<sup>C</sup> in the binding of PSD-95 with the KA receptor containing GluR6/7. This would allow the formation of the ternary complex (GluR6/7–PSD-95–MLK3), which in turn activates the JNK3 pathway. Thus, to determine this, we immunoprecipitated PSD-95 in hippocampal protein extracts from *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> and *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> mice to measure the amount of GluR6/7 coimmunoprecipitated in the presence or absence of KA (Figure 6C). Immunoblots showed that the interaction between GluR6/7 and PSD-95 was higher in the hippocampus of *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> compared with *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> mice in the presence of KA (1.01 vs. 2.13, respectively; Figure 6C). Taken together, these data indicate that, in the absence of PrP<sup>C</sup>, KA treatment increased the binding of GluR6/7-containing KA receptors to PSD-95, which correlates with increased activation of JNK3.

**Increased KA-mediated neurotoxicity in *Prnp*<sup>0/0</sup> mice was reversed by 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione and NS-102**

To examine the role of GluR6/7 in KA-induced neurotoxicity in *Prnp*<sup>+/+</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> and *Prnp*<sup>0/0</sup>*Jnk3*<sup>+/+</sup> mice, we injected the AMPA/KA inhibitor 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX) and the GluR6 antagonist NS-102 (Verdoorn et al., 1994) prior to the intraperitoneal injection with KA (Figure 7). DNQX inhibits AMPA/KA receptors in vivo (Alford and Grillner, 1990) and inhibits JNK3 activation after excitotoxic insults (Tian et al., 2005), and NS-102 is a good functional antagonist of GluR6 in vivo in response to excitotoxic insults (Tian et al., 2005;

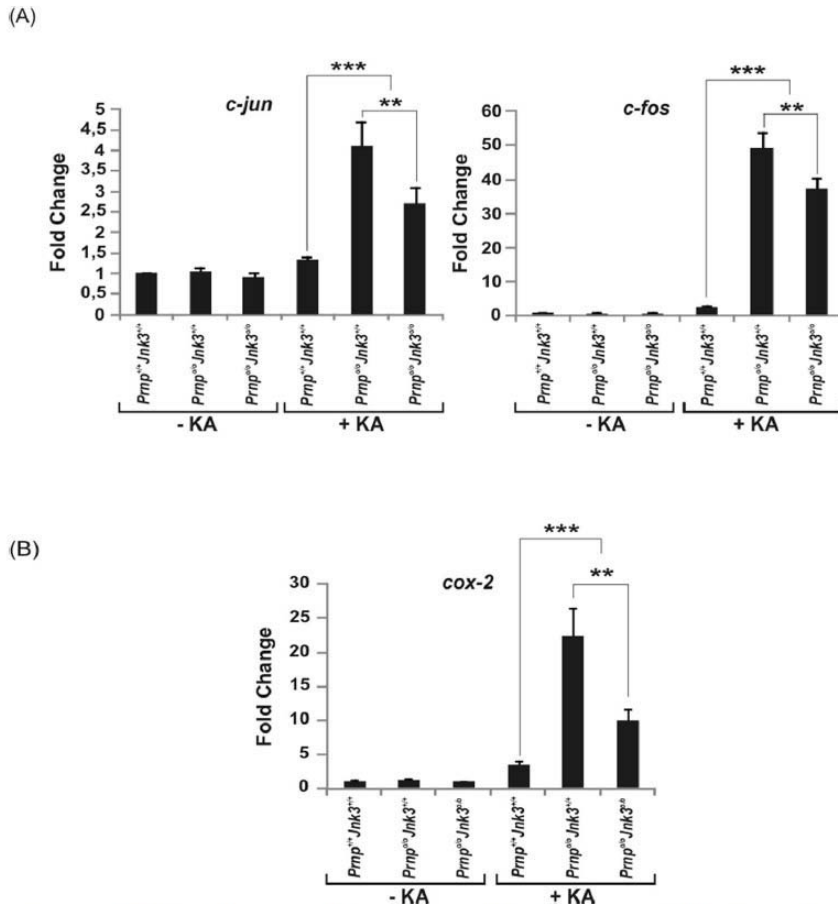


FIGURE 4: RT-qPCR of (A) *c-jun* and *c-fos* and (B) *cox-2* from hippocampal RNA extracts of *Prnp<sup>+/+</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>*, *Prnp<sup>0/0</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>*, and *Prnp<sup>0/0</sup>Jnk3<sup>0/0</sup>* mice treated with KA (6 mg/kg body weight) or buffer for 6 h. Data (mean ± SEM) represent mean fold induction obtained in three independent experiments. GAPDH was used as the housekeeping gene. Data are referred with *Prnp<sup>+/+</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>* in each histogram in the absence or presence of KA. Data are expressed as fold change ± SEM. Asterisks in A and B indicate statistical significance (\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , ANOVA test).

Hu et al., 2008; Chen et al., 2009). First, we counted the seizures and the blinking episodes in treated mice (Figure 7A). Pharmacological treatments indicate that preinjection with DNQX and, more effectively, with NS-102 reduced the number of all of the episodes counted in *Prnp<sup>0/0</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>* mice. *Prnp<sup>+/+</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>* mice were almost insensitive to KA, as described earlier (Figure 7A). Again, both treatments reduced the number of Fluoro-Jade B-positive cells in the hippocampus (Figure 7B) and the presence of p-c-Jun in *Prnp<sup>0/0</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>* hippocampus in Western blots (Figure 7C). In addition, we examined the effect of DNQX and NS-102 on c-Fos expression, which was overexpressed in the hippocampus of *Prnp<sup>0/0</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>* mice after KA injections (see earlier discussion). Blockage of both AMPA/KA receptors and GluR6 prevented c-Fos overexpression in CA1 (Figure 7D) and increased immunostaining of p-ERK1/2 in mossy fibers of *Prnp<sup>0/0</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>* (Figure 7E). Measure of the fluorescence in the mossy fibers with ImageJ software (square regions of interest of 75 × 75 μm, six measures per section) indicates a statistically significant reduction of 80 and 75% of p-ERK1/2 staining after DNQX and NS-102 treatments respective (Figure 7F).

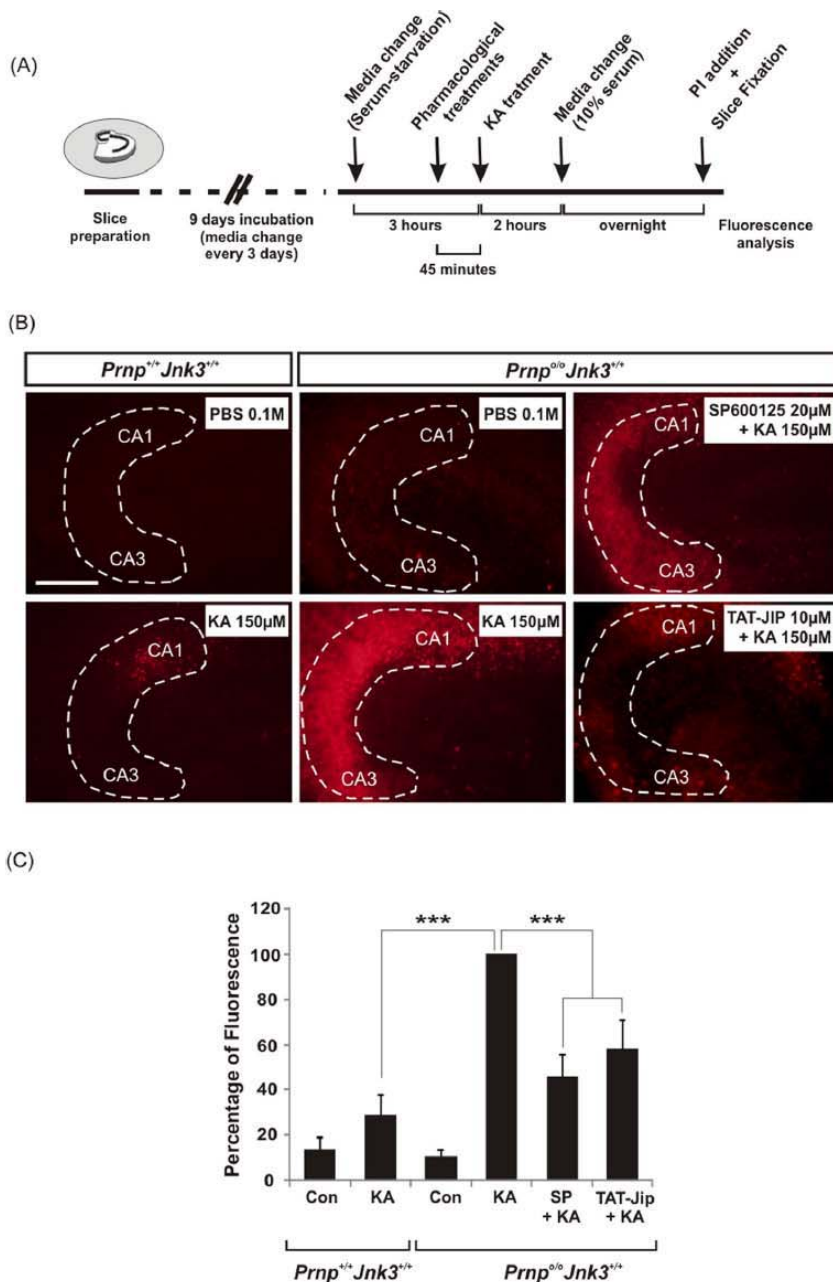
**DISCUSSION**

**Differential participation of ERK1/2, JNK3 kinases, and early gene expression in KA-mediated neuronal death in *Prnp<sup>0/0</sup>* mice**

In this study we demonstrate that abolition of JNK3 activity (either genetically or pharmacologically) blocks the neurotoxic activity induced by KA in *Prnp<sup>0/0</sup>* mice. These data indicate that the signal for neuronal cell death in *Prnp* knockout mice is mainly associated with JNK3 activity. In addition, to avoid the effects of the increased oxidative phenotype in absence of *Pmp* (Wong et al., 2001; Brown et al., 2002), we show that an acute decrease in PrPC expression in cultured neurons from *Prnp<sup>+/+</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>* mice also increased their susceptibility to KA. In fact, absence of *Jnk3* completely blocked the epileptogenic effects of KA in *Prnp<sup>+/+</sup>* mice, and the original *Jnk3<sup>0/0</sup>* mice were characterized as being resistant to KA, with similar scores to those reported here (Yang et al., 1997; de Lemos et al., 2010).

Although basal p-ERK1/2 is higher in *Prnp<sup>0/0</sup>* mice (Brown et al., 2002; Chiarini et al., 2002; Nicolas et al., 2007; Rangel et al., 2007; and present results), treatment with KA induces overphosphorylation of ERK1/2, which is not affected by the absence of *Jnk3*. In contrast, ERK1/2 activation is abolished in *Jnk3<sup>0/0</sup>* mice 3 h after KA treatment (de Lemos et al., 2010). Thus it is reasonable to consider that changes in p-ERK1/2 in *Prnp<sup>0/0</sup>Jnk3<sup>0/0</sup>* mice after KA treatment are mainly associated with the *Prnp<sup>0/0</sup>* background. p-ERK1/2 is expressed by mossy fibers of granule cells, as well as by reactive, GFAP-positive astrocytes, after KA treatment; in contrast, JNK activation mainly takes place in dying neurons (CA1–CA3 pyramidal neurons; Rangel et al., 2007).

Our histological and biochemical analyses demonstrate that an increased number of GFAP-positive cells can be seen in the double-knockout hippocampus without relevant cell death. These data also contrast with those obtained with *Jnk3<sup>0/0</sup>* mice (Yang et al., 1997; de Lemos et al., 2010). Although we cannot rule out an effect of activated p-ERK1/2/GFAP-positive astrocytes on JNK-activated dying neurons, it seems that intrinsic ERK1/2 phosphorylation (which is not blocked by deletion of *Jnk3*) in granule cells could participate in the sustained *c-jun* overexpression in response to KA in a *Prnp<sup>0/0</sup>* background. On the other hand, *c-jun* was upregulated in *Prnp<sup>0/0</sup>Jnk3<sup>0/0</sup>* mice after KA treatment, but no neurodegeneration was observed when compared with both *Prnp<sup>+/+</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>* and *Prnp<sup>0/0</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>* mice in brain sections when examined by different methods (Fluoro-Jade B or TUNEL). Thus c-Jun overexpression cannot be associated with cell death and needs to be phosphorylated by JNK3 to induce cell death. Indeed, JNK3 phosphorylates c-Jun at Ser-63 and Ser-73, and abrogation of c-Jun phosphorylation using alanine mutants for c-Jun at Ser-63 and Ser-73 confers resistance to epileptic seizures and neuronal apoptosis induced by KA (Behrens et al., 1999). On the other hand, *c-fos* was upregulated only in dying *Prnp<sup>0/0</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>*



**FIGURE 5:** KA-enhanced neurotoxicity in *Prnp* knockout organotypic slices correlates with JNK3 activation. (A) Schematic diagram illustrating the experimental procedure. The hippocampi of *Prnp<sup>+/+</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>* and *Prnp<sup>0/0</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>* animals were dissected and cultured in transwells until drug treatment and afterward analyzed by PI uptake. (B) Examples of PI uptake in organotypic hippocampal slice cultures from *Prnp<sup>+/+</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>* and *Prnp<sup>0/0</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>* mice treated with 0.1 M PBS or 150 μM KA for 2 h in the presence or absence of JNK inhibitors SP600125 (20 μM) and TAT-JIP (10 μM) as indicated. Twenty-four hours after treatment slices were incubated with PI. Note the incorporation of PI in dying cells in KA-treated slices from *Prnp<sup>0/0</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>* mice. (C) Histogram illustrating quantitative results of A. Histograms represent the mean ± SEM of three independent experiments. Asterisks in C indicate statistical significance (\*\*\*) *p* < 0.001, ANOVA test). Abbreviations as in Figure 1. Scale bars, B, 100 μm.

cells, and *Jnk3* deletion did not totally decrease *c-fos* levels, suggesting its implication in different KA-signaling mechanisms. In addition, our data also implicate p53 in these results since phosphory-

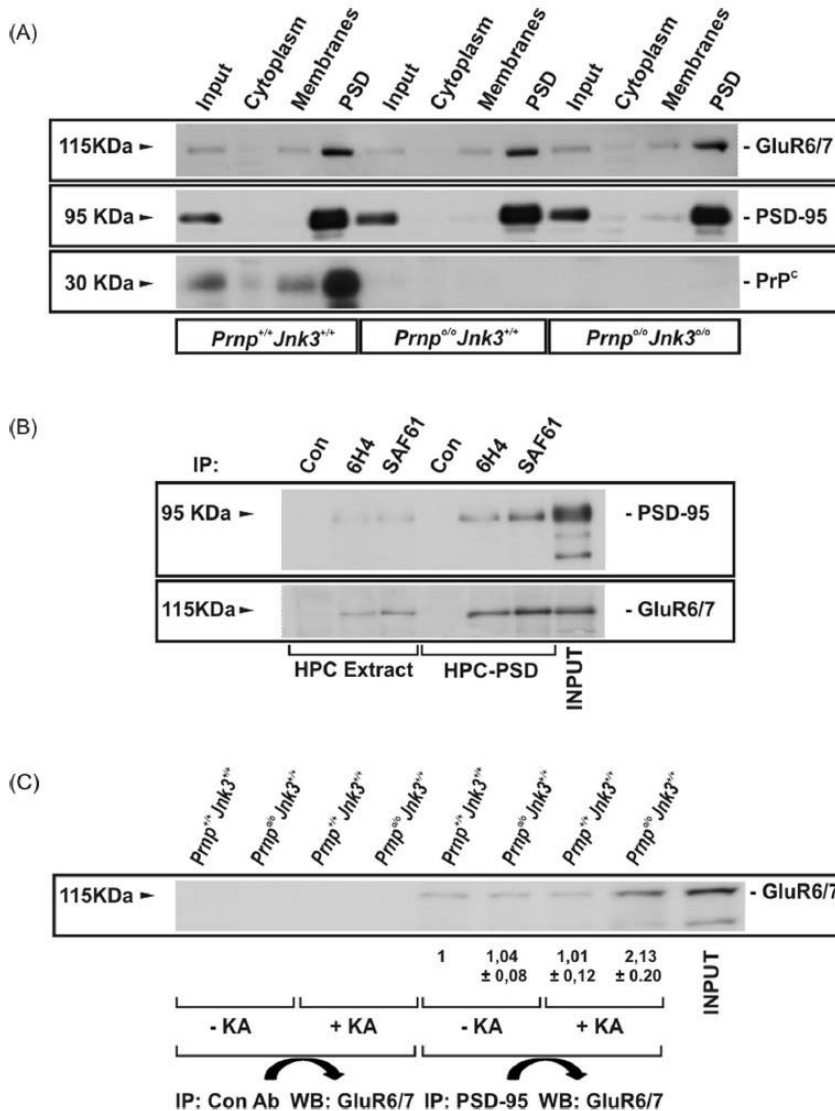
lation of p53 follows the activity pattern of JNK3 (only activated in *Prnp<sup>0/0</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>* after KA treatment). This is compatible with the recent proposal that p53 activation after glutamatergic stimulus depends on JNK activity (Choi et al., 2011).

JNK3-mediated signaling activates the AP-1 complex, which triggers the expression of early response genes such as *c-fos* or *c-jun*, as well as the up-regulation of *cox-2*, which is involved in the inflammatory response after KA treatment (Tu and Bazan, 2003). In fact, pharmacological inhibition or genetic deletion of *cox-2*, but not *Cox-1*, increases susceptibility to KA-induced hippocampal excitotoxicity (Toscano et al., 2008). In our study, *cox-2* was up-regulated after KA treatment in *Prnp<sup>0/0</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>*, whereas in *Prnp<sup>0/0</sup>Jnk3<sup>0/0</sup>*, *cox-2* expression was largely reduced (up to 60%), indicating a reduction in inflammatory responses in the double-knockout mice. Indeed, a direct relation between JNK activity, c-Jun phosphorylation, and *cox-2* up-regulation has been demonstrated in several models (Waetzig et al., 2005), and the up-regulation of *Cox-2* mediated by JNK is necessary and required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease (Hunot et al., 2004).

**A putative role of PrP<sup>C</sup> at the neuronal membrane as modulator of GluR6/7-mediated neurotransmission and JNK3 activity**

GluR6 knockout and *Jnk3<sup>0/0</sup>* mice are resistant to KA treatment. In fact, it has been reported that GluR6 binds to PSD-95, and this binding is necessary to trigger GluR6-dependent neurotransmission (Savinainen et al., 2001) due to the formation of a stable trimeric complex GluR6-PSD-95-MLK3 (Li et al., 2010). In this study we found large colocalization of PrP<sup>C</sup> with GluR6/7 in the PSD. Moreover, *Prnp* deletion favors the interaction between PSD-95 and GluR6/7 in the presence of KA. Taken together, our results suggest that absence of PrP<sup>C</sup> enhances the interaction of the ternary complex PSD-95 and GluR6 and most probably MLK3 at the synapse, thus enabling GluR6-mediated intracellular signaling. This in turn leads to JNK3 activation among that of other kinases.

As mentioned, PrP<sup>C</sup> has been detected in axon and synaptic contacts, although whether its location is presynaptic or postsynaptic is not fully determined (Fournier et al., 2000; Fournier, 2008). Here we report that a fraction of PrP<sup>C</sup> localized to the PSD, where neurotransmitter receptors are located. Recent studies indicate that PrP<sup>C</sup> is a constitutive basal protector against NMDA-mediated toxicity. Deletion of the *Prnp* gene induces enhanced



**FIGURE 6:** PrP<sup>C</sup> interacts with PSD-95 and glutamate receptor 6/7. (A) Hippocampus from KA-injected *Prnp<sup>+/+</sup> Jnk3<sup>+/+</sup>*, *Prnp<sup>0/0</sup> Jnk3<sup>+/+</sup>*, and *Prnp<sup>0/0</sup> Jnk3<sup>0/0</sup>* mice was fractionated by differential centrifugation in order to purify PSD fraction. Fractions were separated by SDS-PAGE, followed by immunoblotting with the indicated antibodies. (B) Extracts from total hippocampus or hippocampal PSD fraction from *Prnp<sup>+/+</sup> Jnk3<sup>+/+</sup>* mouse were immunoprecipitated using two PrP<sup>C</sup> antibodies (6H4 and SAF61). Immunoprecipitated samples were separated by SDS-PAGE, followed by immunoblotting with the indicated antibodies. (C) *Prnp<sup>+/+</sup> Jnk3<sup>+/+</sup>* and *Prnp<sup>0/0</sup> Jnk3<sup>+/+</sup>* mice were injected with KA (6 mg/kg body weight) or PBS and analyzed for 4 h. Hippocampi were dissected, and cellular extracts were immunoprecipitated with control and anti-PSD-95 antibodies. Immunoprecipitated samples were developed by Western blot with the anti-GluR6/7 antibody. Densitometry values are standardized with *Prnp<sup>+/+</sup> Jnk3<sup>+/+</sup>* in untreated cultures, and quantification was represented as fold change ± SEM. Notice the increase of GluR6/7 labeling after PSD immunoprecipitation in *Prnp<sup>0/0</sup> Jnk3<sup>+/+</sup>* after KA treatment.

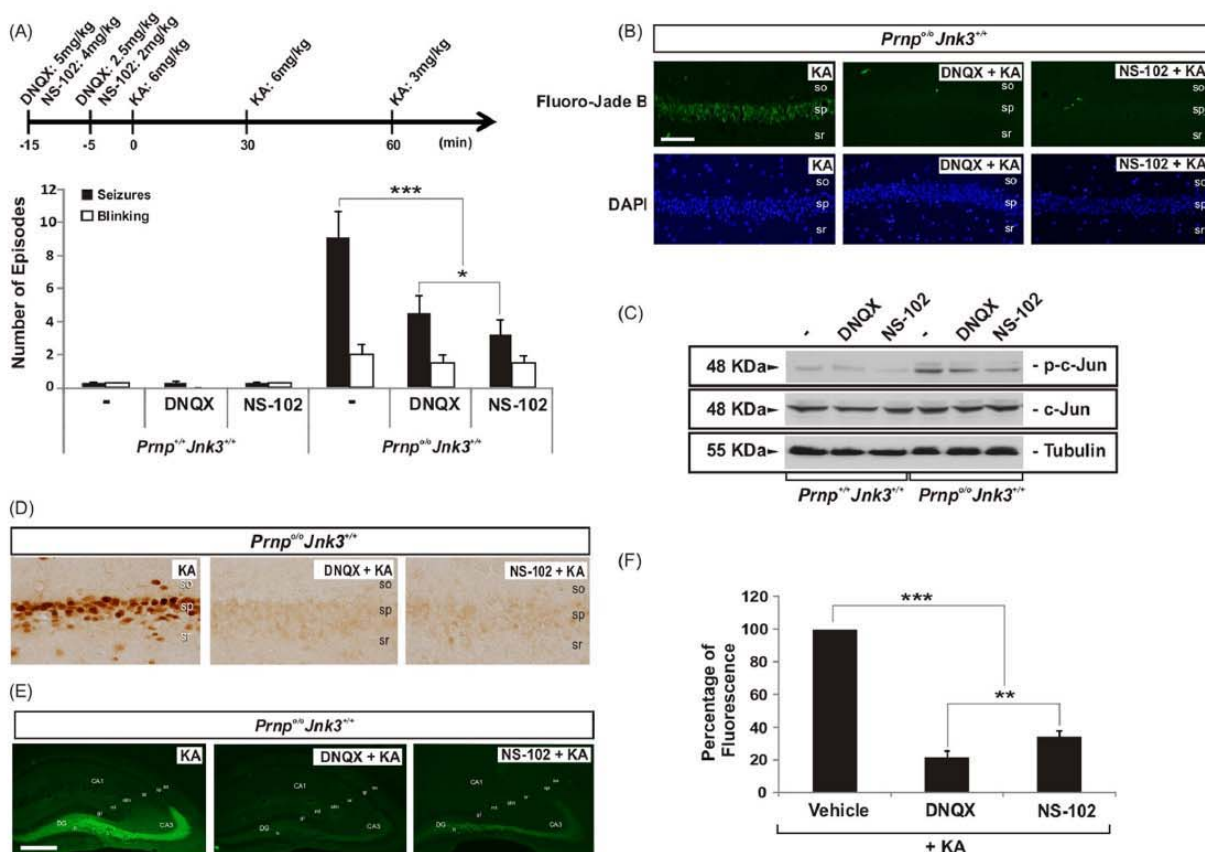
prolonged NMDA-evoked currents in hippocampal neurons, which increases neuronal excitability and glutamate excitotoxicity (Khosravani et al., 2008). The same authors described changes in some parameters associated with AMPA/KA-mediated miniature inhibitory postsynaptic currents and  $\gamma$ -aminobutyric acid A-mediated miniature inhibitory postsynaptic currents (Khosravani et al., 2008). These findings are in concordance with our data (Rangel et al., 2007,

2009), which demonstrated that enhanced neurotoxicity to KA in hippocampal slices of *Prnp<sup>0/0</sup>* mice has both a KA receptor and a NMDA receptor component. However, the molecular mechanism by which PrP<sup>C</sup> inhibits NMDA and KA receptors is unclear. PrP<sup>C</sup> may either influence agonist binding, favor the closed state of the channel, or interfere with the signal transmission, thus forming a negative modulator complex (Steele, 2008). In any case PrP<sup>C</sup> expression does not appear to be critical for neuronal glutamate transport (Thais et al., 2006). Irrespective of the molecular mechanisms responsible for these effects, our data indicate that PrP<sup>C</sup> (both for KA and NMDA receptors) inhibits glutamatergic neurotransmission and that the absence of PrP<sup>C</sup> enhances neurotoxic signaling. Furthermore, it is tempting to speculate on a similar protective effect in other brain injuries that share a similar activation mechanism through the receptor complex GluR6/7-PSD-95-MLK3, where signaling is transmitted downstream into the JNK3 pathway. Further studies would be needed to confirm this hypothesis. In this regard, increased levels of PrP<sup>C</sup> in plasma have been found after acute ischemia in rats and in human stroke patients (Mitsios et al., 2007). Indeed, Weise et al. (2004) suggested that the extent of the up-regulation of PrP<sup>C</sup> in ischemic brains depends on the severity of ischemia and may therefore reflect the extent of ischemia-induced neuronal damage. We believe that discerning the functional roles of PrP<sup>C</sup> at the synapse, as well as its specific interacting partners in normal and pathological conditions at the synapse, would help us to understand neurotoxicity in synapse-associated neurodegenerative diseases and ischemic processes. Figure 8 shows a general scheme depicting the role of the GluR6/7-JNK3 signaling pathway in mediating the neurotoxic effects of KA in mouse hippocampus in the absence of PrP<sup>C</sup>.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

*Prnp* knockout mice Zürich I (*Prnp<sup>0/0</sup>*) were purchased from the European Mouse Mutant Archive (EMMA, Monterotondo, Italy). *Prnp<sup>0/0</sup>* mice were backcrossed with C57BL6J mice from 10 generations up to obtain 92–95% of C57BL6J microsatellite markers (Charles River background analysis) from the previous 46–48% of the Zürich I mice. *Jnk3* knockout mice were generated as described elsewhere (Yang et al., 1997). Double-knockout animals (*Prnp<sup>0/0</sup> Jnk3<sup>0/0</sup>*) were generated by crossing backcrossed *Prnp<sup>0/0</sup>* mice with *Jnk3<sup>0/0</sup>* mice (with 70–75% of C57BL6J microsatellite markers). To avoid putative background-specific differences between mice, all of the experiments were conducted using littermates



**FIGURE 7:** AMPA/kainate receptor inhibition decreased the KA-enhanced neurotoxicity in *Prnp<sup>0/0</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>* mice. (A) Seizures and blinking events for KA-injected mice. Injections were carried out with KA (6 mg/kg body weight), PBS, and the inhibitors DNQX and NS-102 as indicated on the timeline. (B) Examples of Fluoro-Jade B and DAPI staining in hippocampal CA1 region of *Prnp<sup>0/0</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>* mice 24 h after injection of KA in the presence or absence of DNQX and NS-102. (C) Western blots of p-c-Jun, c-Jun, and tubulin from the hippocampus of the animals 4 h after injection of KA in presence or absence of DNQX and NS-102. (D) Photomicrographs of c-Fos immunoreactivity in the hippocampal CA1 region of *Prnp<sup>0/0</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>* mice 24 h after injection of KA in the presence or absence of DNQX and NS-102. (E) Photomicrographs of p-ERK1/2 immunoreactivity in the hippocampus of *Prnp<sup>0/0</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>* mice 24 h after injection of KA in the presence or absence of DNQX and NS-102. Representative images from three different experiments are shown. (F) Histogram illustrating quantitative results of the fluorescence levels analyzed in E. Data are represented as mean ± SEM. Asterisks indicate statistical significance (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001; ANOVA test). Abbreviations as in Figure 1. Scale bars, B, 100 µm; E, 200 µm.

derived from heterozygous (*Prnp<sup>+/0</sup>Jnk3<sup>+/0</sup>*) parents. Specific primers for *Prnp* genotyping were designed in our laboratory based on the original P10 and P3 primers described elsewhere (Bueler *et al.*, 1992). The *Jnk3* knockout mice were genotyped as described elsewhere (Kuan *et al.*, 1999). A total of 45 litters were used in the present study. All experimental procedures were carried out in accordance with the guidelines of the Spanish Ministry of Science and Technology following European standards.

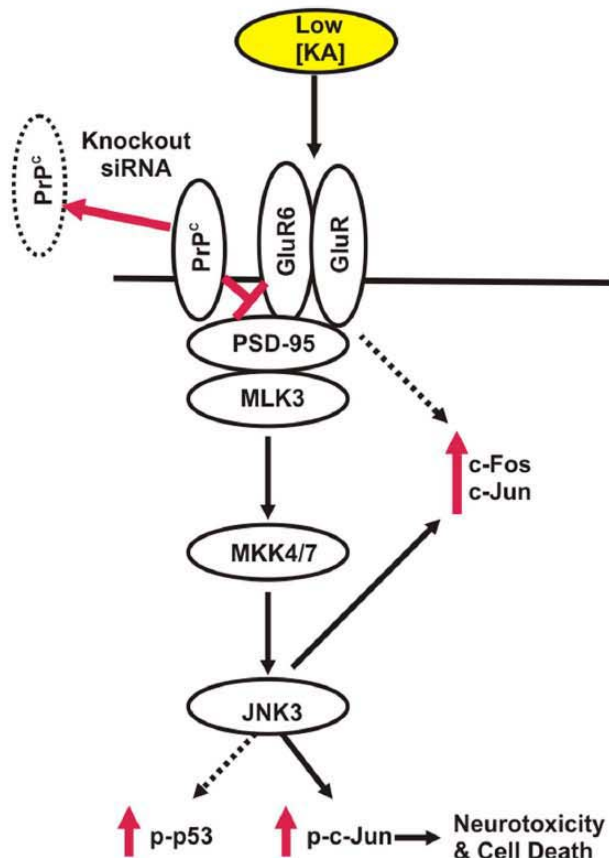
**Reagents and antibodies**

KA, PI, SP600125, TAT-JIP peptide, DNQX, NS-102, and antitubulin antibody were from Sigma (Poole, United Kingdom). Anti-p-ERK1/2, total anti-ERK1/2, p-c-Jun (Ser-63), anti-p-JNK, anti-p-p53 (Ser-15), and total anti-JNK3 antibodies were from Cell Signaling (Beverly, MA). Anti-c-Jun antibody was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-c-Fos was from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Postsynaptic density 95 (anti-PSD-95) and

glutamate receptor 6/7 (anti-GluR6/7) antibodies and Fluoro-Jade B were from Millipore (Billerica, MA). SAF61 antibody was from Spi-Bio (Cayman Chemical, Massy, France), and 6H4 antibody was from Prionics (Schlieren, Switzerland). SYBR green was from Roche (Basel, Switzerland).

**KA injections**

To induce convulsive nonlethal seizures in mice, we developed a progressive KA treatment by administering several consecutive intraperitoneal (i.p.) injections of the glutamate agonist KA dissolved in 0.1 M PBS, pH 7.2 (Rangel *et al.*, 2007). PBS 0.1 M, pH 7.2 (vehicle), was injected as control. Adult animals (*Prnp<sup>0/0</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>*; 2–3 mo old) were weighed and i.p. injected with two injections of KA (6 mg/kg body weight) at time 0 and 30 min. Seizure intensity after KA injections was evaluated as described previously during the 4 h after the first KA injection (Peng *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2000). Tissue samples were analyzed at the indicated times.



**FIGURE 8:** Proposed scheme illustrating the neurotoxic effects of KA in mouse hippocampus in the absence of PrP<sup>c</sup>. In the absence of Prnp (knockout, siRNA), KA activates neurotoxic signaling in the hippocampal cells, favoring the interaction of PSD-95 with GluR6/7, inducing c-Jun and c-Fos overexpression and JNK3 activation, which, in turn, provokes the phosphorylation of c-Jun, leading to neurotoxicity and cell death.

### Immunohistochemistry

After KA treatment, mice were perfused with phosphate buffered 4% paraformaldehyde, pH 7.3, postfixed overnight in the same fixative, and cryoprotected in 30% sucrose. Coronal sections (30 μm thick) were obtained in a freezing microtome (Leica, Wetzlar, Germany). Free-floating sections were rinsed in 0.1 M PBS, and endogenous peroxidases were blocked with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 10% methanol dissolved in 0.1 M PBS. After extensive rinsing, sections were incubated in 0.1 M PBS containing 0.2% gelatin, 10% normal serum, 0.2% glycine, and 0.2% Triton X-100 for 1 h at room temperature. Sections were then incubated overnight at 4°C with the distinct primary p-ERK1/2 and GFAP antibodies. After washing in 0.1 M PBS containing 0.2% Triton X-100, sections were incubated with Alexa Fluor 488- and/or Alexa Fluor 568-tagged secondary antibodies (1:200 diluted; Molecular Probes, Eugene, OR), washed in 0.1 M PBS counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 1 μM in 0.1 M PBS; 10 min), and mounted in Fluoromount (Vector Labs, Burlingame, CA). Dying cells in histological sections were measured using the S7100 ApopTag peroxidase in situ apoptosis (TUNEL) detection kit, following the manufacturer's instructions (Chemicon, Temecula, CA).

### Fluoro-Jade B staining of dying neurons in brain sections

Coronal brain sections were obtained as described and rinsed for 2 h in 0.1 M Tris, pH 7.4, mounted, and air dried at room temperature overnight. The next day, sections were pretreated for 3 min in absolute ethanol, followed by 1 min in 70% ethanol and 1 min in distilled water. They were then oxidized in a solution of 0.06% KMnO<sub>4</sub> for 15 min. After three rinses of 1 min each in distilled water, the sections were incubated for 30 min in a solution of 0.001% Fluoro-Jade B (Chemicon) containing 0.01% of DAPI (Sigma) in 0.1% acetic acid. The slides were rinsed in deionized water for 3 min each, dried overnight, cleared in xylene, and cover-slipped with Eukitt (Merck, Darmstadt, Germany) and examined using an Olympus (Hamburg, Germany) BX61 epifluorescence microscope.

### Neuronal primary cultures and treatments

Primary hippocampal neurons were prepared from the hippocampus of perinatal (embryological day 18 to day of birth) animals. Briefly, hippocampal neurons were grown on dishes coated with poly-D-lysine (30 μg/ml) in Neurobasal medium supplemented with B27, 0.5 mM glutamine, 12.5 mM glutamate, and antibiotics (all purchased from Invitrogen, Carlsbad, CA). At 9 d in vitro (DIV), hippocampal neurons were infected with lentivirus carrying the eGFP construct (Morales et al., 2008) or the siRNA for Prnp. Lentiviral particles were produced by transient transfection of 293FT cells with Lipofectamine 2000 (Invitrogen), using Mission short hairpin RNA prion protein NM\_011170 (Sigma), the second-generation packaging construct psPAX2 (Tronolab, Lausanne, Switzerland), and the envelope plasmid pMD2G (Tronolab). 293FT cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum and without antibiotics before transfection. Medium was changed and supplemented with antibiotics after 6 h. Vector supernatants containing viral particles were harvested ~24 and 48 h later and concentrated by ultracentrifugation (2 h at 26,000 × g at 4°C). After 5 d of infection, cultured neurons were treated with KA (150 μM dissolved in 0.1 M PBS; for 8 h). After treatment, cultures were rinsed twice in KA-free culture medium. The next day, cultures were incubated for 2 h with WST-1 reagent (Roche), and the absorbance (450 nm) was measured in a multiwell plate reader (Merck ELISA System MIOS).

### Organotypic slice cultures of hippocampus

Hippocampal slice cultures were prepared from day of birth as described elsewhere (Stoppini et al., 1991, 1993; del Rio and Soriano, 2010). Animals were anaesthetized, and brains were removed aseptically from the skull. Horizontal slices (325–350 μm thick) of the hippocampus were obtained using a McIlwain tissue chopper (Mickle Laboratory, Guildford, United Kingdom). Sections were maintained and selected in cold MEM supplemented with glutamine (2 mM; MEM dissecting salt solution) for 45 min. Selected slices were then cultured using the membrane interface method (Stoppini et al., 1991). Slices were placed on 30-mm-diameter sterile membranes (Millicell-CM, Millipore) and transferred to six-well tissue culture plates (Nunc, Roskilde, Denmark). Cultures were incubated with 1.2 ml of culture medium (50% MEM, 25% horse serum, 25% Hank's buffered salt solution, containing 2 mM glutamine and 0.04% NaHCO<sub>3</sub>, adjusted to pH 7.3). The membrane cultures were maintained in a humidified incubator at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The medium was changed every 2 d. All culture reagents were purchased from Invitrogen-Life Technologies (Merelbeke, Belgium).

Neuronal death after treatments in organotypic slice cultures was monitored by PI uptake (Rangel et al., 2007). After 9 d of culture, hippocampal slice cultures were serum deprived for 3 h, and 150 μM of KA was added. Cultured were exposed to protein JNK

inhibitors (SP600125 20  $\mu$ M or TAT-JIP 10  $\mu$ M) for 45 min before KA treatment. After treatment, slices were rinsed twice in KA-free culture medium. The next day, slices were incubated for 2 h with 1  $\mu$ g/ml of PI dissolved in culture medium. PI-treated slices were fixed for 1 h with 4% buffered paraformaldehyde, pH 7.2. After rinsing, cultures were mounted in Fluoromount and photodocumented in an Olympus confocal microscope. To determine the maximum PI fluorescence for quantification, total fluorescence in the pyramidal layer of the hippocampus was measured in a 500- $\mu$ m segment of the layer in the CA1–CA3 regions after incubation with 10 mM glutamate for 10 min, using Quantity One Imaging and Analysis software (Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, United Kingdom).

### PSD purification from mice hippocampus

The PSD fraction was purified from adult mice (10–12 mo old) as indicated (Coba et al., 2009). Briefly, tissue was weighed, and 1 ml of homogenization buffer (0.32 M sucrose, 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid [HEPES], pH 7.4, 2 mM EDTA, 2.5 mM *N*-ethylmaleimide, containing protease and phosphatase inhibitors) was added for every 125 mg of tissue. Samples were homogenized in a glass–Teflon Dounce homogenizer (40 strokes) and centrifuged at 800  $\times$  g for 10 min at 4°C. The supernatant was centrifuged at 10,000  $\times$  g for 15 min at 4°C, and pellet was resuspended in 0.5 ml of Triton buffer: 50 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM *N*-ethylmaleimide, containing protease and phosphatase inhibitors) for every 125 mg of tissue. Samples were centrifuged at 50,000  $\times$  g for 30 min at 4°C, and the pellet was resuspended in 125  $\mu$ l of resuspension buffer—50 mM Tris, pH 7.4, 1% SDS (when used for Western blotting) or 50 mM Tris, pH 8.5, 1% deoxycholate (when used for immunoprecipitation experiments)—for every 125  $\mu$ g of tissue. Samples were incubated for 10 min at room temperature and centrifuged at 50,000  $\times$  g for 15 min at 4°C.

### Western blotting

Tissue samples from the hippocampus of KA-treated or vehicle-treated mice were homogenized (10% wt/vol) in ice-cold lysis buffer—50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% (wt/vol) Triton X-100, 0.5% (wt/vol) Nonidet P-40 (IGEPAL; Sigma), glycerol 10%, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, and protease and phosphatase inhibitors—using a motor-driven, glass–Teflon homogenizer in ice and centrifuged at 15,000  $\times$  g for 20 min. After protein quantification, tissue extracts were boiled in Laemmli sample buffer at 100°C for 5 min, followed by 6–10% SDS–PAGE electrophoresis, electrotransferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Millipore), and processed for immunoblotting and the ECL Plus kit (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ).

### Immunoprecipitation

Cell extracts from total hippocampus or hippocampal PSD fractions were used for immunoprecipitation experiments. For total hippocampus, cell extracts were processed as indicated for Western blot. After protein quantification, 1 mg of hippocampal protein extract was mixed with 10  $\mu$ l of protein A/G–Sepharose (Sigma) previously equilibrated with lysis buffer—50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glycerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and protease and phosphatase inhibitors—for 2 h (preclearing). Samples were centrifuged, and the supernatant was mixed with the indicated immunoprecipitation antibodies plus 10  $\mu$ l of protein A/G–Sepharose overnight at 4°C. The immunocomplexes were washed in lysis buffer and once in lysis buffer plus 0.25 M NaCl. For immunoprecipitation from PSD hippocampal

fractions, PSD fractions were diluted with RIPA buffer: 150 mM NaCl, 1.0% IGEPAL CA-630, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, and 50 mM Tris, pH 8.0, up to 500  $\mu$ l. Samples were processed as described earlier but using RIPA buffer instead of lysis buffer for immunoprecipitation washes. Proteins attached to Sepharose beads were eluted with SDS–PAGE sample buffer, subjected to SDS–PAGE, transferred to PVDF membranes, and probed with the GluR6/7 and PSD-95 antibodies.

### RT-qPCR

RT-qPCR was performed on total RNA extracted with the mirVana isolation kit (Ambion, Austin, TX) from the hippocampus of analyzed mice. Purified RNAs were used to generate the corresponding cDNAs, which served as PCR templates for mRNA quantification. The primers used in this study for RT-qPCR validation are given in Supplemental Figure S1. PCR amplification and detection were performed with the Roche LightCycler 480 detector, using 2 $\times$  SYBR Green Master Mix (Roche) as reagent, following the manufacturer's instructions. The reaction profile was as follows: denaturation–activation cycle (95°C for 10 min) followed by 40 cycles of denaturation–annealing–extension (95°C, 10 min; 72°C, 1 min; 98°C, continuous). mRNA levels were calculated using the LightCycler 480 software. The data were analyzed using the  $\Delta\Delta$ Ct method, which provides the target gene expression values as fold changes in the problem sample compared with a calibrator sample. Both problem and calibrator samples were normalized by the relative expression of a housekeeping gene (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [GAPDH]).

### Statistical analysis

All data are presented as mean  $\pm$  SEM. Pairwise one-way analysis of variance (ANOVA) with Newman–Keuls multiple comparisons test was used for comparison. The operations were performed using Systat Software (Chicago, IL) or Statgraphics (StatPoint Technologies, Warrenton, VA). Statistical significance was set at \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, and \*\*\* $p$  < 0.001.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank R. Rycroft for English language advice and D. Reginensi, I. Jimenez, and G. Tormen for technical assistance. This study was supported by the FP7-PRIORITY, the Spanish Ministry of Science and Innovation (BFU2009-10848), and the Generalitat de Catalunya (SGR2009-366) (J.A.D.R.) and grants from the Instituto Salud Carlos III (Madrid, Spain) (J.A.D.R. and I.F.) and SAF2010-21682 (C.C.). F.L. was supported by the FP7-PRIORITY. P.C. is supported by an FPI fellowship from the Spanish Ministry of Science and Innovation. A.B. is a Sara Borrell Postdoctoral Researcher of the Instituto Salud Carlos III.

### REFERENCES

- Aguzzi A, Calella AM (2009). Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiol Rev* 89, 1105–1152.
- Aguzzi A, Heikenwalder M, Polymenidou M (2007). Insights into prion strains and neurotoxicity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 552–561.
- Alford S, Grillner S (1990). CNQX and DNQX block non-NMDA synaptic transmission but not NMDA-evoked locomotion in lamprey spinal cord. *Brain Res* 506, 297–302.
- Anantharam V, Kanthasamy A, Choi CJ, Martin DP, Latchoumycandane C, Richt JA, Kanthasamy AG (2008). Opposing roles of prion protein in oxidative stress- and ER stress-induced apoptotic signaling. *Free Radic Biol Med* 45, 1530–1541.
- Aude-Garcia C, Villiers C, Candeias SM, Garrel C, Bertrand C, Collin V, Marche PN, Jouvin-Marche E (2011). Enhanced susceptibility of T lymphocytes to oxidative stress in the absence of the cellular prion protein. *Cell Mol Life Sci* 68, 687–696.

- Behrens A, Sibilia M, Wagner EF (1999). Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat Genet* 21, 326–329.
- Beraldo FH et al. (2011). Metabotropic glutamate receptors transduce signals for neurite outgrowth after binding of the prion protein to laminin gamma1 chain. *FASEB J* 25, 265–279.
- Bonny C, Oberson A, Negri S, Sauser C, Schorderet DF (2001). Cell-permeable peptide inhibitors of JNK: novel blockers of beta-cell death. *Diabetes* 50, 77–82.
- Brami-Cherrier K, Lavaur J, Pages C, Arthur JS, Caboche J (2007). Glutamate induces histone H3 phosphorylation but not acetylation in striatal neurons: role of mitogen- and stress-activated kinase-1. *J Neurochem* 101, 697–708.
- Brown DR, Nicholas RS, Canevari L (2002). Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. *J Neurosci Res* 67, 211–224.
- Brown DR et al. (1997). The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 390, 684–687.
- Brown DR, Schmidt B, Kretschmar HA (1998). Effects of copper on survival of prion protein knockout neurons and glia. *J Neurochem* 70, 1686–1693.
- Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356, 577–582.
- Coba MP, Pocklington AJ, Collins MO, Kopanitsa MV, Uren RT, Swamy S, Croning MD, Choudhary JS, Grant SG (2009). Neurotransmitters drive combinatorial multistate postsynaptic density networks. *Sci Signal* 2, ra19.
- Chen J et al. (2009). GluR6-containing KA receptor mediates the activation of p38 MAP kinase in rat hippocampal CA1 region during brain ischemia injury. *Hippocampus* 19, 79–89.
- Chen S, Mange A, Dong L, Lehmann S, Schachner M (2003). Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. *Mol Cell Neurosci* 22, 227–233.
- Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R (2002). Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J* 21, 3317–3326.
- Choi HJ, Kang KS, Fukui M, Zhu BT (2011). Critical role of the JNK-p53-GADD45alpha apoptotic cascade in mediating oxidative cytotoxicity in hippocampal neurons. *Br J Pharmacol* 162, 175–192.
- de Lemos L, Junyent F, Verdaguier E, Folch J, Romero R, Pallas M, Ferrer I, Auladell C, Camins A (2010). Differences in activation of ERK1/2 and p38 kinase in Jnk3 null mice following KA treatment. *J Neurochem* 114, 1315–1322.
- del Rio JA, Soriano E (2010). Regenerating cortical connections in a dish: the entorhino-hippocampal organotypic slice co-culture as tool for pharmacological screening of molecules promoting axon regeneration. *Nat Protoc* 5, 217–226.
- Erllich RB, Kahn SA, Lima FR, Muras AG, Martins RA, Linden R, Chiarini LB, Martins VR, Moura Neto V (2007). ST11 promotes glioma proliferation through MAPK and PI3K pathways. *Glia* 55, 1690–1698.
- Fournier JG (2008). Cellular prion protein electron microscopy: attempts/limits and clues to a synaptic trait. Implications in neurodegeneration process. *Cell Tissue Res* 332, 1–11.
- Fournier JG, Escaig-Haye F, Grigoriev V (2000). Ultrastructural localization of prion proteins: physiological and pathological implications. *Microsc Res Tech* 50, 76–88.
- Gavin R, Ferrer I, del Rio JA (2010). Involvement of Dab1 in APP processing and beta-amyloid deposition in sporadic Creutzfeldt-Jakob patients. *Neurobiol Dis* 37, 324–329.
- Gunther EC, Strittmatter SM (2010). Beta-amyloid oligomers and cellular prion protein in Alzheimer's disease. *J Mol Med* 88, 331–338.
- Heatwole VM (1999). TUNEL assay for apoptotic cells. *Methods Mol Biol* 115, 141–148.
- Hu WW, Du Y, Li C, Song YJ, Zhang GY (2008). Neuroprotection of hypothermia against neuronal death in rat hippocampus through inhibiting the increased assembly of GluR6-PSD95-MLK3 signaling module induced by cerebral ischemia/reperfusion. *Hippocampus* 18, 386–397.
- Hunot S, Vila M, Teismann P, Davis RJ, Hirsch EC, Przedborski S, Rakic P, Flavell RA (2004). JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 665–670.
- Khosravani H et al. (2008). Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. *J Cell Biol* 181, 551–565.
- Kuan CY, Yang DD, Samanta Roy DR, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA (1999). The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* 22, 667–676.
- Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T, Haraguchi K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Saeki K, Yokoyama T, Itohar S, Onodera T (1999). Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* 400, 225–226.
- Lauren J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW, Strittmatter SM (2009). Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* 457, 1128–1132.
- Lee JY, Park J, Kim YH, Kim DH, Kim CG, Koh JY (2000). Induction by synaptic zinc of heat shock protein-70 in hippocampus after kainate seizures. *Exp Neurol* 161, 433–441.
- Li C, Xu B, Wang WW, Yu XJ, Zhu J, Yu HM, Han D, Pei DS, Zhang GY (2010). Coactivation of GABA receptors inhibits the JNK3 apoptotic pathway via disassembly of GluR6-PSD-95-MLK3 signaling module in KA-induced seizure. *Epilepsia* 51, 391–403.
- Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR (2008). Physiology of the prion protein. *Physiol Rev* 88, 673–728.
- Maglio LE, Martins VR, Izquierdo I, Ramirez OA (2006). Role of cellular prion protein on LTP expression in aged mice. *Brain Res* 1097, 11–18.
- Maglio LE, Perez MF, Martins VR, Brentani RR, Ramirez OA (2004). Hippocampal synaptic plasticity in mice devoid of cellular prion protein. *Brain Res Mol Brain Res* 131, 58–64.
- Martins VR, Beraldo FH, Hajj GN, Lopes MH, Lee KS, Prado MM, Linden R (2010). Prion protein: orchestrating neurotrophic activities. *Curr Issues Mol Biol* 12, 63–86.
- McLennan NF et al. (2004). Prion protein accumulation and neuroprotection in hypoxic brain damage. *Am J Pathol* 165, 227–235.
- Mitsios N et al. (2007). Cellular prion protein is increased in the plasma and peri-infarcted brain tissue after acute stroke. *J Neurosci Res* 85, 602–611.
- Mitteregger G, Vosko M, Krebs B, Xiang W, Kohlmannsperger V, Nolting S, Hamann GF, Kretschmar HA (2007). The role of the octarepeat region in neuroprotective function of the cellular prion protein. *Brain Pathol* 17, 174–183.
- Morales R, Riss M, Wang L, Gavin R, Del Rio JA, Alcubilla R, Claverol-Tinture E (2008). Integrating multi-unit electrophysiology and plastic culture dishes for network neuroscience. *Lab Chip* 8, 1896–1905.
- Nicolas O, Gavin R, Braun N, Urena JM, Fontana X, Soriano E, Aguzzi A, del Rio JA (2007). Bcl-2 overexpression delays caspase-3 activation and rescues cerebellar degeneration in prion-deficient mice that overexpress amino-terminally truncated prion. *FASEB J* 21, 3107–3117.
- Nicolas O, Gavin R, del Rio JA (2009). New insights into cellular prion protein (PrPc) functions: the “ying and yang” of a relevant protein. *Brain Res Rev* 61, 170–184.
- Pei DS, Wang XT, Liu Y, Sun YF, Guan QH, Wang W, Yan JZ, Zong YY, Xu TL, Zhang GY (2006). Neuroprotection against ischaemic brain injury by a GluR6-9c peptide containing the TAT protein transduction sequence. *Brain* 129, 465–479.
- Peng YG, Clayton EC, Means LW, Ramsdell JS (1997). Repeated independent exposures to domoic acid do not enhance symptomatic toxicity in outbred or seizure-sensitive inbred mice. *Fundam Appl Toxicol* 40, 63–67.
- Prestori F, Rossi P, Bearzatto B, Laine J, Necchi D, Diwakar S, Schiffmann SN, Axelrad H, D'Angelo E (2008). Altered neuron excitability and synaptic plasticity in the cerebellar granular layer of juvenile prion protein knockout mice with impaired motor control. *J Neurosci* 28, 7091–7103.
- Rambold AS, Muller V, Ron U, Ben-Tal N, Winkhofer KF, Tatzelt J (2008). Stress-protective signalling of prion protein is corrupted by scrapie prions. *EMBO J* 27, 1974–1984.
- Rangel A, Burgaya F, Gavin R, Soriano E, Aguzzi A, Del Rio JA (2007). Enhanced susceptibility of Prnp-deficient mice to kainate-induced seizures, neuronal apoptosis, and death: role of AMPA/kainate receptors. *J Neurosci Res* 85, 2741–2755.
- Rangel A, Madronal N, Guart A, Gavin R, Llorens F, Sumoy L, Torres JM, Delgado-García JM, Del Rio JA (2009). Regulation of GABA(A) and glutamate receptor expression, synaptic facilitation and long-term potentiation in the hippocampus of prion mutant mice. *PLoS One* 4, e7592.
- Roffe M et al. (2010). Prion protein interaction with stress-inducible protein 1 enhances neuronal protein synthesis via mTOR. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 13147–13152.
- Rutishauser D, Mertz KD, Moos R, Brunner E, Rulicke T, Calella AM, Aguzzi A (2009). The comprehensive native interactome of a fully functional tagged prion protein. *PLoS One* 4, e4446.

- Santuccione A, Sytnyk V, Leshchyns'ka I, Schachner M (2005). Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59<sup>fyn</sup> and to enhance neurite outgrowth. *J Cell Biol* 169, 341–354.
- Savinainen A, Garcia EP, Dorow D, Marshall J, Liu YF (2001). Kainate receptor activation induces mixed lineage kinase-mediated cellular signaling cascades via post-synaptic density protein 95. *J Biol Chem* 276, 11382–11386.
- Schmued LC, Hopkins KJ (2000). Fluoro-Jade: novel fluorochromes for detecting toxicant-induced neuronal degeneration. *Toxicol Pathol* 28, 91–99.
- Shyu WC *et al.* (2005). Hypoglycemia enhances the expression of prion protein and heat-shock protein 70 in a mouse neuroblastoma cell line. *J Neurosci Res* 80, 887–894.
- Spudich A, Frigg R, Kilic E, Kilic U, Oesch B, Raeber A, Bassetti CL, Hermann DM (2005). Aggravation of ischemic brain injury by prion protein deficiency: role of ERK-1/-2 and STAT-1. *Neurobiol Dis* 20, 442–449.
- Steele AD (2008). All quiet on the neuronal front: NMDA receptor inhibition by prion protein. *J Cell Biol* 181, 407–409.
- Steele AD, Emsley JG, Ozdinler PH, Lindquist S, Macklis JD (2006). Prion protein (PrP<sup>c</sup>) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 3416–3421.
- Steele AD, Zhou Z, Jackson WS, Zhu C, Auluck P, Moskowitz MA, Chesselet MF, Lindquist S (2009). Context dependent neuroprotective properties of prion protein (PrP). *Prion* 3, 240–249.
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37, 173–182.
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1993). Lesion-induced neurite sprouting and synapse formation in hippocampal organotypic cultures. *Neuroscience* 57, 985–994.
- Thais ME *et al.* (2006). Synaptosomal glutamate release and uptake in mice lacking the cellular prion protein. *Brain Res* 1075, 13–19.
- Tian H, Zhang QG, Zhu GX, Pei DS, Guan QH, Zhang GY (2005). Activation of c-Jun NH2-terminal kinase 3 is mediated by the GluR6/PSD-95/MLK3 signaling module following cerebral ischemia in rat hippocampus. *Brain Res* 1061, 57–66.
- Toscano CD, Kingsley PJ, Marnett LJ, Bosetti F (2008). NMDA-induced seizure intensity is enhanced in COX-2 deficient mice. *Neurotoxicology* 29, 1114–1120.
- Tu B, Bazan NG (2003). Hippocampal kindling epileptogenesis upregulates neuronal cyclooxygenase-2 expression in neocortex. *Exp Neurol* 179, 167–175.
- Vassallo N, Herms J (2003). Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. *J Neurochem* 86, 538–544.
- Verdoorn TA, Johansen TH, Drejer J, Nielsen EO (1994). Selective block of recombinant glur6 receptors by NS-102, a novel non-NMDA receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 269, 43–49.
- Waetzig V, Czeloth K, Hidding U, Mielke K, Kanzow M, Brecht S, Goetz M, Lucius R, Herdegen T, Hanisch UK (2005). c-Jun N-terminal kinases (JNKs) mediate pro-inflammatory actions of microglia. *Glia* 50, 235–246.
- Walz R, Amaral OB, Rockenbach IC, Roesler R, Izquierdo I, Cavalheiro EA, Martins VR, Brentani RR (1999). Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. *Epilepsia* 40, 1679–1682.
- Weise J, Crome O, Sandau R, Schulz-Schaeffer W, Bahr M, Zerr I (2004). Upregulation of cellular prion protein (PrP<sup>c</sup>) after focal cerebral ischemia and influence of lesion severity. *Neurosci Lett* 372, 146–150.
- Weise J, Sandau R, Schwarting S, Crome O, Wrede A, Schulz-Schaeffer W, Zerr I, Bahr M (2006). Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt activation, enhanced postischemic caspase-3 activation, and exacerbation of ischemic brain injury. *Stroke* 37, 1296–1300.
- Weissmann C, Bueler H, Fischer M, Sailer A, Aguzzi A, Aguet M (1994). PrP-deficient mice are resistant to scrapie. *Ann N Y Acad Sci* 724, 235–240.
- Westergard L, Christensen HM, Harris DA (2007). The cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>): its physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta* 1772, 629–644.
- Wong BS *et al.* (2001). Increased levels of oxidative stress markers detected in the brains of mice devoid of prion protein. *J Neurochem* 76, 565–572.
- Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Rincon M, Zheng TS, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA (1997). Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* 389, 865–870.
- Zanata SM *et al.* (2002). Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J* 21, 3307–3316.

## SUPPLEMENTARY FIGURE 1

## RT-qPCR

Gene		Sequence 5'-3'	Length
<i>c-fos</i>	Forward	ACCATGATGTTCTCGGGTTTCAA	23
	Reverse	GCTGGTGGAGATGGCTGTCAC	21
<i>c-jun</i>	Forward	TGAAAGCTGTGTCCCCTGTC	20
	Reverse	ATCACAGCACATGCCACTTC	20
<i>cox-2</i>	Forward	CTTCACGCATCAGTTTTTCAAG	22
	Reverse	TCACCGTAAATATGATTTAAGTCCAC	26
<i>gapdh</i>	Forward	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	21
	Reverse	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	23

## Genotyping

Gene		Sequence 5'-3'	Length
<i>Jnk3</i>	MJ3F3	CGTAATCTTGTCACAGAAATCCCATAC	27
	MJ3B3	CCTGCTTCTCAGAAACACCCTTC	23
	PGKP1	CTCCAGACTGCCTTGGGAAAA	21

Supplementary Figure 1. List of primers used in the study.



# RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---





“Prión”. Es el término que utilizó Stanley B. Prusiner para denominar al agente infeccioso causante de las prionopatías o EETs (Prusiner, 1982). Su descubrimiento llevó a centrar la atención en PrP<sup>C</sup>, una glicoproteína endógena de membrana, de función desconocida, que se expresaba principalmente en el SNC (Linden et al., 2008). Aunque algunos estudios *in vivo* con animales transgénicos sugieren que la neurodegeneración característica de las EETs es consecuencia de la ganancia de toxicidad de PrP<sup>C</sup> por su conversión a PrP<sup>Sc</sup> (Mallucci et al., 2002), no podemos descartar que la consecuente reducción de los niveles de la proteína endógena pueda estar contribuyendo al desarrollo de la enfermedad (Hetz et al., 2003). De ahí que el estudio de la función fisiológica de PrP<sup>C</sup> sea importante para entender la fisiopatología de este grupo de enfermedades.

A pesar de que los niveles de expresión de PrP<sup>C</sup> en el ratón adulto se muestran prácticamente invariables, sí se ha descrito una regulación durante el desarrollo del SNC (Miele et al., 2003, Tremblay et al., 2007, Benvegnu et al., 2010). Se ha observado que esta proteína va incrementando desde edades embrionarias hasta las primeras semanas postnatales, y se cree que su expresión es preferente en el hipocampo, sobre todo en las células piramidales y las células granulares del giro dentado (Lazarini et al., 1991, Benvegnu et al., 2011). Sin embargo todavía existe cierta controversia sobre la localización espacial de PrP<sup>C</sup>. Aunque se han desarrollado gran diversidad de anticuerpos para detectar la proteína (Polymenidou et al., 2008), su gran variabilidad supone una seria dificultad técnica a la hora de localizar esta proteína en secciones de tejido o cultivos celulares mediante técnicas de inmunohistoquímica. Otras aproximaciones, como el desarrollo de animales transgénicos que expresan la proteína unida a GFP, han intentado corroborar estos datos (Barmada et al., 2004). No obstante, a día de hoy, la regulación espacial de PrP<sup>C</sup> durante el desarrollo está aún determinar.

Aún así, esta precisión celular, espacial y temporal en los cambios de expresión de PrP<sup>C</sup> sugiere un rol pleiotrópico de la proteína priónica durante la embriogénesis (Manson et al., 1992), tanto durante la proliferación como la diferenciación celular, así como un papel esencial en el mantenimiento de la función neuronal y plasticidad sináptica posteriormente en la edad adulta (Steele et al., 2006).

Pero, ¿cómo la modulación de los niveles de PrP<sup>C</sup> puede ayudarnos a conocer la función fisiológica de la proteína? La controversia existente sobre la pérdida de función vs ganancia de toxicidad de PrP<sup>C</sup> ha llevado a realizar experimentos de sobreexpresión y silenciamiento de PrP<sup>C</sup> *in vitro*, mediante el uso de líneas celulares e *in vivo*, mediante la generación de animales transgénicos que no expresan la proteína (Steele et al., 2007), que la sobreexpresan (Westaway et al., 1994) o que expresan formas truncadas de ésta (Shmerling et al., 1998, Baumann et al., 2009). Los resultados han sido más que sorprendentes, implicando a PrP<sup>C</sup> en procesos de: i) supervivencia celular (Kim et al., 2004, Yu et al., 2012), ii) señalización intracelular (Mouillet-Richard et al., 2000, Hugel et al., 2004), iii) neuroprotección (Brown et al., 1997, Walz et al., 1999, Brown et al., 2002, Rangel et al., 2007, Khosravani et al., 2008, Fleisch et al., 2013), iv) diferenciación celular y proliferación (Steele et al., 2006, Morel et al., 2008, Loubet et al., 2012), v) adhesión celular (Malaga-Trillo et al., 2009) o vi) regulación sináptica (Collinge et al., 1994), entre otros.

Con todas estas evidencias descritas, queda claro que una variación en los niveles de expresión de PrP<sup>C</sup> resulta en la alteración de múltiples funciones celulares. Sin embargo, estas aproximaciones no siempre permiten revelar los mecanismos moleculares implicados. Es lógico pensar que una proteína que puede estar actuando en la membrana celular en asociación a elementos de señalización (Mouillet-Richard et al., 2000, Hugel et al., 2004) pueda provocar alteraciones en múltiples vías intracelulares si se modifica su expresión. En base a esto, los estudios *high-throughput* de proteómica y genómica funcional constituyen un sistema idóneo para abarcar ampliamente los cambios moleculares producidos bajo diferentes condiciones experimentales.

A día de hoy, el uso de este tipo de técnicas de *screening* ya ha proporcionado gran cantidad de información relevante sobre los procesos implicados en la patología priónica (Crecelius et al., 2008, Zafar et al., 2011, Basu et al., 2012), aunque los resultados obtenidos de modelos *in vivo* no correlacionan completamente con las observaciones realizadas *in vitro* (Llorens et al., 2013b).

Los estudios genómicos y proteómicos realizados hasta el momento incluyen diferentes líneas celulares, entre las que encontramos fibroblastos deficientes de PrP<sup>C</sup> (Sato et al., 2000) o células HEK293 (Sato and Yamamura, 2004), progenitores neuronales (Li et al., 2005) y células gástricas SGC7901 (Liang et al., 2007) transfectadas de forma estable o transitoria con la proteína. De estos análisis destaca la regulación de genes de adhesión y proliferación celular (p.e. ciclina D1, ciclina B1 o c-myc), canales y proteínas de interacción dependientes de calcio o proteínas asociadas a estrés oxidativo y apoptosis, entre otras. Por otro lado, los datos de expresión en modelos *in vivo* (Crecelius et al., 2008, Chadi et al., 2010, Benvegnu et al., 2011, Stella et al., 2012) corresponden a muestras de ratones *wild type* o *Prnp-knockout* en diferentes estadios de desarrollo, e indican la existencia de cambios moderados entre animales jóvenes y adultos (ver (Llorens et al., 2013b) para revisión).

Dos estudios realizados en nuestro laboratorio, previos al inicio de esta Tesis Doctoral, complementan esta información. El primero de ellos, consiste en un análisis comparativo de expresión génica en muestras de hipocampo de ratones adultos *wild type*, *Prnp-knockout* y Tg20. Este ensayo va dirigido a estudiar la regulación de mecanismos de neurotransmisión y excitabilidad neuronal por parte de PrP<sup>C</sup>, pues se habían observado alteraciones neurohistopatológicas y electrofisiológicas *in vivo* en estos ratones transgénicos (Rangel et al., 2009). Este estudio ha permitido identificar 336 genes regulados en el ratón Tg20 en comparación con el *wild type*, 129 de los cuales coinciden con los 404 genes regulados en el ratón *knockout*, se co-regulan en la misma dirección y pertenecen a vías de: i) ubiquitinación, ii) metabolismo de fosfolípidos, iii) señalización por receptores GABA, iv) metabolismo de glutamato y v) señalización de calcio, entre otras. La validación por RTqPCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real) de algunos de estos genes confirma la regulación a la alza o a la baja de subunidades de receptores GABA<sub>A</sub> y AMPA/KA en ambos genotipos respecto al control. Esta expresión diferencial de los receptores de glutamato se suma a las descritas previamente (Telfeian et al., 2000, Iihara et al., 2001, Macdonald et al.,

2004) y apoya los indicios existentes de un rol de PrP<sup>C</sup> en el control de la excitabilidad neuronal.

El segundo estudio de *microarrays* corresponde a un modelo celular de neuroblastoma (N2a) con bajos niveles endógenos de PrP<sup>C</sup>, tras silenciamiento y sobreexpresión transitoria de esta proteína. Los resultados indican la regulación de 259 y 357 genes respectivamente, involucrados principalmente en ciclo celular. No obstante, entre los 27 genes validados por RTqPCR, también se identifican genes relacionados con procesos de proliferación (p.e. *ccnd1*, *ccne2*, *Cdk2* o *c-fos*), diferenciación (p.e. *Egr1*), crecimiento neurítico (p.e. *SNAP25* o *Gap43*) y tráfico intracelular (p.e. *Stx7*, *Stx8* o *Rab7*), entre otros. Cabe destacar la regulación a la alza y a la baja de la ciclina D1, cuya asociación a PrP<sup>C</sup> y su implicación en procesos proliferativos ya había sido descrita previamente (Sato et al., 2000, Liang et al., 2007). La regulación de SNAP-25, involucrada en procesos de tráfico vesicular, recaptación de neurotransmisores y regulación de calcio en respuesta a señales glutamatérgicas, también es un dato a remarcar. Además, sus cambios de expresión son coincidentes con los observados a nivel de proteína en muestras de membrana de células granulares de cerebelo procedentes de animales *Prnp*<sup>+/+</sup> y *Prnp*<sup>0/0</sup> (Stella et al., 2012).

Probablemente, la función de PrP<sup>C</sup> más validada y corroborada en estos estudios genómicos y proteómicos es la de su participación en la biología del cáncer, hasta el punto de ser propuesto como posible biomarcador de la progresión de esta enfermedad (Li et al., 2009, de Wit et al., 2012).

Esta Tesis Doctoral es la continuación de estos dos últimos estudios funcionales en modelos celulares y animales, que involucran a la proteína priónica en el mantenimiento de la actividad sináptica (Rangel et al., 2009) y en la regulación de los procesos de proliferación y diferenciación celular (Llorens et al., 2013a), respectivamente. La persecución de los objetivos planteados nos ha llevado a estudiar más en detalle los mecanismos moleculares por los que PrP<sup>C</sup> puede estar modulando estas funciones fisiológicas. Los resultados obtenidos se presentan en el capítulo I y II de esta tesis. En el primero nos hemos centrado en el estudio *in vitro* de la regulación del ciclo celular y la neuritogénesis por interacción de PrP<sup>C</sup> con EGFR, mientras que en el segundo se describe la regulación *in vivo* de la sinapsis glutamatérgica por interacción de PrP<sup>C</sup> con la subunidad GluR6 de los iGluRs.

### 1.1. PrP<sup>C</sup> controla la progresión del ciclo celular

La clara sobrerrepresentación de genes involucrados en ciclo celular y proliferación en el modelo de neuroblastoma nos ha llevado a corroborar *in vitro* la participación de PrP<sup>C</sup> en estos procesos celulares. Además, los experimentos realizados también nos han permitido entrar en detalle en los mecanismos moleculares implicados.

### La expresión de PrP<sup>C</sup> correlaciona con los niveles proliferativos en células N2a

La evaluación de los efectos de la expresión de PrP<sup>C</sup> sobre el patrón proliferativo de las células N2a se ha llevado a cabo mediante diferentes aproximaciones (citometría de flujo (FACS), detección de Ki67 y ensayo WST-1) en las mismas condiciones experimentales en que se había realizado el ensayo de *microarrays*. Para la sobreexpresión de PrP<sup>C</sup>, las células N2a se han transfectado con *pcDNA-PrP<sup>C</sup>*, mientras que el silenciamiento se ha realizado mediante la transfección de un RNA de interferencia para PrP<sup>C</sup> (*siRNA-PrP<sup>C</sup>*), con un efecto transitorio sobre los niveles de esta proteína.

Nuestros resultados indican, tanto en cultivos de N2a asincrónicos como sincrónicos (por privación y posterior reestimulación con suero), que la sobreexpresión de PrP<sup>C</sup> produce un incremento en la proliferación celular, mientras que lo contrario ocurre tras su silenciamiento. Efectos similares se han observado en otros tipos celulares. En células de cáncer gástrico se ha descrito una mayor tasa proliferativa y tumorigénesis asociadas a altos niveles de PrP<sup>C</sup> (Du et al., 2005, Liang et al., 2006, Pan et al., 2006, Liang et al., 2007). Lo mismo se ha observado en otros tipos de cáncer, como el glioma (Erllich et al., 2007), el cáncer mamario (Diarra-Mehrpour et al., 2004) o el colorrectal (Du et al., 2013), en los que PrP<sup>C</sup> parece actuar como un inductor de metástasis a través de la modulación de las vías ERK1/2 o AKT o de factores como STI1. Se ha demostrado que este efecto puede ser revertido por silenciamiento de PrP<sup>C</sup>, inhibición o eliminación de la región de los *octarepeats* (Du et al., 2005, Pan et al., 2006, Du et al., 2013). Asimismo, se han descrito alteraciones proliferativas a nivel del sistema inmunitario (Mabbott et al., 1997) o hematopoyético (Zhang et al., 2006), que correlacionan positivamente con los niveles de PrP<sup>C</sup>.

Sin embargo, en el SNC, PrP<sup>C</sup> parece ejercer roles opuestos durante la embriogénesis y el animal adulto. El silenciamiento de PrP<sup>C</sup> produce tasas proliferativas incrementadas en células madre embrionarias (Lee and Baskakov, 2010) así como en precursores neuronales (Kim et al., 2005, Steele et al., 2006) y oligodendrocitos (Bribian et al., 2012), con afectación posterior de la diferenciación celular, pero sin llegar a influenciar las características morfométricas del SNC (Steele et al., 2006). A diferencia, los precursores neurales multipotentes adultos parecen mostrar un incremento proliferativo dosis-dependiente, según se observa en estudios comparativos de animales *wild type*, *Pmp-knockout* y Tg20 (Steele et al., 2006).

Estas evidencias hacen pensar en un rol dual de PrP<sup>C</sup>, acompañando a los procesos de proliferación y de renovación celular pero también en los de diferenciación durante la embriogénesis y posteriormente en la edad adulta, en la que quedan latentes ciertos núcleos proliferativos indiferenciados formados por células madre neuronales (p.e. la SVZ o el DG) (Gage, 2000, Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002). La distribución localizada de estos nichos celulares sugiere la influencia de factores neurotróficos (p.e. EGF bFGF) (Craig et al., 1996, Gritti et al., 1999) así como de una expresión génica específica (Kempermann et al., 1997), destinada a la regulación del ciclo celular y la multipotencia. Todo indica que PrP<sup>C</sup> puede actuar sobre estos procesos como proteína de membrana transductora de señales (Mouillet-Richard et al., 2000) o como factor neurotrófico soluble (Lee and Baskakov, 2010).

## PrP<sup>C</sup> regula la activación de las vías de señalización de ERK1/2 y AKT

En nuestro modelo de estudio, los datos de proliferación se han complementado con información de ciclo celular obtenida de ensayos de FACS. El índice proliferativo (PI) indica una parada del ciclo celular a nivel de la fase G1 en las células silenciadas, mientras que muestra un incremento a nivel de la fase S y G2/M en células transfectadas con PrP<sup>C</sup>. A pesar de que PrP<sup>C</sup> está involucrado en fenómenos apoptóticos (Kim et al., 2004), estos no parecen estar presentes en nuestro sistema de estudio, según indica la ausencia de rotura proteolítica de PARP.

Este patrón de progresión a través de ciclo celular concuerda con las variaciones descritas en los niveles de la ciclina D1 (Sato et al., 2000, Liang et al., 2007, Llorens et al., 2013a). Es razonable pensar que estos cambios puedan estar desencadenados por alteraciones en vías de señalización intracelular, probablemente de ERK1/2 y AKT, ya que éstas han resultado ser críticas en la proliferación y diferenciación de varias líneas celulares (Pene et al., 2002, Roberts and Der, 2007, Hers et al., 2011). Además, existen evidencias, en diferentes modelos celulares, de que PrP<sup>C</sup> puede estar ejerciendo un rol regulador sobre estas dos vías de señalización (Pan et al., 2006, Liang et al., 2007).

Efectivamente, el análisis bioquímico de la cinética de activación de estas dos vías ha mostrado alteraciones significativas dependientes de PrP<sup>C</sup> en cultivos de N2a reestimulados con suero bovino fetal (FBS). El silenciamiento de PrP<sup>C</sup> produce una reducción en la activación de ERK1/2 además de una reducción generalizada de la fosforilación de AKT. Estas alteraciones se traducen *downstream* en la reducción de la expresión de factores como Egr1 y p-Elk. Por otro lado, la sobreexpresión de PrP<sup>C</sup> produce un incremento de p-AKT, pero sin efectos destacables sobre la activación de ERK1/2.

Es bien conocido, que la vía MEK-ERK1/2 constituye la principal vía de señalización responsable de integrar las señales extracelulares (p.e. nutrientes, mitógenos o factores de la matriz extracelular) y hacerlas llegar hasta los sistemas de control del ciclo celular y la proliferación (ver (Meloche and Pouyssegur, 2007, Mebratu and Tesfaigzi, 2009, Keshet and Seger, 2010, Roskoski, 2012) para revisión). Ensayos realizados con cultivos de fibroblastos tratados con diferentes factores de crecimiento (Meloche et al., 1992, Meloche, 1995) han descrito una cinética bifásica de activación de ERK1/2 en respuesta a mitógenos, consistente en un pico inicial breve de activación seguido de una actividad sostenida de ERK1/2 sin la cual no se podría producir la transición G1/S del ciclo celular (Roovers and Assoian, 2000, Meloche and Pouyssegur, 2007). La translocación de esta quinasa al núcleo celular, donde persiste durante la fase G1 y reversible tras la eliminación del mitógeno, lleva la transcripción de genes primero de respuesta temprana (IEGs) como *Elk1*, *c-jun* o *c-fos*, y luego de respuesta tardía como *ccnd1* (Lavoie et al., 1996). Esta secuencia de eventos explica el fenotipo observado en los ratones carentes de *c-fos*, que muestran defectos en proliferación debidos en parte a la incapacidad de entrar en ciclo por reducción de la activación de ciclina D1 en respuesta a suero (Brown et al., 1998), de la misma manera que se produce en el ratón *knockout* para ciclina D1 (Fantl et al., 1995). La regulación aberrante de la vía MAPK y, en concreto, de la quinasa ERK1/2 (Benson et al., 2006), así como los fallos a nivel de las diferentes ciclinas y CDKs que

regula (Malumbres and Barbacid, 2009), también contribuyen al desarrollo de tumores por alteración en el proceso proliferativo (Roberts and Der, 2007).

La vía PI3K/AKT también ha sido involucrada en la respuesta a la estimulación por mitógenos, como demuestran ensayos funcionales con formas mutadas de AKT (Bellacosa et al., 1998). Esta quinasa constituye un elemento clave desde la transición G1/S del ciclo hasta la formación del complejo ciclina E-Cdk2 (Roche et al., 1994), siendo esencial para la iniciación de la síntesis de DNA. La relación PrP<sup>C</sup>-PI3K/AKT se ha observado *in vitro* en modelos de células gástricas en que la inhibición de AKT suprime la transactivación de ciclina D1 y consecuente proliferación celular de forma dependiente de PrP<sup>C</sup> (Liang et al., 2007, Hers et al., 2011). En línea con esto, cultivos de células N2a que sobreexpresan PrP<sup>C</sup>, así como los de células hipocámpicas de animales *wild type*, presentan unos niveles de PI3K fosforilados mayores respecto a sus controles *Prnp-knockout*. Lo mismo ocurre *in vivo* en estudios comparativos de muestras cerebrales de animales *wild type* y *Prnp-knockout*, pues los segundos presentan una actividad PI3K un 30% inferior a la del *wild type* (Vassallo et al., 2005).

Todos estos datos refuerzan nuestra hipótesis de la participación de las vías ERK1/2 y AKT en la regulación de la proliferación de las células N2a.

### **EGFR como mediador de la señalización de PrP<sup>C</sup> en la membrana celular**

Los ensayos de agregación de PrP<sup>C</sup> en membrana mediante anticuerpos anti-PrP<sup>C</sup> (SAF61) (Mouillet-Richard et al., 2000) nos han permitido demostrar la participación de la forma anclada a membrana y no la citosólica de PrP<sup>C</sup> en la activación de las vías AKT / ERK1/2 descritas en nuestro modelo de N2a. Ya hemos comentado anteriormente que la ubicación de PrP<sup>C</sup> en los *rafts* lipídicos de la membrana (Taylor and Hooper, 2006) hace pensar en esta proteína como una plataforma de señalización intracelular (Mouillet-Richard et al., 2000, Hugel et al., 2004). Sin embargo, debido a su estructura y a su anclaje a membrana por un dominio GPI, la activación de las vías ERK1/2 y PI3K/AKT por PrP<sup>C</sup> únicamente puede ser posible mediante su interacción con proteínas adaptadoras o receptores de superficie (Pawson and Scott, 1997). Hasta el día de hoy, varias moléculas de membrana han sido relacionadas con PrP<sup>C</sup>, ya sea a través de análisis proteómico de fracciones de membrana (Stella et al., 2012), ensayos de interacción (Harmey et al., 1995, Schmitt-Ulms et al., 2001, Spielhauer and Schatzl, 2001) o mediante ensayos de inhibición farmacológica que resultan afectar la función de PrP<sup>C</sup> (Monnet et al., 2004). De entre todas ellas, EGFR cumple con los requisitos de ser un receptor de membrana, activado en respuesta a factores de crecimiento y capaz de activar las vías de señalización ERK1/2 y PI3K/AKT que vemos reguladas en nuestro modelo (Zwick et al., 1999, Sturge et al., 2002, Jorissen et al., 2003, Bazley and Gullick, 2005). Además, su activación puede desencadenar la expresión de elementos reguladores del ciclo celular como ciclina D1 (Humtsoe and Kramer, 2010). Además, está ampliamente descrito que EGFR activa la vía MAPK a través de su interacción con Grb2 (Sorkin et al., 2000), una proteína adaptadora que a su vez resulta ser una de las moléculas de interacción descritas de PrP<sup>C</sup> (Lysek and Wuthrich, 2004). Estas características de EGFR sugieren una participación de este receptor en la proliferación de las células N2a dependiente de PrP<sup>C</sup>.

En un intento por corroborar esta hipótesis hemos llevado a cabo dos aproximaciones. En primer lugar debíamos demostrar que el factor de crecimiento epidérmico o EGF, que es uno de los componentes presentes en el suero y principal ligando de EGFR, es capaz por sí solo de reproducir los efectos observados a nivel de señalización y ciclo celular. Los resultados coinciden con los obtenidos inicialmente en respuesta a suero y se ratifican mediante el uso de inhibidores de PI3K como wortmanina. La segunda aproximación requiere demostrar la colocalización de PrP<sup>C</sup> y EGFR, hecho imprescindible para que PrP<sup>C</sup> pueda regular su actividad ya sea por fosforilación o por interacción directa. Varios estudios habían descrito antes la ubicación en los *rafts* lipídicos de ambas proteínas independientes (Ringerike et al., 2002, Lewis and Hooper, 2011) y la necesidad de que éstas estuviesen en estas estructuras de membrana para la correcta transducción de señales (Simons and Toomre, 2000), pero ninguno había demostrado hasta el momento la interacción entre ambas. Mediante ensayos de inmunohistoquímica, fraccionamiento de membrana y co-inmunoprecipitación hemos podido confirmar la colocalización y consecuente interacción de ambas proteínas, así como de otros miembros del macrocomplejo de señalización de EGFR, como Grb2 y p-Src. Además, la interacción del receptor con PrP<sup>C</sup> se incrementa 24 horas después de la estimulación con EGF, coincidiendo con una mayor activación de AKT en células N2a transfectadas con PrP<sup>C</sup>. Nuestras observaciones indican que la interacción PrP<sup>C</sup>-EGFR modula la actividad y la dinámica del receptor, complementando y corroborando los datos previos existentes al respecto *in vitro* en células GT1-7 neuronales y células tumorales A431 (Monnet et al., 2004, Solis et al., 2012) o *in vivo* mediante animales transgénicos *knockout* (Miettinen et al., 1995) o mutantes (Sibilia et al., 2003) para EGFR. Estos últimos muestran fenotipos de desarrollo alterado o incluso letal por afectación de los procesos de migración, proliferación y diferenciación celular.

De todos estos datos podemos extraer que, en células N2a, **PrP<sup>C</sup> forma parte del complejo molecular que regula la activación de EGFR y que, en respuesta a EGF, lleva a la activación de las vías ERK1/2 y AKT y posterior regulación de la proliferación celular y otros procesos básicos del desarrollo** (Figura 17).

## 1.2. PrP<sup>C</sup> regula la dinámica del citoesqueleto de actina.

### La sobreexpresión de PrP<sup>C</sup> induce la formación de filopodios en células N2a

Nuestro modelo de neuroblastoma ha dejado entrever diferencias significativas en la morfología que adquieren las células tras la sobreexpresión transitoria de PrP<sup>C</sup>, incrementando significativamente el número de protrusiones a nivel de membrana en comparación a su control. Esta observación es consistente con lo descrito por Schrock y colaboradores en el mismo tipo celular (Schrock et al., 2009). Sin embargo, el silenciamiento de PrP<sup>C</sup> no parece inducir alteraciones en la morfología celular, contrariamente a lo que otros autores han mostrado previamente en células N2a u otros modelos celulares (p.e. Hela, S2 o 1C11) (Schrock et al., 2009, Loubet et al., 2012). Esto es debido probablemente a diferencias

experimentales (p.e. diferencias entre expresión estable o transitoria de la proteína) o a una marcada especificidad celular.

La modulación del citoesqueleto por parte de PrP<sup>C</sup> ya había sido observada previamente en otros modelos (ver introducción), implicada en procesos de diferenciación celular y neuritogénesis. De hecho, la asociación de PrP<sup>C</sup> con tubulina se ha demostrado por ensayos de *cross-linking* (Nieznanski et al., 2005) y se postula que, mediante esta interacción, PrP<sup>C</sup> actúa como un inhibidor del ensamblaje de microtúbulos por estabilización de los oligómeros de tubulina (Keshet et al., 2000, Nieznanski et al., 2006). Por otro lado, la interacción de PrP<sup>C</sup> con los monómeros de actina también ha sido confirmada por ensayos de coimmunoprecipitación en muestras de cerebro, como parte del complejo distrofina-glicoproteína (Keshet et al., 2000). Finalmente, también se ha observado en cultivos de células madre neuroectodérmicas 1C11 que la depleción de PrP<sup>C</sup> afecta la dinámica de los MFs de manera que éstos pierden su orientación paralela a la vez que incrementan su estabilidad (Loubet et al., 2012). PrP<sup>C</sup> participa, por lo tanto, en la organización dinámica del citoesqueleto.

En nuestro modelo de estudio, el tratamiento de las células N2a con citocalasina D, un potente inhibidor de la polimerización de actina, reduce significativamente las protrusiones de membrana observadas, corroborando la participación del citoesqueleto de actina en el mantenimiento de estas estructuras. Dentro de las posibles estructuras neuronales de membrana formadas por MFs, PrP<sup>C</sup> se ha relacionado con la formación y elongación de filopodios durante el proceso de neuritogénesis. Concretamente parece ubicarse en las adhesiones focales (FAs), donde se ha descrito que desempeña un rol positivo en la dinámica exploratoria de estas estructuras (Schrock et al., 2009, Alleaume-Butaux et al., 2013) en asociación a las proteínas reggie/flotilina (Solis et al., 2010) y a integrinas  $\beta 1$  (Loubet et al., 2012), entre otras. La principal evidencia de esta función de PrP<sup>C</sup> la encontramos *in vivo* en células hipocámpicas deficientes en PrP<sup>C</sup>, que presentan una reducción en el número de filopodios así como conos de crecimiento más cortos debidos en parte a defectos en la señalización dependiente de proteínas reggie/flotilina (Solis et al., 2010, Bodrikov et al., 2011), pero sin afectar la adquisición de la polaridad neuronal. Se ha descrito que las proteínas reggie/flotilina, activadas por PrP<sup>C</sup>, se asocian a cascadas de señalización (p.e. Fyn, MAPK, Exo70 o TC10) que inducen el crecimiento axonal tanto mediante el tráfico polarizado de cargo (p.e. cadherinas) como por su acción sobre el citoesqueleto de actina (Malaga-Trillo et al., 2009, Munderloh et al., 2009, Stuermer, 2010). En concordancia con esta idea, el silenciamiento de reggie también se traduce en la detención de la elongación neurítica en células hipocámpicas así como la reducción de filopodios y neuritas en células N2a (Munderloh et al., 2009, Bodrikov et al., 2011). Esto indica la importancia de los clusters PrP<sup>C</sup>-reggie/flotilina, también presentes en otros puntos de la membrana, en la diferenciación neuronal.

El papel de PrP<sup>C</sup> en la neuritogénesis también se ha corroborado *in vitro* mediante cultivos de células 1C11 o PC12 neuronales, deficientes en PrP<sup>C</sup> por silenciamiento mediante siRNA

(Loubet et al., 2012). En estas condiciones, la falta de PrP<sup>C</sup> se traduce en la imposibilidad de formación de neuritas durante el proceso de diferenciación neuronal, reversible mediante la posterior transfección de niveles específicos de PrP<sup>C</sup>. En conexión con esta idea, también se ha descrito en células N2a que la formación y crecimiento neurítico viene influenciado por los niveles de PrP<sup>C</sup> (Watanabe et al., 2012) y que su acción no implica el dominio N-terminal de la proteína, pues su eliminación no altera su función reguladora durante la neuritogénesis en precursores neuroepiteliales ML (Barenco et al., 2009).

### **EGFR modula la actividad de las Rho GTPasas vía AKT**

Si reanalizamos los datos de *microarrays* en N2a que han servido de punto de partida de este estudio, encontramos que la sobreexpresión de PrP<sup>C</sup> se acompaña de la regulación de genes implicados en el mantenimiento de la función sináptica (p.e. SNAP25) así como en el crecimiento del cono axonal (p.e. Gap43 o *Nm1*) y en (Llorens et al., 2013a). Esto hace pensar que la regulación de la neuritogénesis por parte de PrP<sup>C</sup> va asociada a su función transmisora de señales intracelulares. De hecho, se ha observado que la inhibición de intermediarios de señalización asociados a PrP<sup>C</sup>, incluyendo quinasas Src, la proteína quinasa C (PKC) o PI3K, revierte en parte o totalmente el crecimiento axonal en cultivos primarios neuronales (Chen et al., 2003, Kanaani et al., 2005).

En concordancia con estos datos, el tratamiento con wortmanina, un inhibidor de PI3K, de nuestras células N2a transfectadas con PrP<sup>C</sup> resulta en la disminución del número de filopodios, indicando que la formación de estas estructuras se regula en parte a través de la activación de esta vía de señalización. Estos resultados coinciden con lo reportado en células de hipocampo en que la inhibición de PI3K con wortmanina o LY409002, así como la inhibición de ERK1/2, bloquea la formación del axón. En el mismo modelo, la expresión de formas constitutivamente activas de PI3K produce la generación de múltiples axones (Yoshimura et al., 2006). Esta hipótesis se refuerza mediante ensayos de inmunohistoquímica que han localizado la forma activa de AKT concentrada en los conos de crecimiento en neuronas de hipocampo polarizadas (Shi et al., 2003).

Entre las dianas descritas de la vía PI3K/AKT encontramos las GTPasas de la superfamilia Rho. Concretamente Cdc42 tiene una función esencial en la formación de filopodios y la neuritogénesis (Sturge et al., 2002). Los modelos transgénicos generados *in vivo* mutantes para esta GTPasa muestran defectos en especificidad axonal, probablemente por alteraciones en la regulación de cofilina derivada de la falta de esta proteína (Garvalov et al., 2007). Asimismo, los ensayos *in vitro* también demuestran la participación de esta GTPasa mediante experimentos de ganancia y pérdida de función. Según estas aproximaciones Cdc42 regula la polimerización del citoesqueleto de actina a través principalmente de la formación del complejo de nucleación N-WASP-Arp2/3 (Carrier et al., 1999), ya que la sobreexpresión de N-WASP también favorece la formación de filopodios (Miki et al., 1998). Sin embargo, no podemos descartar la participación de otras GTPasas (p.e. RIF, Ras, RhoA) en este proceso, ya que la

formación de estas protrusiones también se da en ausencia de Cdc42 (Czuchra et al., 2005, Pellegrin and Mellor, 2005, Yoshimura et al., 2006).

El uso de dominantes negativos de las Rho GTPasas (Rac1(N17), RhoA(N19) y Cdc42(N17)) así como de N-WASP (N-WASP- $\Delta$ GBD) en nuestro modelo de N2a transfectadas con PrP<sup>C</sup> nos ha confirmado que la formación de filopodios observada es dependiente de estas RhoGTPasas (Figura 17), aunque mayoritariamente de Cdc42, vía N-WASP, sin descartar la posible implicación de RhoA en la polimerización del citoesqueleto de actina a través de la activación de ROCK-LIMK1 y cofilina (Luo, 2000, Ridley, 2006). Existen indicios, sin embargo, del papel negativo de RhoA sobre el crecimiento neurítico. Se ha visto que la expresión de formas constitutivamente activas de RhoA o ROCK inhiben el proceso de neuritogénesis por estabilización excesiva de los MFs (Bito et al., 2000). Esto deja entrever la importancia de un equilibrio entre los diferentes mecanismos reguladores del citoesqueleto de actina en el proceso de generación de neuritas.

¿Pero a través de qué intermediario localizado en la membrana celular regula PrP<sup>C</sup> la formación de filopodios en células N2a? Si tenemos en cuenta que en las condiciones experimentales en las que describimos un crecimiento de filopodios también observamos un incremento de p-AKT dependiente de EGFR, podemos hipotetizar que la interacción de PrP<sup>C</sup>-EGFR descrita puede estar regulando, en paralelo a otros mecanismos, el crecimiento neurítico (Figura 17). Esta observación engloba y extiende los resultados previamente publicados sobre la regulación de filopodios por la acción de PI3K sobre N-WASP y Cdc42 (Sturge et al., 2002) así como la asociación de EGFR con N-WASP vía Grb2 (Miki et al., 1996). A su vez, estos datos establecen una conexión indirecta entre la regulación del ciclo celular y la diferenciación neuronal mediada por EGFR.

Nuestros resultados sugieren, por lo **tanto, que PrP<sup>C</sup> regula positivamente la formación de filopodios en células N2a a través de la activación de la vía AKT-Cdc42-N-WASP.**

### **PrP<sup>C</sup> actúa como un módulo de señalización durante la neuritogénesis**

Si buscamos entre los ligandos de interacción descritos para PrP<sup>C</sup> a nivel de membrana, son varios más los que están relacionados con la neuritogénesis y podrían sumarse a la función de EGFR durante la diferenciación neuronal, siendo claves en mecanismos de adhesión celular, estabilidad del citoesqueleto y función sináptica (Petrakis and Sklaviadis, 2006). Entre ellos encontramos: 1) el receptor del precursor de laminina (Gauczynski et al., 2001) y la laminina (Graner et al., 2000a, Graner et al., 2000b), 2) N-CAM (Schmitt-Ulms et al., 2001), 3) integrinas (Watts et al., 2009); 4) caveolinas (Mouillet-Richard S, 2000), 5) proteínas del complejo distroglicano (Keshet et al., 2000), o 6) la sinaptofisina y sinapsina I y II (Keshet et al., 2000, Spielhauer and Schatzl, 2001), entre otras.

Este gran número y diversidad de ligandos implicados en la neuritogénesis, que incluyen tanto elementos de matriz extracelular, ligandos solubles o proteínas de membrana, hacen pensar que la función de la proteína priónica depende del entorno extracelular presente en cada

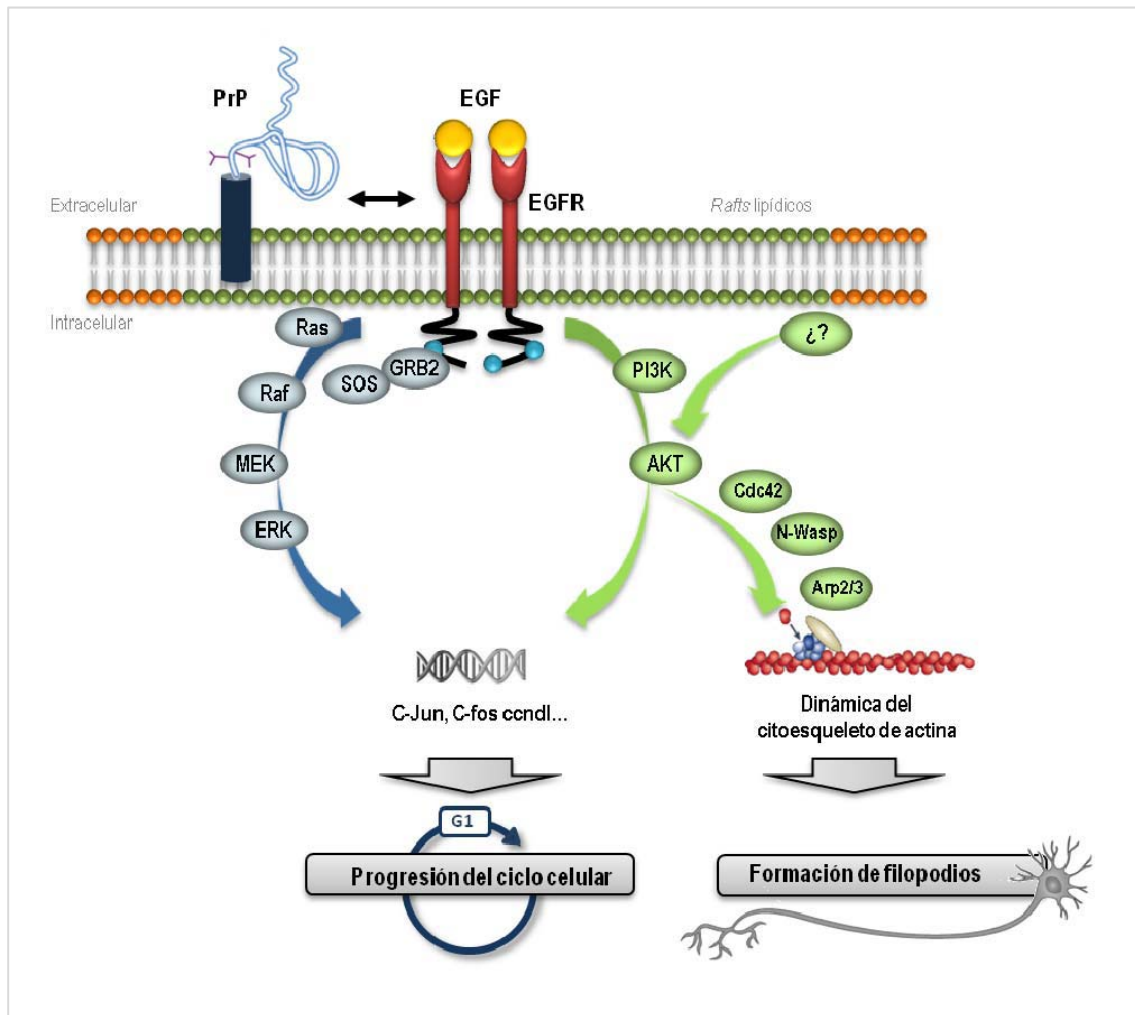
momento (Linden et al., 2008). De esta manera, PrP<sup>C</sup> regula e integra diferentes vías de señalización que recaen principalmente en las pequeñas GTPAsas y que regulan la dinámica del citoesqueleto de manera específica según las tres fases de la neuritogénesis: i) la formación de filopodios, ii) la elongación y formación de la neurita y iii) el establecimiento de la polaridad neuronal (ver (Alleaume-Butaux et al., 2013) para revisión).

A modo de ejemplo, encontramos los experimentos realizados en células madre ectodérmicas 1C11 y células PC12 mencionados anteriormente, que han revelado un efecto regulador negativo de PrP<sup>C</sup> sobre las integrinas  $\beta 1$  (Loubet et al., 2012). El silenciamiento de PrP<sup>C</sup> en estas células lleva a la agregación de integrinas  $\beta 1$  en la membrana celular por redistribución de caveolina-1, que actúa como una plataforma coordinadora de los complejos proteicos involucrados en la señalización por PrP<sup>C</sup> (Pantera et al., 2009). El incremento en la actividad de las integrinas  $\beta 1$  altera la dinámica de las adhesiones focales por acción sobre las quinasas Src y las quinasas de adhesión focal (FAK). Esto causa una activación excesiva de la vía de señalización RhoA-ROCK-LIMK-cofilina, que incrementa la estabilidad de los filamentos de actina limitando el crecimiento neurítico. El bloqueo de esta señalización mediante anticuerpos en las células 1C11 carentes de PrP<sup>C</sup> recupera en parte la neuritogénesis (Loubet et al., 2012).

Otras moléculas como laminina, N-CAM o reggie/flotilina están más involucradas en el proceso de elongación neurítica y adhesión del cono de crecimiento (Sobue, 1993, Malaga-Trillo et al., 2009). La interacción de PrP<sup>C</sup> con laminina, que se ha relacionado con procesos de plasticidad sináptica y memoria, favorece el crecimiento de neuritas de células hipocámpicas mediante el reclutamiento de mGluRs de grupo I (Beraldo et al., 2011). No sorprende pues, que el bloqueo mediante anticuerpos o por ablación con laser de PrP<sup>C</sup> altere el crecimiento neurítico dependiente de laminina en células PC12 (Graner et al., 2000b). Por otro lado, PrP<sup>C</sup> también induce la formación de neuritas mediante el reclutamiento y estabilización en los *rafts* lipídicos de N-CAM, una molécula de adhesión que actúa sobre el citoesqueleto a través de la quinasa p59Fyn (Mouillet-Richard et al., 2000). Se ha descrito que la disrupción de esta interacción en neuronas de hipocampo (Santuccione et al., 2005) o la eliminación de Fyn (Beggs et al., 1994) en células cerebelares detiene el crecimiento neurítico dependiente de N-CAM. Finalmente, y como ya se han comentado anteriormente, la asociación de PrP<sup>C</sup> con reggie/flotilina en los *rafts* lipídicos dirige el tráfico de N-cadherinas durante la elongación axonal, las cuales son esenciales para la formación y correcta función del cono de crecimiento. En concordancia con esta idea, la regulación a la baja de reggie/flotilina, PrP<sup>C</sup> o N-cadherinas en células A431, N2a y células hipocámpicas resulta en defectos en la formación de los conos de crecimiento (Munderloh et al., 2009, Bodrikov et al., 2011).

Todos estos datos presentados apuntan a una participación de PrP<sup>C</sup> en la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina durante la neuritogénesis a través de su capacidad de reclutar e interactuar con múltiples ligandos y regular gran cantidad de vías de señalización a su vez interconectadas. Dependiendo de los ligandos involucrados PrP<sup>C</sup> favorecerá el crecimiento axonal de una manera u otra, aunque también se ha descrito algún caso en que

puede ejercer el efecto opuesto. Se ha observado que PrP<sup>C</sup> interacciona con Caspr (del inglés, *contractin-associated protein*) en la superficie neuronal, potenciando el efecto inhibitorio de esta proteína sobre el crecimiento axonal (Devanathan et al., 2010).



**Figura 17. Mecanismo propuesto de regulación de EGFR por PrP<sup>C</sup> en células N2a.** La interacción de la proteína priónica celular con la forma activa del receptor de EGFR modula la señalización intracelular asociada mediada principalmente por ERK1/2 y AKT. Estas vías de señalización actúan sobre los mecanismos de expresión génica involucrados en la progresión del ciclo celular. Es probable que la activación de AKT por EGFR también module, en parte, la dinámica del citoesqueleto de actina a través de la vía Cdc42—N-WASP—Arp2/3.

### 1.3. PrP<sup>C</sup> es necesaria para la integridad funcional del SNC

#### PrP<sup>C</sup>: de la neuritogénesis al mantenimiento de la función sináptica

En base a lo presentado hasta el momento, PrP<sup>C</sup> parece ser en parte responsable de la complejidad de los circuitos neuronales del SNC, ejerciendo un rol desde la proliferación de precursores neuronales (Steele et al., 2006) hasta la formación de estructuras dendríticas y axonales (Chen et al., 2003, Santucci et al., 2005). No obstante, la función de PrP<sup>C</sup> no parece limitarse únicamente a estas etapas iniciales de la diferenciación, ejerciendo también un

rol importante en etapas posteriores de este proceso celular, como es el establecimiento y mantenimiento de la sinapsis neuronal (Brown, 2001, Menna et al., 2011). La inducción de estructuras sinápticas en cultivos neuronales de hipocampo tras el tratamiento con PrP<sup>C</sup> recombinante constituye una primera evidencia de este rol de PrP<sup>C</sup>, a la que se suma la observación de defectos de polarización y función sináptica en el animal *Prnp-knockout* (Prestori et al., 2008, Bodrikov et al., 2011). De hecho, las alteraciones a nivel de sinapsis constituyen el foco de desarrollo de algunas enfermedades del SNC, entre las cuales encontramos la epilepsia. En las enfermedades causadas por priones (Clinton et al., 1993) también podemos encontrar afectación sináptica derivada de la pérdida o alteración de los circuitos neuronales. En algunos casos, como en enfermos de CJD, estas alteraciones pueden presentarse en forma de episodios epilépticos y mioclonía (Lowden et al., 2008).

Estudios de microscopía electrónica e inmunohistoquímica dirigidos a determinar la ubicación de PrP<sup>C</sup> en diferentes tipos neuronales han coincidido en su localización preferiblemente sináptica (Moya et al., 2000, Bailly et al., 2004, Fournier, 2008), donde interacciona con sinaptofisina y con sinapsina I y II (Keshet et al., 2000, Spielhauer and Schatzl, 2001), esenciales en la formación de vesículas, la modulación de la liberación de neurotransmisores y la sinaptogénesis. De esta manera, PrP<sup>C</sup>, tras la diferenciación neuronal, se concentra en la membrana pre y postsináptica, manteniendo la integridad de la sinapsis mediante un papel regulador de la neurotransmisión (Herms et al., 1999, Brown, 2001, Sales et al., 2002) y la supervivencia neuronal (Chen et al., 2003, Vassallo et al., 2005). Hace ya unos años, que defectos en esta maquinaria sináptica se han identificado en pacientes de CJD (Ferrer et al., 1999).

Aunque en el momento de la generación del ratón *Prnp-knockout* (Bueler et al., 1992, Manson et al., 1994) estos conocimientos no eran tan extensos, eran suficientes como para pensar que la falta de una proteína tan conservada y tan clave en el desarrollo (Steele et al., 2006) produjese alteraciones neurológicas considerables o incluso afectase su supervivencia. No obstante, la ausencia de un fenotipo claro en este modelo (Bueler et al., 1992, Manson et al., 1994) sugería que la falta de PrP<sup>C</sup> debía estar movilizando mecanismos compensatorios (Steele et al., 2007) responsables de enmascarar los déficits cognitivos y las alteraciones en transmisión sináptica que sí se identificaron posteriormente (Collinge et al., 1994, Maglio et al., 2004, Criado et al., 2005, Rangel et al., 2007). Los primeros indicios apuntaban a la proteína Shadoo (Daude and Westaway, 2011, Young et al., 2011) como un buen candidato a suplir la función de PrP<sup>C</sup>, pues el silenciamiento del gen *Sprn* en embriones *Prnp-knockout* resultaba en un fenotipo letal (Young et al., 2009). Sin embargo existen resultados recientes contradictorios (Daude et al., 2012) que hacen que a día de hoy no se conozcan estos mecanismos con certeza.

Collinge J y colaboradores, a través de sus registros en neuronas hipocámpicas del animal *Zurich 1*, concretamente de la región CA1, sacaron a la luz defectos en potenciación a largo plazo así como corrientes de inhibición rápida (AHP) mediada por receptores GABA<sub>A</sub> más débiles (Collinge et al., 1994) en comparación con el animal *wild type*. Resultados coincidentes se obtuvieron posteriormente al analizar el animal *Edinburgh* (Manson et al., 1995). La

asociación de estos defectos electrofisiológicos a la falta de PrP<sup>C</sup> fue corroborada mediante ensayos de rescate por expresión de PrP<sup>C</sup> humana en un fondo génico *knockout* (Whittington et al., 1995, Asante et al., 2004). Pero no tardaron en aparecer resultados contradictorios. Análisis de fijación de membranas o *patch-clamp* en células de purkinje *Zurich I* así como estudios de transmisión sináptica en rodajas de hipocampo de este mismo modelo, no mostraron alteraciones respecto al control (Herms et al., 1995, Lledo et al., 1996). Sin embargo, estos mismos autores rectificaron su posición al observar, por un lado, una reducción de las corrientes de K<sup>+</sup> asociadas a alteraciones en los niveles Ca<sup>2+</sup> intracelular en rodajas de cerebelo *Pmp<sup>0/0</sup>* (Herms et al., 2001) y, por otro lado, la demostración de un patrón sináptico de excitación glutamatérgica (EPSP) dependiente de los niveles de PrP<sup>C</sup> (Carleton et al., 2001).

A estas observaciones se le suman también nuevos indicios de alteraciones en plasticidad sináptica, presentes en forma de defectos en aprendizaje, incremento en la facilitación por pulsos pareados (PPF) y un umbral reducido de generación de LTP en el giro dentado y las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, tanto en animales *Zurich I* y 129Ola *Pmp-knockout* como en modelos de sobreexpresión Tg20 (Maglio et al., 2004, Criado et al., 2005, Rangel et al., 2009). A pesar de que las alteraciones observadas hasta el momento han resultado ser más o menos claras según la cepa de ratón transgénico y la edad del animal (Curtis et al., 2003, Maglio et al., 2006), las múltiples evidencias descritas apuntan a la afectación de la transmisión sináptica, especialmente a nivel del hipocampo, como consecuencia de la falta de PrP<sup>C</sup>.

Estos análisis electrofisiológicos se complementan con estudios histopatológicos y bioquímicos que describen alteraciones estructurales a nivel del hipocampo así como cambios en la homeostasis del calcio y en la expresión de receptores sinápticos. A nivel anatómico, se ha descrito una reorganización del circuito neuronal en el hipocampo del animal *Pmp-knockout* asociado al *sprouting* de las fibras musgosas y al incremento de células granulares en el giro dentado, así como en la capa infrapiramidal de la región CA3 (Colling et al., 1997). Estos cambios estructurales guardan cierta similitud a los que se observan en ciertos tipos de epilepsia como la TLE con esclerosis hipocámpal (Scharfman et al., 2003, Magloczky, 2010).

Los cambios en la homeostasis del calcio también explican el perfil electrofisiológico. Se han descrito alteraciones en los reservorios de Ca<sup>2+</sup> intracelular en las neuronas cerebelares e hipocámpicas *Pmp<sup>0/0</sup>* responsables del descenso en la hiperpolarización (AHP) y debidas a la alteración los mecanismos celulares tamponadores y reguladores del flujo de entrada y salida de este catión (Herms et al., 2000, Powell et al., 2008).

Finalmente, aunque los estudios realizados sobre muestras de sinaptosomas provenientes de animales *Pmp<sup>0/0</sup>* no muestran ninguna alteración en los transportadores de glutamato (Thais et al., 2006), lo que supondría una causa clara de excitabilidad neuronal (Rothstein et al., 1996), sí se ha descrito una alteración de los niveles de receptores GABA, NMDA y AMPA/KA (Maglio et al., 2004, Maglio et al., 2006, Rangel et al., 2009).

Como se ha comentado anteriormente, una aportación importante en este campo se había realizado desde nuestro laboratorio mediante el análisis de *microarrays* de muestras de hipocampo de animales transgénicos, que describe la *up*-regulación de las subunidades GluR1,

GluR6, y GluR7 así como la regulación a la baja de GluR2, entre otras, en el animal *Prnp-knockout* (Rangel et al., 2009). Esta regulación encaja fenotípicamente con los niveles de excitabilidad observados en animales transgénicos mutantes para estas subunidades (Chapman, 2000) y se suma al incremento de subunidades NR2A y NR2B de los receptores de NMDA descrito previamente por Maglio y colaboradores (Maglio et al., 2004, Maglio et al., 2006).

Estos datos completan la lista de factores que ayudan a explicar los defectos sinápticos observados en el animal *Prnp-knockout* y constituyen la base de nuestro segundo trabajo, presentado en el capítulo II.

### **El animal *Prnp*<sup>0/0</sup> muestra una susceptibilidad incrementada a la excitotoxicidad por KA**

Los cambios en la excitabilidad neuronal observados *in vitro* en el hipocampo del animal *Prnp-knockout* son consistentes con el incremento en susceptibilidad que se ha descrito *in vivo* ante la administración de agentes convulsionantes como el KA (Rangel et al., 2007), el NMDA (Khosravani et al., 2008), la pilocarpina o el pentetrazol (PTZ) (Walz et al., 1999), a pesar de existir algún estudio contradictorio al respecto (Ratte et al., 2011). La administración de estas sustancias, junto con la estimulación eléctrica repetida de diferentes áreas del cerebro (también llamado *kindling*) constituyen los principales modelos de estudio de la TLE (García García et al., 2010). Todo indica pues que la pérdida de la función de PrP<sup>C</sup> contribuye a la hiperexcitabilidad y sincronía propia de un ataque epiléptico generado en el neocórtex y el hipocampo (Walz et al., 2002), a la vez que asocia a esta proteína una función neuroprotectora ante fenómenos de excitotoxicidad (Brown et al., 2002, Chiarini et al., 2002, Llorens and Del Rio, 2012).

Es razonable pensar que este incremento en la susceptibilidad del ratón *Prnp-knockout* a agentes convulsionantes vaya asociado a una sensibilidad incrementada a fenómenos de estrés oxidativo (Brown et al., 2002, Sakudo et al., 2003). Este proceso se observa en muchas enfermedades neurodegenerativas y se define como un desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad antioxidante del organismo (Halliwell, 2006). Está descrito que el ratón *Prnp*<sup>0/0</sup> presenta una alteración en los mecanismos moleculares antioxidantes (Klamt et al., 2001) probablemente como consecuencia de la falta de PrP<sup>C</sup>. Se han observado niveles incrementados de oxidación proteica y lipídica así como una reducción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en el cerebro (Klamt et al., 2001) y una mayor afectación tras lesiones inducidas por hipoxia e isquemia, que derivan en muerte celular por niveles elevados de estrés oxidativo. Además, las neuronas *Prnp-knockout* resultan ser más susceptibles al tratamiento con sustancias inductoras de estrés oxidativo, como el peróxido de hidrógeno, presentando tasas elevadas de muerte celular. Estas evidencias sugieren un rol antioxidante de PrP<sup>C</sup>.

Esta función de PrP<sup>C</sup> parece estar mediada por su interacción descrita con ST11 (Lopes et al., 2005) y favorecida por su capacidad de unión a cobre a través de los OR (Brown, 2001). A pesar de que existe cierta controversia, posiblemente por falta de reproducibilidad experimental

(Hutter et al., 2003), existe la posibilidad de que PrP<sup>C</sup> pueda estar actuando por si sola como una SOD-dependiente de Cu<sup>2+</sup> o regulando la actividad de otras proteínas como Cu-Zn SOD, la catalasa o la glutatión reductasa, encargadas de detoxificar las especies reactivas de oxígeno (Waggoner et al., 2000).

La entrada masiva de calcio al interior de la célula por activación incrementada de los GluRs tras un tratamiento con KA genera, por lo tanto, unos niveles de radicales libres (Nicholls, 2004) imposibles de controlar en ausencia de PrP<sup>C</sup>, y que llevan a la muerte celular por apoptosis o necrosis (Martin et al., 1998).

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Rangel et al., 2007) habían mostrado un incremento en la susceptibilidad a KA (8mg/kg) *in vivo* en el animal *Prnp*<sup>0/0</sup> e *in vitro* en rodajas de hipocampo y células N2a *knockout*, pero dejaban sin resolver la incógnita sobre cuáles eran los mecanismos moleculares implicados. Sí mencionaban, sin embargo, una expresión diferencial tanto *in vitro* como *in vivo* de las subunidades GluR6 y GluR7 de los receptores de KA entre ambas condiciones, así como la activación de las vías de señalización de muerte celular ERK1/2, p38 y JNK (Irving and Bamford, 2002, Dhanasekaran and Reddy, 2008). La activación de estas quinasas se asociaba al estrés y la muerte celular derivados del efecto del KA en animales *Prnp-knockout* y ya se había demostrado por otros autores *in vitro* en cultivos neuronales tras el tratamiento con KA o directamente con glutamato (Kawasaki et al., 1997, Schwarzschild et al., 1997, Ferrer et al., 2002, Mao et al., 2004).

El trabajo que hemos realizado durante esta Tesis Doctoral ha ido dirigido a ampliar y complementar estos estudios mediante la incorporación de un nuevo modelo de animal transgénico *knockout* para la proteína priónica celular y para la quinasa JNK3 (*Prnp*<sup>0/0</sup> *Jnk3*<sup>0/0</sup>), con el fin de observar la implicación de esta vía de señalización en la muerte neuronal derivada del tratamiento con KA. La excitotoxicidad por KA en el animal *Prnp*<sup>0/0</sup> *Jnk3*<sup>+/+</sup> produce reactividad astrogliar y muerte neuronal principalmente en el hipocampo, a nivel de la capa de células piramidales de la región CA1 y CA3 (Ben-Ari, 2004, Rangel et al., 2007). Nuestros resultados a 24h tras la administración de KA muestran que la eliminación de JNK3 produce una reversión tanto a nivel fenotípico (expresado en número de episodios epilépticos) como neurotóxico de los efectos observados en el animal *Prnp*<sup>0/0</sup> *Jnk3*<sup>+/+</sup>. El ratón *Prnp*<sup>0/0</sup> *Jnk3*<sup>0/0</sup> no presenta un fenotipo epiléptico remarcable ni muestra marcaje por Fluoro-Jade B ni por análisis TUNEL en los estudios histológicos de hipocampo, similar a lo observado en un animal *wild type* o a lo descrito por otros autores en el animal *Prnp*<sup>+/+</sup> *Jnk3*<sup>0/0</sup> (Yang et al., 1997, de Lemos et al., 2010) o en el dominante negativo del factor de transcripción c-jun (JunAA), donde las serinas de fosforilación 63 y 73 han sido substituidas por alaninas (Behrens et al., 1999). Estos resultados sugieren que la vía de JNK3 debe jugar un papel importante como mediador de la excitotoxicidad por kainato observada en el animal *Prnp-knockout*.

Los experimentos complementarios que hemos realizado *in vitro* en cultivos primarios de hipocampo silenciados para PrP<sup>C</sup> por medio de un vector lentiviral corroboran que la reducción en los niveles de PrP<sup>C</sup> compromete la viabilidad neuronal tras un tratamiento de KA, a la vez que eliminan la posible influencia del fondo génico existente en los modelos *in vivo* (Schauwecker and Steward, 1997, Striebel et al., 2013a, Striebel et al., 2013b). Asimismo, el

tratamiento de rodajas de hipocampo *wild type* y *Prnp-knockout* con un inhibidor farmacológico de JNK (SP600125 o el péptido TAT-JIP) también revierte el efecto neurotóxico del KA, indicando una afectación específica al tipo celular y no derivada de una estimulación de las aferencias extra-hipocámpicas.

Finalmente, el análisis bioquímico y de expresión génica (RTqPCR) de los hipocampos de los tres genotipos estudiados, a 6h tras el tratamiento con KA, muestra la fosforilación de JNK3 y ERK1/2 en el ratón *Prnp<sup>0/0</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>*. A pesar de que la activación de ERK1/2 es coincidente con un patrón de reactividad astrogliar (marcaje GFAP), no podemos descartar la influencia de esta vía sobre factores de transcripción como c-jun o c-fos o sobre la activación de p53 en el modelo *Prnp<sup>0/0</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>*. Esto es debido a que la falta de JNK3 en el modelo doble *knockout* no revierte completamente ni la fosforilación ni el incremento en los niveles de expresión de estos factores, sugiriendo la participación de otras vías de señalización, además de JNK3. También se observa un incremento del marcador de inflamación cox-2 (ciclooxigenasa-2) (Pernot et al., 2011) en ambos modelos *knockout* respecto al animal *wild type*, aunque en mayor medida en el animal *Prnp<sup>0/0</sup>Jnk3<sup>+/+</sup>*. Estos datos coinciden a su vez con la inducción de mecanismos apoptóticos y la inhibición de los antiapoptóticos por JNK3 en respuesta a fenómenos de excitotoxicidad, reportados anteriormente (Popovici et al., 1990, Yang et al., 1997, Rangel et al., 2007, de Lemos et al., 2010, Wang and Qin, 2010, Llorens and Del Rio, 2012). JNK3 también participa en la apoptosis dependiente de p53 derivada del daño en el DNA (Dhanasekaran and Reddy, 2008), una vía de muerte celular con la que se ha relacionado la función antiapoptótica de PrP<sup>C</sup> en modelos de deprivación por suero (Kim et al., 2004).

### **PrP<sup>C</sup> modula la formación del complejo GluR6/7-PSD-95-MLK3 y la activación de JNK3 en respuesta a KA**

Llegados a este punto y conociendo, por un lado, el rol de PrP<sup>C</sup> en la modulación de señales intracelulares (Mouillet-Richard et al., 2000, Spielhaupter and Schatzl, 2001) y por otro, su asociación funcional a los receptores glutamatérgicos (Maglio et al., 2004, Rangel et al., 2007, Khosravani et al., 2008), es lógico pensar que PrP<sup>C</sup> pueda estar modulando la vía JNK3 a través de su interacción con complejos proteicos intermediarios asociados a los KARs. Es probable que esta interacción se dé a través de las subunidades GluR6/7, que son las que se encuentran reguladas (Rangel et al., 2007).

Los experimentos realizados sobre modelos *in vivo* deficientes en GluR6 indican un importante rol de esta subunidad en la transmisión sináptica y los efectos epileptogénicos y celulares producidos por KA en el hipocampo. Estos ratones muestran una reducción de la respuesta epiléptica y de la activación de genes tempranos en respuesta al tratamiento sistémico *in vivo* en comparación al control (Mulle et al., 1998). Además, los estudios electrofisiológicos *in vitro* sobre rodajas de hipocampo, muestran una ausencia de la corriente postsináptica evocada (EPSP) a nivel de la CA3 (Mulle C, 1998), caracterizada en estudios previos (Castillo et al., 1997, Vignes and Collingridge, 1997). A estas evidencias se suman los experimentos *in vitro* de silenciamiento (Pei et al., 2005) o de sobreexpresión (Telfeian et al., 2000) de GluR6 que asignan a esta subunidad un rol neuroprotector ante KA y otros estímulos excitotóxicos (Tian et al., 2005, Pei et al., 2006, Hu et al., 2008, Hu et al., 2009, Yu et al., 2009, Xu et al., 2010).

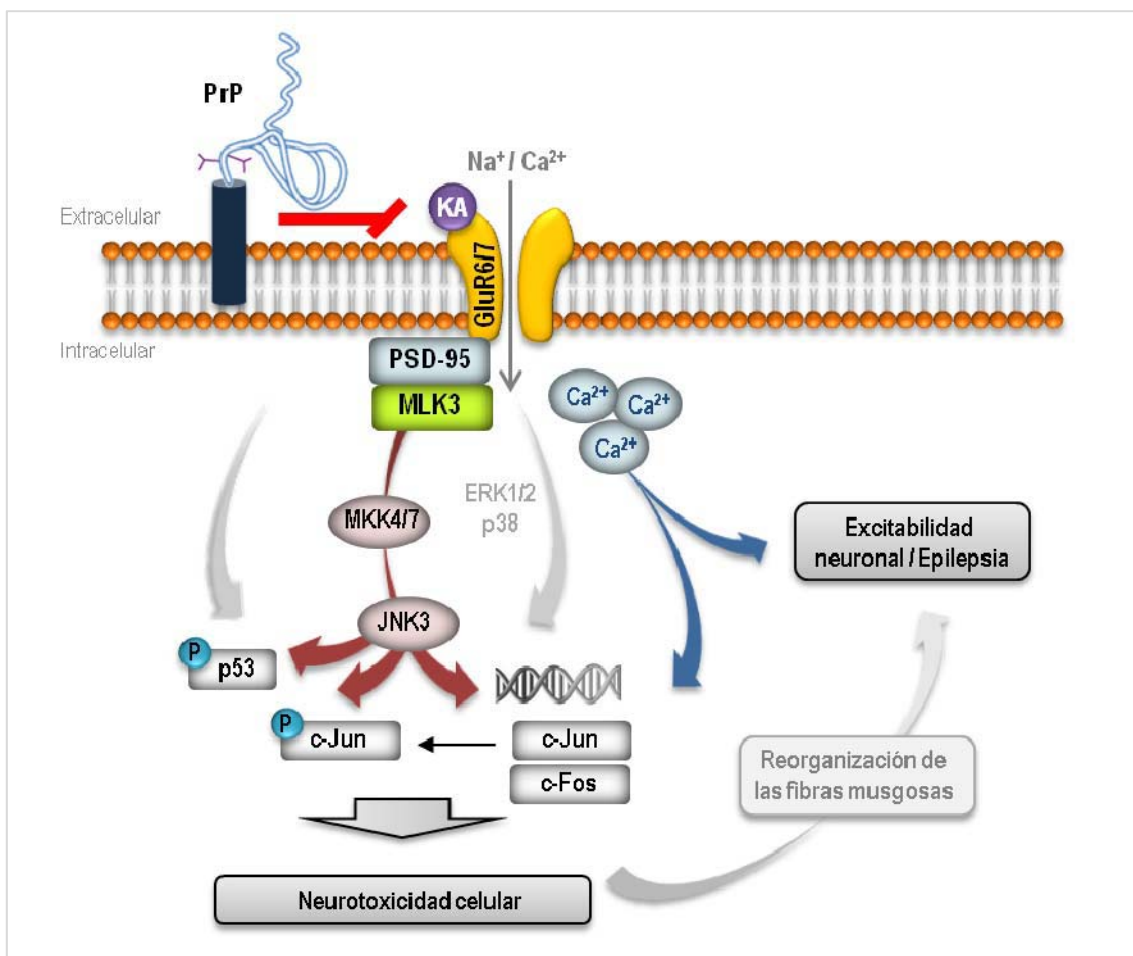
Si reanalizamos los datos presentados de los diferentes animales transgénicos, podemos darnos cuenta que tanto el *knockout* de GluR6 (Mulle et al., 1998), como el de JNK3 (Yang et al., 1997, de Lemos et al., 2010), como el JunAA (Behrens et al., 1999) como el doble *knockout* (Carulla et al., 2011) muestran cierta similitud fenotípica incluyendo la resistencia a la inducción epiléptica y la neurotoxicidad del KA, revirtiendo a su vez el fenotipo observado en el ratón *Prnp<sup>0/0</sup>* (Brown et al., 2002, Rangel et al., 2007). Un análisis más detallado sobre esta conexión entre GluR6 y JNK3, tanto a nivel funcional como en señalización, nos ha llevado a centrar la atención en un complejo proteico formado por GluR6-PSD-95-MLK3 (Savinainen et al., 2001, Pei et al., 2006, Hu et al., 2008, Xu et al., 2010). Está descrito por un lado que la despolarización de GluR6 mediada por KA requiere de su interacción con PSD-95 y MLK3 (Pei et al., 2005, Pei et al., 2006) y que, por el otro, la activación de JNK3 puede darse en respuesta a la formación de este complejo (Li et al., 2010).

Con el fin de identificar una posible participación de PrP<sup>C</sup> en todo este proceso, se han realizado experimentos de colocalización y de inmunoprecipitación con las diferentes proteínas del complejo GluR6/7-PSD-95-MLK3. Nuestros resultados muestran por primera vez la interacción de la proteína priónica con GluR6/7 en las *rafts* lipídicos, a la vez que reflejan la ubicación postsináptica de PrP<sup>C</sup>, hasta el momento dudosa, a través de su interacción con PSD-95. Estos datos se complementan con la interacción de GluR6/7 con PSD-95, que resulta ser mayor tras el tratamiento con KA en el ratón *Prnp<sup>0/0</sup>*.

Una posible explicación a estas observaciones es que, en presencia de KA, la ausencia de PrP<sup>C</sup> favorece la formación del complejo ternario GluR6/7-PSD-95-MLK3, con la posterior activación de la quinasa JNK3 y su diana AP-1. Este complejo de transcripción, constituido por proteínas de la familia c-jun y c-fos (Behrens et al., 1999), entre otras, inicia la expresión de genes de respuesta temprana asociados a muerte celular y regula a la alza los involucrados en la respuesta inflamatoria a KA (p.e. cox-2) (Waetzig et al., 2005). La activación de otros factores como NF- $\kappa$ B también se ha relacionado con la excitotoxicidad por KA (Kaltschmidt et al., 1995) regulando también la expresión de genes involucrados en ciclo celular y apoptosis (Figura 18).

La demostración de esta hipótesis *in vivo* se ha llevado a cabo mediante la administración de un inhibidor farmacológico AMPA/KA (DNQX) y un antagonista específico de GluR6 (NS-102) en los animales *Prnp<sup>+/+</sup> Jnk3<sup>+/+</sup>* y *Prnp<sup>0/0</sup> Jnk3<sup>+/+</sup>* previa al tratamiento con KA. Esto ha resultado en la reversión parcial tanto del fenotipo como de los efectos bioquímicos y neurotóxicos observados en el hipocampo *Prnp<sup>0/0</sup> Jnk3<sup>+/+</sup>*. La epilepsia y la muerte celular producidos por KA también se ven revertidos por la activación de las vías gabaérgicas, que actúan inhibiendo el ensamblaje de GluR6/7-PSD-95-MLK3 y la posterior activación de JNK3 (Li et al., 2010).

En conjunto, todos los datos presentados en el segundo capítulo de esta Tesis Doctoral apoyan la hipótesis sobre un rol neuroprotector de PrP<sup>C</sup> ante la excitotoxicidad por kainato mediante la modulación de la subunidad GluR6 de los receptores glutamatérgicos y posterior activación de la vía JNK3 de muerte celular (Figura 18).



**Figura 18. Mecanismo molecular propuesto para la función neuroprotectora de PrP<sup>C</sup> ante la excitotoxicidad por KA.** La unión del ácido kaínico a los receptores de glutamato favorece la apertura del canal y la formación del complejo GluR6/7-PSD-95-MLK3 que produce la activación de la vía JNK3 de muerte celular y la sobreexpresión de factores de transcripción como c-Jun o c-Fos en células del hipocampo. La entrada masiva de calcio al espacio intracelular también es responsable de la neurotoxicidad observada y del incremento en la excitabilidad neuronal característica de un episodio epiléptico. PrP<sup>C</sup> parece ejercer un papel neuroprotector ante la excitotoxicidad por kainato mediante su interacción a nivel de membrana con GluR6/7, bloqueando la formación del complejo ternario GluR6/7-PSD-95-MLK3 y la consecuente activación de JNK3.

La influencia descrita de PrP<sup>C</sup> sobre otras vías de muerte celular además de JNK3 también ha llevado a sugerir una función antiapoptótica de la proteína. Se ha observado que la privación de suero de cultivos neuronales *Prnp-knockout* (Kim et al., 2004) produce la activación de la vía apoptótica de Bax (Bounhar et al., 2001), reversible mediante la transfección exógena de PrP<sup>C</sup> (Kuwahara et al., 1999). Otra evidencia de ello la encontramos en el uso de modelos celulares, como la línea MCF-7 resistente a apoptosis por TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral alfa) o células gástricas cancerosas, cuyo análisis del perfil de expresión génica ha descrito un incremento considerable de los niveles de *Prnp*-mRNA (Diarra-Mehrpour et al., 2004, Liang et al., 2006). Además, experimentos de hipoxia-isquemia realizados *in vivo* también apoyan en gran parte el rol antiapoptótico de PrP<sup>C</sup> (Weise et al., 2004), al revelar incrementos de expresión asociados al daño cerebral.

Parece ser que no es solamente la PrP<sup>C</sup> anclada a membrana la que presenta este efecto neuroprotector. Formas solubles, carentes de su dominio GPI, así como formas citosólicas inicialmente descritas como neurotóxicas (Ma J, 2002), también han presentado un rol protector

en ciertas circunstancias (Roucou et al., 2003). Contrariamente a lo esperado, la sobreexpresión de PrP<sup>C</sup> tampoco supone un mayor efecto neuroprotector, tal como se observa en los diferentes modelos Tg(wtPrP), que presentan un fenotipo neurodegenerativo dosis-dependiente (Westaway et al., 1994).

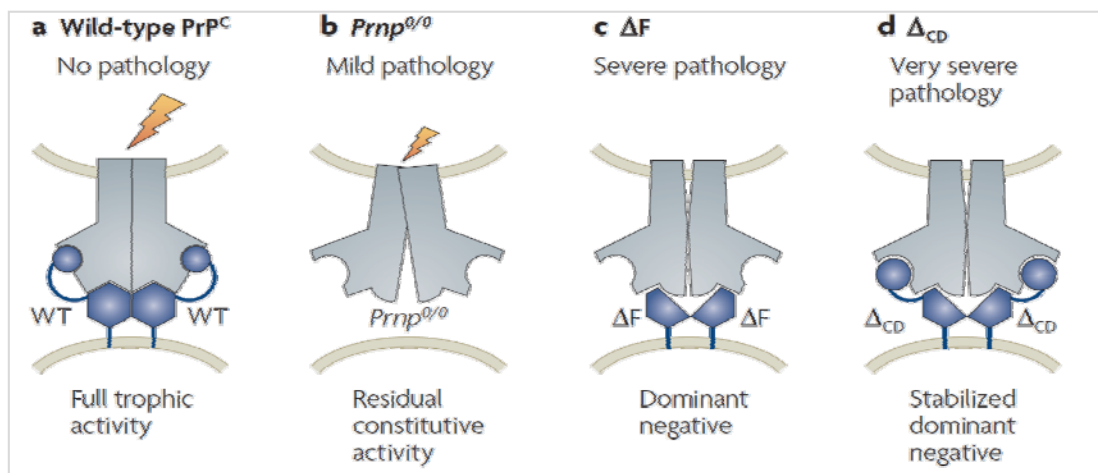
Todos los datos presentados en el capítulo I y II de esta memoria suponen un paso adelante en el conocimiento del papel de la proteína priónica celular en el desarrollo del sistema nervioso central y la modulación de la transmisión sináptica. Hay que recordar que los procesos fisiológicos que hemos tratado en esta discusión no dejan de estar interconectados. A modo de ejemplo, encontramos que se ha descrito un incremento en la expresión de ciclina D1 asociada a los mecanismos apoptóticos derivados del efecto del KA a través de los GluRs (Giardina et al., 1998), reversible mediante inhibidores de CDKs (Giardina and Beart, 2002). En línea con estos datos, también se ha observado que el *input* excitatorio en la capa de células granulares del giro dentado limita la neurogénesis en esta región del hipocampo (Gould et al., 1994). Finalmente, debemos recordar que el Ca<sup>2+</sup> es un regulador esencial en muchas funciones fisiológicas. En base a esto, las alteraciones en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular presentes en el animal *Prnp-knockout* no solo son responsables de alterar los procesos de LTP sino que también están ligadas a la activación de CaMKII, a la regulación del tráfico vesicular y la síntesis proteica mediada por mTor o a la reorganización del citoesqueleto, entre otros procesos (Berridge, 2012).

### **Los mutantes PrP $\Delta$ F y PrP $\Delta$ C4 presentan un fenotipo epiléptico similar al descrito en el animal *Zurich I* tras la administración de KA**

La generación de animales transgénicos de expresión de formas truncadas de PrP<sup>C</sup>, impulsada a partir del descubrimiento de la proteína Dpl en el cerebro de ratones *Nagasaki* (Moore et al., 1999), se ha utilizado desde entonces para identificar los dominios funcionales de PrP<sup>C</sup>. La homología estructural descrita entre la proteína priónica y Dpl dejó entrever, en ese momento, que la falta de ciertas regiones estructurales podía suponer la pérdida de su función neuroprotectora y la adquisición de propiedades neurotóxicas. Concretamente, la inserción de mutantes carentes de la región de los OR en este modelos *Prnp-knockout* hacía que PrP<sup>C</sup> fuese incapaz de revertir la neurodegeneración derivada de Dpl (Atarashi et al., 2003), la cual parecía estar actuando como un antagonista competitivo de PrP<sup>C</sup> por la unión a un hipotético receptor denominado PrP<sub>R</sub>. Este hecho llevó a pensar que la función neuroprotectora de PrP<sup>C</sup> recaía sobre la región N-terminal de la proteína.

Un fenómeno similar se ha observado posteriormente con la generación del ratón PrP $\Delta$ F en un fondo *Prnp*<sup>0/0</sup>, que desarrolla ataxia y una pérdida extensa de las neuronas granulares del cerebelo a edad temprana, derivados de la eliminación de los residuos 32-134 de PrP<sup>C</sup> (Shmerling et al., 1998). Deleciones más cortas dentro de esta misma región, también letales, como la eliminación de los residuos 94-134 en el modelo PrP $\Delta$ CD (Baumann et al., 2007), han permitido reducir la región crítica para la neurotoxicidad de PrP<sup>C</sup> al dominio central. Ambos mutantes parecen actuar como dominantes negativos, manteniendo a PrP<sub>R</sub> en su estado inactivo y eliminando la función neuroprotectora de la proteína (Figura 19).

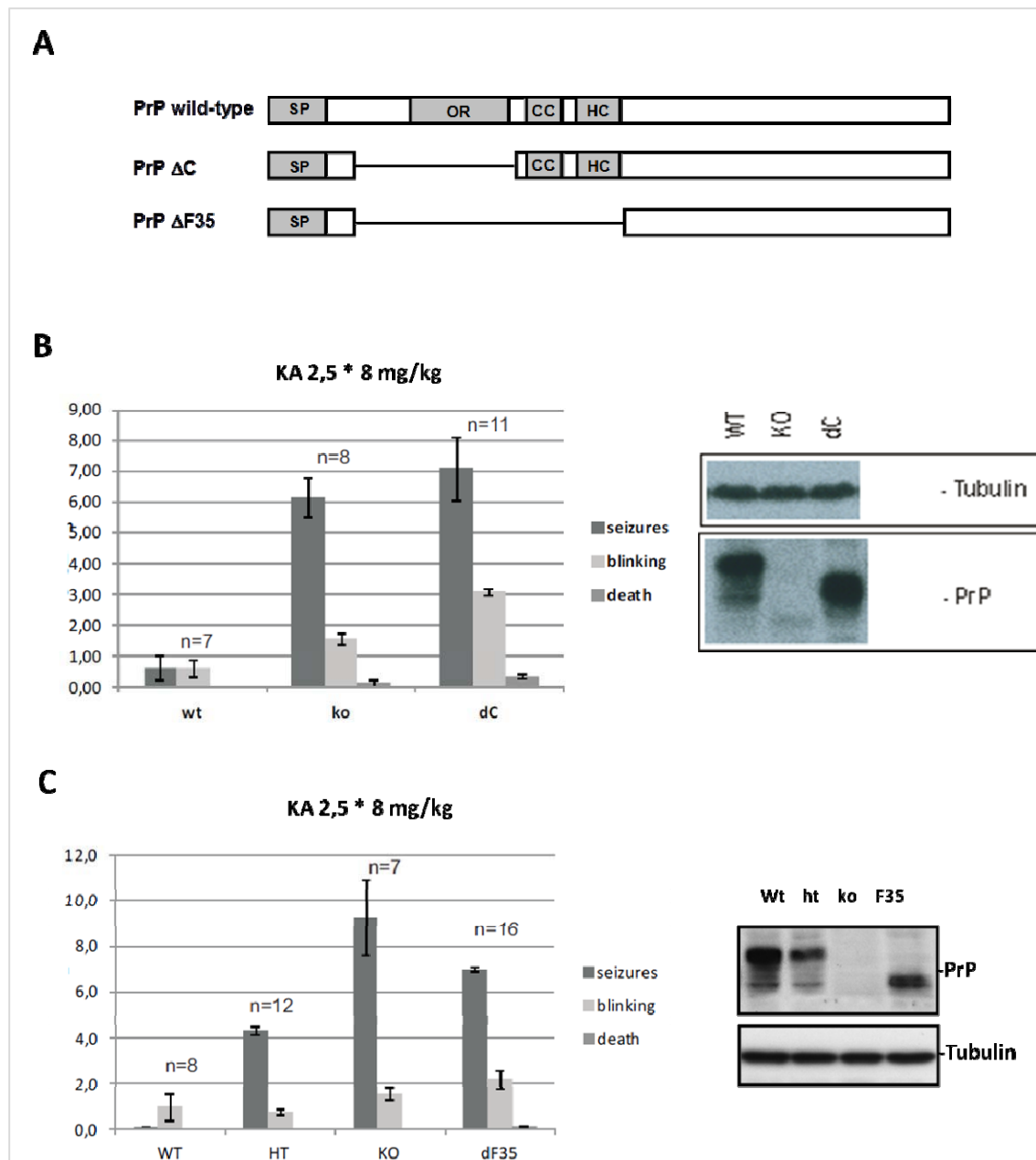
En base a estas observaciones, nos hemos planteado extender nuestros resultados mediante la identificación de los dominios de PrP<sup>C</sup> que pueden estar participando en la neuroprotección a la excitotoxicidad por KA presentada en el capítulo II.



**Figura 19. Modelo hipotético del efecto neurotóxico de PrP<sup>C</sup> y sus variantes.** a) En una situación wt, PrP<sup>C</sup> activa un receptor (PrP<sub>R</sub>), todavía por identificar, permitiendo la transmisión de señales intracelulares por dimerización. b) En ausencia de PrP<sup>C</sup> (ratón *Prnp*<sup>0/0</sup>), PrP<sub>R</sub> presenta cierta actividad residual, ya sea de forma constitutiva o por acción de un ligando. c y d) Formas mutantes de la proteína, que carecen de los residuos 32-134 (PrPΔF) o 94-134 (PrPΔ<sub>CD</sub>), actúan como dominantes negativos, dejando al receptor anclado en un estado inactivo que da lugar a una patología severa. *Adaptado de (Aguzzi et al., 2007).*

La disponibilidad de los animales transgénicos PrPΔF35 (Shmerling et al., 1998) y PrPΔC4 (Flehsig et al., 2000) en nuestro laboratorio, con deleciones de los residuos 32-134 y 32-93 respectivamente, nos ha permitido incluir estos modelos en nuestro experimental *in vivo* y comparar la respuesta epiléptica de cada uno respecto al control *wild type* o al ratón *Prnp-knockout*, todos ellos con un fondo genético mixto C57bl/6-129sv. Mientras el mutante PrPΔC4, carente de los OR, no presenta signos neurológicos aparentes, el PrPΔF35 experimenta una neurodegeneración severa entre las 5 y 8 semanas tras el nacimiento, derivada de cambios patológicos masivos a nivel cerebelar. En consecuencia, el experimental realizado con este modelo se ha llevado a cabo con animales de aproximadamente 5 semanas, a diferencia del resto, que se empleaban a edad adulta, de entre 2 y 3 meses.

Los resultados fenotípicos obtenidos (Figura 20) muestran un incremento en la susceptibilidad a KA de ambos modelos transgénicos (PrPΔF35 y PrPΔC4) similar a la descrita en el ratón *Zurich I*, con un número de episodios epilépticos (tanto *seizures* como *blinkings*) significativamente superior a los del ratón *wild type*. A pesar de que estos resultados apuntan a la participación de la región de los OR en la neuroprotección a la excitotoxicidad por KA, se hace difícil determinar, a partir de datos fenotípicos, diferencias asociadas a la eliminación de fragmentos más o menos extensos de PrP<sup>C</sup>. Además, no podemos descartar la posible influencia de los niveles de expresión de ambas formas truncadas en cada modelo transgénico que, como se muestra por western blot (Figura 20), difieren de la expresión de PrP<sup>C</sup> en el animal control. Es necesario, por lo tanto, complementar estos datos con un estudio histológico y bioquímico de las muestras de estos animales para poder extraer conclusiones más detalladas al respecto.



**Figura 20.** Datos comparativos de la susceptibilidad a KA de ratones C57bl/6-129sv *wild type*, PrP-KO, PrP $\Delta$ C4 y PrP $\Delta$ F35. Número promedio de episodios epilépticos de grado V-VI, cuantificados según se produce la pérdida de estabilidad acompañada de convulsiones epilépticas (*seizures*), episodios tipo “popcorn” (*blinking*) o la muerte del animal. a) Esquema representativo de las regiones deletionadas en los mutantes PrP $\Delta$ C4 y PrP $\Delta$ F35. b) Estudio comparativo de la respuesta epiléptica de ratones PrP $\Delta$ C4 de 2-3 meses de edad y c) de ratones PrP $\Delta$ F35 de 5-7 semanas de edad. Resultados promedios de tres grupos experimentales. n=número de animales por condición. Los datos se acompañan de la detección de PrP<sup>C</sup> por western blot en muestras de hipocampo de los diferentes modelos transgénicos. La detección de tubulina se utiliza como control de carga.

No obstante, estas primeras observaciones nos llevan a pensar en la región de los OR deletionada en el animal PrP $\Delta$ C4 como posible región de interacción de la proteína con la subunidad GluR6/7 del receptor de glutamato, que hemos descrito anteriormente que está implicada en el mecanismo de excitotoxicidad por KA en nuestro modelo (Carulla et al., 2011). La posible implicación de los OR en la función neuroprotectora de PrP<sup>C</sup> ya había sido planteada mediante aproximaciones *in vitro*. Concretamente, la sobreexpresión de formas truncadas carentes de los OR sobre un cultivo neuronal deficiente de PrP<sup>C</sup> y privado de suero produce

un incremento significativo en la muerte por apoptosis, derivada de una inhibición de la función SOD y de la consecuente activación de la vía de las caspasas (Sakudo et al., 2003). Asimismo, ensayos realizados con la proteína purificada indican que la inserción de más repeticiones en el dominio de los OR resulta en alteraciones conformacionales que incrementan la susceptibilidad a fenómenos de estrés oxidativo, siendo el efecto mayor como mayor sea el número de inserciones (Yin et al., 2006).

A modo de hipótesis, y teniendo en cuenta que la estructura de PrP<sup>C</sup>, es posible que la proteína interaccione con el receptor a través de su dominio globular pero que sea el extremo N-terminal flexible el responsable de su activación. De esta manera, la eliminación de los residuos 32-134 y 32-93 en nuestros mutantes PrP $\Delta$ F35 y PrP $\Delta$ C4, pertenecientes al extremo N-terminal, podrían estar influyendo en la activación del receptor pero no impidiendo la interacción.

#### **1.4. La influencia del fondo génico en el fenotipo del ratón *Prnp-knockout***

Como ya se ha ido mencionando durante esta discusión, las estrategias destinadas a conocer la función de PrP<sup>C</sup> *in vivo* han estado basadas principalmente en el estudio fenotípico de modelos experimentales murinos en los que se ha eliminado o inactivado la expresión de *Prnp* (Weissmann and Flechsig, 2003). La falta de alteraciones destacables, tanto a nivel fisiológico y anatómico, como durante el desarrollo de los animales *Zrch 1* y *Edbg*, ha llevado múltiples grupos de investigación a establecer hipótesis sobre las posibles funciones de PrP<sup>C</sup> (Steele et al., 2007, Aguzzi et al., 2008a, Chiesa and Harris, 2009, Biasini et al., 2012). Sin embargo, la disparidad en los datos fenotípicos publicados al respecto junto con la falta de reproducibilidad de algunos de ellos *in vitro*, sugiere la posible participación de factores no directamente derivados de la ausencia de la proteína. A pesar de las grandes ventajas que proporciona el uso de ratones transgénicos en la investigación científica, existe la posibilidad de que la abundancia de fenotipos atribuidos a la delección de PrP<sup>C</sup> (Steele et al., 2007) sea consecuencia de aspectos técnicos derivados de la generación de estos modelos (Gerlai, 1996). En la mayoría de los casos, estos ratones se mantienen en un fondo génico mixto derivado de las células madre embrionarias (ESC) empleadas (normalmente de una de las subcepas 129) y de la línea parental (p.e. C57Bl/6 o Balb/c, entre otras), lo que genera una variabilidad genotípica que puede llegar a ser responsable de alguno de los fenotipos observados. Además, esta variabilidad puede incrementarse durante la manipulación y mantenimiento de estos animales en el laboratorio, haciendo cada vez más difícil la reproducibilidad de modelos entre grupos independientes. El establecimiento de controles génicos rutinarios ayudaría a solventar el problema, sin embargo, prácticamente ninguno de los fenotipos asociados a PrP<sup>C</sup> se ha descrito descartando la posible influencia del fondo génico.

De los diferentes modelos *Prnp-knockout* generados (Weissmann and Flechsig, 2003), el ratón *Edinburgh* se mantiene en un fondo puro 129Ola (Manson et al., 1994), pero la dificultad de trabajar con esta cepa ha llevado al uso mayoritario del ratón *Zurich 1* (Bueler et al., 1992), de

fondo génico mixto C57bl/6-129sv, en algunos casos retrocruzado varias generaciones para intentar eliminar el fondo 129. No hay que olvidar, sin embargo, que incluso después de doce generaciones de retrocruces el alelo *knockout* aún está flanqueado con aproximadamente el 1% del genoma de las ESC originales (Gerlai, 1996). Por otro lado, los experimentos de rescate en los que se reintroduce la proteína en el animal *knockout* para observar una reversión fenotípica, tampoco suponen una forma completamente fiable de corroborar la función de PrP<sup>C</sup>. De hecho, esta aproximación ya llevó en su día a asignar erróneamente a esta proteína la neurodegeneración observada en el ratón *Nagasaki* (Sakaguchi et al., 1996), cuando en realidad, era resultado de la sobreexpresión de la proteína Dpl (Weissmann and Aguzzi, 1999).

Como consecuencia de todos estos factores, existe cierta confusión que hace que sea difícil establecer conclusiones firmes sobre la función de la proteína priónica celular.

Concretamente a nivel de la asociación de PrP<sup>C</sup> con la susceptibilidad a agentes excitotóxicos, existen considerables resultados contradictorios. Varios grupos independientes, entre ellos el nuestro, coinciden en que el animal *Prnp-knockout* es más susceptible que el animal *Prnp*<sup>+/+</sup> al tratamiento con KA, PTZ o pilocarpina, presentando una respuesta epiléptica y/o neurotoxicidad incrementada respecto al control (Walz et al., 1999, Rangel et al., 2007, Khosravani et al., 2008, Carulla et al., 2011). No obstante, resultados opuestos han sido presentados en publicaciones recientes (Ratte et al., 2011, Striebel et al., 2013b). La primera de ellas describe una menor actividad epileptogénica en rodajas de hipocampo *Prnp*<sup>0/0</sup> expuestas a PTZ y bicuculina o a condiciones de ausencia de magnesio, mientras que la segunda, presenta un estudio comparativo de la respuesta epiléptica de algunos de los diferentes ratones *Prnp-knockout* utilizados normalmente en el estudio de la función neuroprotectora de PrP<sup>C</sup> (p.e. 129Ola, C57bl/10snJ), dejando evidente la influencia del fondo génico en el fenotipo epiléptico y el consecuente uso común de controles erróneos (Striebel et al., 2013b). La diferente susceptibilidad a fenómenos excitotóxicos de diferentes cepas de ratones ya había sido advertida en los años noventa por Schauwecker y colaboradores, destacando una marcada neuroprotección a la excitotoxicidad por glutamato en las cepas C57BL/6 y BALB/c en comparación a las cepas 129/sv y FVB/N (Schauwecker and Steward, 1997).

El mismo tipo de contrariedades se observan, en paralelo, en estudios electrofisiológicos realizados *in vivo* e *in vitro* sobre modelos *Prnp-knockout*, claramente relacionados con posibles defectos en la excitabilidad neuronal que desencadenan un episodio epiléptico. Mientras unos grupos defienden alteraciones en LTP y AHP en este modelo (Collinge et al., 1994, Manson et al., 1995), corroboradas por ensayos de rescate (Whittington et al., 1995, Asante et al., 2004), otros no observan diferencias significativas respecto al control (Herms et al., 1995, Lledo et al., 1996, Calella et al., 2010). Los varios intentos realizados para esclarecer este fenotipo han llegado a la conclusión que los resultados obtenidos son altamente dependientes de la cepa y edad de los ratones empleados así como de las diferentes condiciones experimentales (Curtis et al., 2003, Maglio et al., 2006).

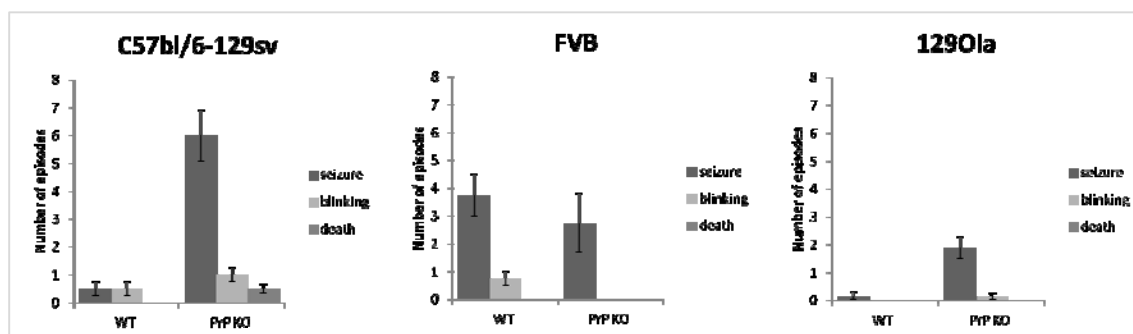
Con todas estas evidencias, es muy probable, por lo tanto, que el fondo génico sea responsable de parte de la susceptibilidad a estímulos excitotóxicos del ratón *Prnp-knockout*, pero no de su totalidad. No hay que olvidar que este fenotipo epiléptico ha sido corroborado mediante otras aproximaciones en las que el fondo génico no juega un papel significativo. Éstas incluyen, el desarrollo de un modelo *Prnp-knockout in vivo* consistente en la delección transitoria del gen homólogo *Prp2* en *zebrafish*, que resulta en un incremento respecto al control *wild type* del comportamiento convulsionante en respuesta a PTZ (Fleisch et al., 2013). Asimismo, los datos procedentes de ensayos *in vitro* también apoyan estas observaciones. Entre ellos encontramos el incremento en neurotoxicidad descrito sobre cultivos primarios de hipocampo silenciados para PrP<sup>C</sup> y tratados con KA, presentados en el capítulo II de esta Tesis (Carulla et al., 2011), así como la observada por otro grupo tras el tratamiento con NMDA (Khosravani et al., 2008).

En un intento de nuestro por aportar datos complementarios que demuestren que la falta de PrP<sup>C</sup> en el ratón *Zurich I*, y no solo el fondo génico, participan en la susceptibilidad a KA que observamos *in vivo*, hemos incluido en nuestro experimental los modelos murinos *wild type* y *Prnp-knockout* de las cepas FVB y 129Ola. Los resultados preliminares (Figura 21) confirman, por un lado, que diferentes cepas de ratones responden de forma diferencial a la administración intraperitoneal de una misma dosis de KA (8mg/kg). Los gráficos indican como los ratones FVB *wild type* son mucho más susceptibles que los 129Ola o los C57bl/6-129sv, con un promedio de entre 3 y 4 *seizures* y algún episodio más severo, en forma de *blinking*. Por otro lado, si comparamos el número de episodios epilépticos entre los animales *wild type* y *Prnp-knockout* de esta misma cepa, podemos observar que ambos muestran un fenotipo similar, con tendencia a una mayor afectación del animal *wild type*. Sin embargo, los resultados de la cepa 129Ola reproducen, aunque de forma más discreta, las diferencias en susceptibilidad que hemos descrito previamente en los ratones C57bl/6-129sv. Teniendo en cuenta que estos ratones provienen de una cepa pura, este fenotipo no puede ser debido a la hipotética influencia de los genes flanqueantes de *Prnp*, lo que reafirma el rol de la proteína priónica en la neuroprotección ante la excitotoxicidad por KA. Probablemente, los diferentes niveles de susceptibilidad entre cepas sean debidos a diferentes umbrales de afectación, de tal manera que cada una requerirá de dosis distintas de KA para poder observar diferencias fenotípicas significativas dependientes de PrP<sup>C</sup>. Es necesario realizar experimentos bioquímicos y análisis histológicos complementarios para corroborar estas observaciones.

Los resultados que hemos obtenido en los ratones 129Ola difieren de lo publicado por Striebel y colaboradores, los cuales no observan diferencias significativas entre los animales 129Ola-wt y 129Ola-KO. Esto puede ser debido a pequeñas diferencias experimentales o a criterios ligeramente distintos a la hora de analizar o cuantificar el comportamiento epiléptico.

Podemos concluir, por lo tanto, que el trabajo con animales transgénicos requiere el control exhaustivo del fondo génico de los animales de estudio para una correcta interpretación de los datos, siendo preferente el uso de cepas coisogénicas, idénticas en todos los genes a excepción de *Prnp*. De la misma manera, se hace imprescindible corroborar los resultados

obtenidos con otro tipo de aproximaciones *in vitro* en los que el efecto observado pueda ser únicamente consecuencia de la ablación de PrP<sup>C</sup>.



**Figura 21.** Respuesta epiléptica y muerte derivada de la administración de KA en diferentes cepas de ratones *Prnp-knockout*. Número promedio de episodios observados en ratones de fondo genético mixto C57bl/6-129sv y ratones de fondo FVB y 129Ola coisogénicos, tras la administración intraperitoneal de cuatro inyecciones de KA (8mg/kg) a tiempos= 0, 30, 60 y 90 minutos. Los datos representados corresponden a episodios de severidad V-VI que incluyen la pérdida de estabilidad acompañada de convulsiones epilépticas (cuantificadas como *seizures*) y los episodios tipo *pop-corn* (cuantificadas como *blinking*). Se cuantifica también el número de ratones muertos dentro de las tres horas de seguimiento experimental. Los resultados provienen de un mínimo de 2 experimentos por grupo y de entre 5 y 10 animales por condición.

### 1.5. Tanto la pérdida de función de PrP<sup>C</sup> como la ganancia de toxicidad de PrP<sup>SC</sup> contribuyen al desarrollo de la fisiopatología de las EETs

Los resultados presentados en esta memoria giran principalmente entorno la hipótesis de que la reducción de los niveles endógenos de PrP<sup>C</sup> por transformación de esta proteína en una forma anómala patológica (Prusiner, 1982, Tuite and Serio, 2010) puede contribuir a la neurotoxicidad observada en las enfermedades causadas por priones. Esta idea se basa principalmente en los múltiples procesos fisiológicos en los que parece participar PrP<sup>C</sup>, sobre todo a nivel de neuroprotección, descritos a partir de estudios de pérdida y ganancia de función realizados tanto *in vitro* como *in vivo*. La hipótesis de pérdida de función, sin embargo, no excluye que esta neurotoxicidad pueda ser mediada por PrP<sup>SC</sup> (Hetz et al., 2003). De hecho, la resistencia descrita a la infección por priones así como la ausencia de un fenotipo neurodegenerativo destacable en las cepas murinas *Zurich 1* y *Edinburgh* hacen evidente que la reducción de los niveles de PrP<sup>C</sup> no puede ser la única responsable (Bueler et al., 1992, Bueler et al., 1993). Además, la participación de posibles mecanismos compensatorios durante el desarrollo de estos modelos parece haberse descartado al observar la falta de fenotipo neurodegenerativo también en un modelo de ablación post-natal de PrP<sup>C</sup> *in vivo* (Mallucci et al., 2002).

Se ha demostrado también, tanto en modelos animales como en humanos, que la acumulación de PrP<sup>SC</sup> a nivel del SNC está asociada a la activación procesos apoptóticos (Gray et al., 1999). De la misma manera, el tratamiento con el péptido sintético PrP(106-126), el cual se ha visto que reproduce algunas propiedades fisicoquímicas y patogénicas de PrP<sup>SC</sup>, ha resultado

ser neurotóxico en diferentes líneas celulares y cultivos primarios neuronales (Forloni et al., 1993, Selvaggini et al., 1993, Gavin et al., 2005, Vilches et al., 2013). No obstante, también existen indicios de que esta neurotoxicidad es, en cierta manera, dependiente de la presencia de PrP<sup>C</sup> (Brown et al., 1994)

En base a estas evidencias, se podría especular que la pérdida de la función neuroprotectora de PrP<sup>C</sup> podría participar intensificando el efecto neurotóxico mediado por PrP<sup>SC</sup>, de manera que ambos factores serían responsables de la fisiopatología de las EETs.

## 1.6. PrP como diana de estudio para el tratamiento de las prionopatías y otras enfermedades neurodegenerativas

Durante las últimas dos décadas, se ha progresado enormemente en el conocimiento de la naturaleza de los priones, su proceso de transmisión y replicación y su neurotoxicidad. Este avance ha llevado a iniciar la búsqueda de una diana terapéutica para el tratamiento de las EETs (Colby and Prusiner, 2011). A primera instancia, PrP<sup>SC</sup> parece ser la diana más lógica. Se han realizado múltiples *screenings in vitro* con el fin de identificar compuestos capaces de reducir la carga de PrP<sup>SC</sup>, ya sea mediante mecanismos que: i) incrementen su eliminación del organismo, ii) disminuyan su estabilidad o iii) interfieran en el proceso de conversión (ver (Mallucci and Collinge, 2005, Sim and Caughey, 2009) para revisión). Aunque algunas de las moléculas resultantes han llegado a mostrar efectos modestos sobre la progresión de la enfermedad en modelos animales, ninguna de ellas a resultado en la prevención o cura completa.

Estos resultados ponen en evidencia que reducir la cantidad de PrP<sup>SC</sup> no es la estrategia más efectiva para tratar las prionopatías. Además, se ha observado que los procesos de infección y neurodegeneración difieren cronológicamente. La infección por PrP<sup>SC</sup> se acumula relativamente rápido y requiere solamente de una mínima cantidad de PrP<sup>C</sup>, sin embargo, la neurodegeneración que observamos requiere mucho más tiempo y depende directamente de la cantidad de PrP<sup>C</sup> que se expresa en el cerebro. Este hecho apoya, por un lado, la “hipótesis de pérdida de función” y apunta, por otro, a la posibilidad de que la unión de PrP<sup>C</sup> y PrP<sup>SC</sup> desencadene una cascada de señalización neurotóxica independiente de la propagación del prion (Hetz et al., 2003).

La hipótesis de que la función fisiológica de PrP<sup>C</sup> es importante en la patología priónica ha impulsado, por otro lado, estrategias basadas en el silenciamiento de la expresión de PrP<sup>C</sup> *in vivo* e *in vitro* o a la identificación de inhibidores farmacológicos de su actividad. A pesar de que la participación descrita de PrP<sup>C</sup> en un gran número de procesos celulares (Lasmezas, 2003, Linden et al., 2008) anticipa importantes efectos secundarios, la reducción de sus niveles de expresión mediante un vector lentiviral dirigido al hipocampo de ratones infectados ha dado lugar a beneficios terapéuticos considerables (White et al., 2008). Otras estrategias en desarrollo se basan en la identificación de ligandos de PrP<sup>C</sup> (Aguzzi et al., 2008a) o posibles

moléculas que puedan actuar como chaperonas y estabilizar el plegamiento de PrP<sup>C</sup>, evitando su conversión (Mallucci and Collinge, 2005).

Considerando el hecho de que el mecanismo de propagación de la enfermedad priónica guarda cierta similitud con otras enfermedades neurodegenerativas (Frost and Diamond, 2010, Norrby, 2011), el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas a controlar la replicación de los priones pueden también ser útiles para tratar estas otras. Concretamente, el plegamiento inapropiado y posterior agregación de proteínas que observamos en las prionopatías constituye el mecanismo de propagación común dentro de las llamadas enfermedades amiloides (Eisenberg and Jucker, 2012), que se caracterizan por la agregación de proteínas concretas según la patología (Tabla 6).

A modo de ejemplo, fibras amiloides de PrP<sup>C</sup> inerte forman placas características en algunas prionopatías, mientras que fibras compuestas por el péptido A $\beta$  forman placas en la enfermedad de Alzheimer (AD) (Meyer-Luehmann et al., 2006, Aguzzi and Gitler, 2013). Además, filamentos helicoidales compuestos de tau hiperfosforilado forma ovillos fibrilares en la AD o agregados filamentosos en otras taupatías (Clavaguera et al., 2009). Por otro lado, el  $\alpha$ -sinucleína se enriquece en láminas beta antes de polimerizar en fibras amiloides que forman los cuerpos de Lewy, presentes en algunos tipos de demencia (Fujiwara et al., 2002).

Disease	Protein
Prion diseases	PrP-TSE
Alzheimer's disease	Amyloid-beta
Tauopathies	Tau
Parkinson's disease	Alpha-synuclein
AA amyloidosis	Amyloid A
Huntington's disease	Polyglutamine

**Tabla 6. Mecanismo de agregación proteica en enfermedades amiloides.** Modificado de (Norrby, 2011).

Además, existen evidencias recientes de una participación de PrP<sup>C</sup> en los defectos sinápticos presentes en la enfermedad de Alzheimer, proponiéndose como un posible receptor de los oligómeros A $\beta$  (Gavin et al., 2008, Lauren et al., 2009, Gavin et al., 2010). Esta asociación ha sido recientemente confirmada por Um JW y colaboradores, que describen como los complejos A $\beta$ -PrP<sup>C</sup> producen alteraciones en la función neuronal por activación de mGluR5 (Um et al., 2013).

### 1.7. Próximos pasos en el estudio de PrP<sup>C</sup>

A pesar del enorme esfuerzo que se está realizando para ampliar la información existente sobre enfermedades causada por priones, queda aún mucho camino por recorrer. El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral supone un intento más de esclarecer la función fisiológica

de PrP<sup>C</sup> y su posible implicación en el proceso fisiopatológico de las EETs. Sin embargo, los nuevos datos presentados hacen plantearnos nuevos interrogantes.

Por un lado, hemos descrito como PrP<sup>C</sup> regula algunos aspectos de la proliferación y la diferenciación neuronal durante del desarrollo y en la edad adulta (Steele et al., 2006), con un rol específico sobre el ciclo celular y la neuritogénesis (Llorens et al., 2013a). No obstante sigue existiendo mucha controversia al respecto derivada de la especificidad celular y temporal con la que PrP<sup>C</sup> regula estos procesos. Por otro lado, hemos descrito una modulación de PrP<sup>C</sup> sobre la subunidad GluR6/7 de los receptores de KA (Carulla et al., 2011), con influencia a nivel de la señalización intracelular de muerte por excitotoxicidad (Llorens and Del Rio, 2012), y con posible participación de la región de los OR (Figura 20). Esta información puede ser muy útil para entender patologías sinápticas como la epilepsia (Walz et al., 2002), pero seguimos requiriendo más información al respecto, por ejemplo, sobre cómo se puede llevar a cabo esta interacción. PrP<sup>C</sup> podría estar influenciando la unión del agonista, favoreciendo el estado cerrado del canal o incluso interfiriendo negativamente en la transducción de la señales a través de la formación de un complejo regulador (Steele, 2008).

También queda mucho por descubrir respecto a la interacción de PrP<sup>C</sup> con otro tipo de receptores de glutamato. Sí se ha observado la regulación de receptores AMPA (Watt et al., 2012), KA (Rangel et al., 2009), NMDA (Khosravani et al., 2008, Fleisch et al., 2013) y también mGluRs (Beraldo et al., 2011) por PrP<sup>C</sup> pero únicamente se ha demostrado su interacción con las subunidades GluR1 y GluR2 (Watt NT, 2012) o la subunidad NR2D de los receptores NMDA (Khosravani et al., 2008) a partir de experimentos de recaptación de Zn y de excitotoxicidad por NMDA, respectivamente.

Por otro lado, el desarrollo *in vitro* de construcciones mutantes para PrP<sup>C</sup> así como la generación de animales transgénicos *Prnp-knockout* o que expresan formas truncadas de la proteína constituyen una amplia herramienta de investigación aún por explotar. A día de hoy ya está ayudando a identificar los dominios funcionales y los mecanismos de interacción entre PrP<sup>C</sup> y sus múltiples ligandos descritos, pero también entre PrP<sup>C</sup> y PrP<sup>Sc</sup> (Shmerling et al., 1998, Baumann et al., 2009). Quizás sea a partir de estos estudios que se pueda encontrar una diana más específica dirigida a evitar la conversión de PrP<sup>C</sup> a su forma patógena. Sin embargo, hay que ser precavidos con el uso de estos modelos, descartando siempre la posible influencia del fondo génico en los resultados obtenidos.

Finalmente, cabe subrayar que los análisis de *high-throughput* proporcionan una enorme fuente de información útil para el estudio de la función fisiológica de PrP<sup>C</sup>. Sin embargo, aún existe cierta dificultad en su interpretación, que ha sido motivo, en más de una ocasión, de resultados contradictorios y de falta de reproducibilidad experimental (Llorens et al., 2013b). Este hecho es especialmente importante en modelos en los que se ha observado una regulación génica moderada, en los que se regulan genes con bajos niveles de expresión o en los que existe una dificultad de validación, ya sea por falta de significancia en los datos de genómica funcional o por ausencia de datos funcionales asociados. Es por este motivo que, en la presente tesis, se ha optado por la validación de los datos obtenidos mediante métodos cuantitativos de

expresión génica complementarios (p.e. RTqPCR) y también mediante diversas aproximaciones funcionales.

Seguir trabajando en cada uno de estos aspectos planteados permitirá avanzar en el conocimiento de estas partículas proteicas denominadas “priones”.

# CONCLUSIONES

---





1. La modulación transitoria de los niveles de PrP<sup>C</sup> en células Neuro2a produce la regulación de genes principalmente involucrados en procesos de ciclo celular y proliferación.
2. La sobreexpresión de PrP<sup>C</sup> produce un incremento en los niveles proliferativos de células Neuro2a, tanto en cultivos asincrónicos como tras estimulación con suero o EGF. Contrariamente, el silenciamiento de PrP<sup>C</sup> produce una parada en fase G1 del ciclo celular.
3. Los cambios proliferativos dependientes de PrP<sup>C</sup> van acompañados de alteraciones en la cinética de activación de las vías de señalización de ERK1/2 y AKT.
4. PrP<sup>C</sup> modula la señalización intracelular y la proliferación a través de su interacción con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), en los *rafts* lipídicos.
5. La sobreexpresión de PrP<sup>C</sup> en células Neuro2a produce un incremento significativo en la formación de filopodios por su acción sobre la dinámica del citoesqueleto de actina a través de la vía AKT-Cdc42-N-WASP.
6. PrP<sup>C</sup> participa en el mantenimiento de la función sináptica mediante la regulación de la excitabilidad neuronal. Su ausencia produce un incremento en la susceptibilidad a kainato (KA).
7. Tanto la delección de JNK3 como su inhibición farmacológica *in vivo* e *in vitro* revierte el fenotipo epiléptico y la neurotoxicidad celular observada tras el tratamiento con KA en un fondo génico *Prnp-knockout*.
8. PrP<sup>C</sup> ejerce su papel neuroprotector, a nivel postsináptico, a través de su interacción con la subunidad GluR6/7 de los receptores de kainato y PSD-95, evitando la formación del complejo trimérico GluR6/7-PSD-95-MLK3 y la consecuente activación de la vía JNK3 de muerte celular.



# BIBLIOGRAFÍA

---





- Aarts MM, Tymianski M (2004) Molecular mechanisms underlying specificity of excitotoxic signaling in neurons. *Current molecular medicine* 4:137-147.
- Aguzzi A, Baumann F, Bremer J (2008a) The prion's elusive reason for being. *Annual review of neuroscience* 31:439-477.
- Aguzzi A, Calella AM (2009) Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiological reviews* 89:1105-1152.
- Aguzzi A, Gitler AD (2013) A Template for New Drugs against Alzheimer's Disease. *Cell* 154:1182-1184.
- Aguzzi A, Heikenwalder M, Polymenidou M (2007) Insights into prion strains and neurotoxicity. *Nature reviews Molecular cell biology* 8:552-561.
- Aguzzi A, Montrasio F, Kaeser PS (2001) Prions: health scare and biological challenge. *Nature reviews Molecular cell biology* 2:118-126.
- Aguzzi A, O'Connor T (2010) Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives. *Nature reviews Drug discovery* 9:237-248.
- Aguzzi A, Sigurdson C, Heikenwaelder M (2008b) Molecular mechanisms of prion pathogenesis. *Annual review of pathology* 3:11-40.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. Garland Science New York.
- Alper T (1972) The nature of the scrapie agent. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 6:154-155.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:629-634.
- Alleaume-Butaux A, Dakowski C, Pietri M, Mouillet-Richard S, Launay JM, Kellermann O, Schneider B (2013) Cellular prion protein is required for neuritogenesis: fine-tuning of multiple signaling pathways involved in focal adhesions and actin cytoskeleton dynamics. *Cell Health and Cytoskeleton* 5:1-12.
- Aranda-Anzaldo A (1992) Possible cell-free prion replication. *Medical hypotheses* 38:249-251.
- Arimura N, Kaibuchi K (2007) Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nature reviews Neuroscience* 8:194-205.
- Arundine M, Tymianski M (2004) Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 61:657-668.
- Asante EA, Li YG, Gowland I, Jefferys JG, Collinge J (2004) Pathogenic human prion protein rescues PrP null phenotype in transgenic mice. *Neuroscience letters* 360:33-36.
- Atarashi R, Nishida N, Shigematsu K, Goto S, Kondo T, Sakaguchi S, Katamine S (2003) Deletion of N-terminal residues 23-88 from prion protein (PrP) abrogates the potential to rescue PrP-deficient mice from PrP-like protein/doppel-induced Neurodegeneration. *The Journal of biological chemistry* 278:28944-28949.
- Attwell D, Gibb A (2005) Neuroenergetics and the kinetic design of excitatory synapses. *Nature reviews Neuroscience* 6:841-849.
- Bahn S, Volk B, Wisden W (1994) Kainate receptor gene expression in the developing rat brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14:5525-5547.
- Bailly Y, Haeberle AM, Blanquet-Grossard F, Chasserot-Golaz S, Grant N, Schulze T, Bombarde G, Grassi J, Cesbron JY, Lemaire-Vieille C (2004) Prion protein (PrP<sub>c</sub>) immunocytochemistry and expression of the green fluorescent protein reporter gene under control of the bovine PrP gene promoter in the mouse brain. *The Journal of comparative neurology* 473:244-269.
- Barenco MG, Valori CF, Roncoroni C, Loewer J, Montrasio F, Rossi D (2009) Deletion of the amino-terminal domain of the prion protein does not impair prion protein-dependent

- neuronal differentiation and neuritogenesis. *Journal of neuroscience research* 87:806-819.
- Barmada S, Piccardo P, Yamaguchi K, Ghetti B, Harris DA (2004) GFP-tagged prion protein is correctly localized and functionally active in the brains of transgenic mice. *Neurobiology of disease* 16:527-537.
- Barnes AP, Polleux F (2009) Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annual review of neuroscience* 32:347-381.
- Barrenetxea G (2012) Iatrogenic prion diseases in humans: an update. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 165:165-169.
- Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C (1986) Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46:417-428.
- Basu U, Guan le L, Moore SS (2012) Functional genomics approach for identification of molecular processes underlying neurodegenerative disorders in prion diseases. *Current genomics* 13:369-378.
- Baumann F, Pahnke J, Radovanovic I, Rulicke T, Bremer J, Tolnay M, Aguzzi A (2009) Functionally relevant domains of the prion protein identified in vivo. *PLoS one* 4:e6707.
- Baumann F, Tolnay M, Brabeck C, Pahnke J, Kloz U, Niemann HH, Heikenwalder M, Rulicke T, Burkle A, Aguzzi A (2007) Lethal recessive myelin toxicity of prion protein lacking its central domain. *The EMBO journal* 26:538-547.
- Bazley LA, Gullick WJ (2005) The epidermal growth factor receptor family. *Endocrine-related cancer* 12 Suppl 1:S17-27.
- Beekes M, McBride PA, Baldauf E (1998) Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *The Journal of general virology* 79 ( Pt 3):601-607.
- Beggs HE, Soriano P, Maness PF (1994) NCAM-dependent neurite outgrowth is inhibited in neurons from Fyn-minus mice. *The Journal of cell biology* 127:825-833.
- Behrens A, Sibilio M, Wagner EF (1999) Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nature genetics* 21:326-329.
- Bellacosa A, Chan TO, Ahmed NN, Datta K, Malstrom S, Stokoe D, McCormick F, Feng J, Tsichlis P (1998) Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene* 17:313-325.
- Ben-Ari Y (2004) History of Neuroscience: Kainic Acid and Temporal Lobe Epilepsy. *IBRO History of Neuroscience*.
- Benson JD, Chen YN, Cornell-Kennon SA, Dorsch M, Kim S, Leszczyniecka M, Sellers WR, Lengauer C (2006) Validating cancer drug targets. *Nature* 441:451-456.
- Benvegnu S, Poggiolini I, Legname G (2010) Neurodevelopmental expression and localization of the cellular prion protein in the central nervous system of the mouse. *The Journal of comparative neurology* 518:1879-1891.
- Benvegnu S, Roncaglia P, Agostini F, Casalone C, Corona C, Gustincich S, Legname G (2011) Developmental influence of the cellular prion protein on the gene expression profile in mouse hippocampus. *Physiological genomics* 43:711-725.
- Beraldo FH, Arantes CP, Santos TG, Machado CF, Roffe M, Hajj GN, Lee KS, Magalhaes AC, Caetano FA, Mancini GL, Lopes MH, Americo TA, Magdesian MH, Ferguson SS, Linden R, Prado MA, Martins VR (2011) Metabotropic glutamate receptors transduce signals for neurite outgrowth after binding of the prion protein to laminin gamma1 chain. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25:265-279.
- Berliocchi L, Bano D, Nicotera P (2005) Ca<sup>2+</sup> signals and death programmes in neurons. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 360:2255-2258.

- Berridge MJ (2012) Cell Signalling Biology.
- Bett C, Fernandez-Borges N, Kurt TD, Lucero M, Nilsson KP, Castilla J, Sigurdson CJ (2012) Structure of the beta2-alpha2 loop and interspecies prion transmission. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26:2868-2876.
- Biasini E, Turnbaugh JA, Unterberger U, Harris DA (2012) Prion protein at the crossroads of physiology and disease. *Trends in neurosciences* 35:92-103.
- Bito H, Furuyashiki T, Ishihara H, Shibasaki Y, Ohashi K, Mizuno K, Maekawa M, Ishizaki T, Narumiya S (2000) A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons. *Neuron* 26:431-441.
- Bodrikov V, Solis GP, Stuermer CA (2011) Prion protein promotes growth cone development through reggie/flotillin-dependent N-cadherin trafficking. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:18013-18025.
- Boeckers TM (2006) The postsynaptic density. *Cell and tissue research* 326:409-422.
- Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218:1309-1311.
- Bounhar Y, Zhang Y, Goodyer CG, LeBlanc A (2001) Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 276:39145-39149.
- Brandner S, Isenmann S, Raeber A, Fischer M, Sailer A, Kobayashi Y, Marino S, Weissmann C, Aguzzi A (1996) Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* 379:339-343.
- Bribian A, Fontana X, Llorens F, Gavin R, Reina M, Garcia-Verdugo JM, Torres JM, de Castro F, del Rio JA (2012) Role of the cellular prion protein in oligodendrocyte precursor cell proliferation and differentiation in the developing and adult mouse CNS. *PloS one* 7:e33872.
- Brown DR (2001) Prion and prejudice: normal protein and the synapse. *Trends in neurosciences* 24:85-90.
- Brown DR, Besinger A (1998) Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *The Biochemical journal* 334 ( Pt 2):423-429.
- Brown DR, Herms J, Kretzschmar HA (1994) Mouse cortical cells lacking cellular PrP survive in culture with a neurotoxic PrP fragment. *Neuroreport* 5:2057-2060.
- Brown DR, Nicholas RS, Canevari L (2002) Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. *Journal of neuroscience research* 67:211-224.
- Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, von Bohlen A, Schulz-Schaeffer W, Giese A, Westaway D, Kretzschmar H (1997) The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 390:684-687.
- Brown JR, Nigh E, Lee RJ, Ye H, Thompson MA, Saudou F, Pestell RG, Greenberg ME (1998) Fos family members induce cell cycle entry by activating cyclin D1. *Molecular and cellular biology* 18:5609-5619.
- Budka H (2003) Neuropathology of prion diseases. *British medical bulletin* 66:121-130.
- Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73:1339-1347.
- Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356:577-582.
- Calella AM, Farinelli M, Nuvolone M, Mirante O, Moos R, Falsig J, Mansuy IM, Aguzzi A (2010) Prion protein and Abeta-related synaptic toxicity impairment. *EMBO molecular medicine* 2:306-314.

- Carleton A, Tremblay P, Vincent JD, Lledo PM (2001) Dose-dependent, prion protein (PrP)-mediated facilitation of excitatory synaptic transmission in the mouse hippocampus. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 442:223-229.
- Carlier MF, Ducruix A, Pantaloni D (1999) Signalling to actin: the Cdc42-N-WASP-Arp2/3 connection. *Chemistry & biology* 6:R235-240.
- Carulla P, Bribian A, Rangel A, Gavin R, Ferrer I, Caelles C, Del Rio JA, Llorens F (2011) Neuroprotective role of PrPC against kainate-induced epileptic seizures and cell death depends on the modulation of JNK3 activation by GluR6/7-PSD-95 binding. *Molecular biology of the cell* 22:3041-3054.
- Cashman NR, Loertscher R, Nalbantoglu J, Shaw I, Kascsak RJ, Bolton DC, Bendheim PE (1990) Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell* 61:185-192.
- Castillo PE, Malenka RC, Nicoll RA (1997) Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. *Nature* 388:182-186.
- Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, Fraser G, Stalder AK, Beibel M, Staufenbiel M, Jucker M, Goedert M, Tolnay M (2009) Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nature cell biology* 11:909-913.
- Clinton J, Forsyth C, Royston MC, Roberts GW (1993) Synaptic degeneration is the primary neuropathological feature in prion disease: a preliminary study. *Neuroreport* 4:65-68.
- Cohen S (1983) The epidermal growth factor (EGF). *Cancer* 51:1787-1791.
- Colby DW, Prusiner SB (2011) Prions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3:a006833.
- Colling SB, Khana M, Collinge J, Jefferys JG (1997) Mossy fibre reorganization in the hippocampus of prion protein null mice. *Brain research* 755:28-35.
- Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR, Jefferys JG (1994) Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370:295-297.
- Collins SJ, Lawson VA, Masters CL (2004) Transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet* 363:51-61.
- Cortez LM, Sim VL (2013) Implications of prion polymorphisms. *Prion* 7.
- Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, Reynolds BA, Weiss S, van der Kooy D (1996) In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:2649-2658.
- Crececius AC, Helmstetter D, Strangmann J, Mitteregger G, Frohlich T, Arnold GJ, Kretzschmar HA (2008) The brain proteome profile is highly conserved between Prnp<sup>-/-</sup> and Prnp<sup>+/+</sup> mice. *Neuroreport* 19:1027-1031.
- Criado JR, Sanchez-Alavez M, Conti B, Giacchino JL, Wills DN, Henriksen SJ, Race R, Manson JC, Chesebro B, Oldstone MB (2005) Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons. *Neurobiology of disease* 19:255-265.
- Curtis J, Errington M, Bliss T, Voss K, MacLeod N (2003) Age-dependent loss of PTP and LTP in the hippocampus of PrP-null mice. *Neurobiology of disease* 13:55-62.
- Czuchra A, Wu X, Meyer H, van Hengel J, Schroeder T, Geffers R, Rottner K, Brakebusch C (2005) Cdc42 is not essential for filopodium formation, directed migration, cell polarization, and mitosis in fibroblastoid cells. *Molecular biology of the cell* 16:4473-4484.
- Chadi S, Young R, Le Guillou S, Tilly G, Bitton F, Martin-Magniette ML, Soubigou-Taconnat L, Balzergue S, Vilotte M, Peyre C, Passet B, Beringue V, Renou JP, Le Provost F, Laude H, Vilotte JL (2010) Brain transcriptional stability upon prion protein-encoding gene invalidation in zygotic or adult mouse. *BMC genomics* 11:448.
- Chapman AG (2000) Glutamate and epilepsy. *The Journal of nutrition* 130:1043S-1045S.

- Chen S, Mange A, Dong L, Lehmann S, Schachner M (2003) Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. *Molecular and cellular neurosciences* 22:227-233.
- Cheng PL, Poo MM (2012) Early events in axon/dendrite polarization. *Annual review of neuroscience* 35:181-201.
- Chesebro B, Race R, Wehrly K, Nishio J, Bloom M, Lechner D, Bergstrom S, Robbins K, Mayer L, Keith JM, et al. (1985) Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* 315:331-333.
- Chesebro B, Trifilo M, Race R, Meade-White K, Teng C, LaCasse R, Raymond L, Favara C, Baron G, Priola S, Caughey B, Masliah E, Oldstone M (2005) Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science* 308:1435-1439.
- Chianini F, Fernandez-Borges N, Vidal E, Gibbard L, Pintado B, de Castro J, Priola SA, Hamilton S, Eaton SL, Finlayson J, Pang Y, Steele P, Reid HW, Dagleish MP, Castilla J (2012) Rabbits are not resistant to prion infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:5080-5085.
- Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R (2002) Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *The EMBO journal* 21:3317-3326.
- Chiesa R, Harris DA (2009) Fishing for prion protein function. *PLoS biology* 7:e75.
- Chiesa R, Piccardo P, Ghetti B, Harris DA (1998) Neurological illness in transgenic mice expressing a prion protein with an insertional mutation. *Neuron* 21:1339-1351.
- da Silva JS, Dotti CG (2002) Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nature reviews Neuroscience* 3:694-704.
- Da Silva JS, Medina M, Zuliani C, Di Nardo A, Witke W, Dotti CG (2003) RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin IIa-mediated control of actin stability. *The Journal of cell biology* 162:1267-1279.
- Daikhin Y, Yudkoff M (2000) Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *The Journal of nutrition* 130:1026S-1031S.
- Dalby NO, Mody I (2001) The process of epileptogenesis: a pathophysiological approach. *Current opinion in neurology* 14:187-192.
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Progress in neurobiology* 65:1-105.
- Daude N, Westaway D (2011) Biological properties of the PrP-like Shadoo protein. *Front Biosci (Landmark Ed)* 16:1505-1516.
- Daude N, Wohlgemuth S, Brown R, Pitstick R, Gapeshina H, Yang J, Carlson GA, Westaway D (2012) Knockout of the prion protein (PrP)-like Sprn gene does not produce embryonic lethality in combination with PrP(C)-deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:9035-9040.
- de Lemos L, Junyent F, Verdaguer E, Folch J, Romero R, Pallas M, Ferrer I, Auladell C, Camins A (2010) Differences in activation of ERK1/2 and p38 kinase in Jnk3 null mice following KA treatment. *Journal of neurochemistry* 114:1315-1322.
- de Wit M, Jimenez CR, Carvalho B, Belien JA, Delis-van Diemen PM, Mongera S, Piersma SR, Vikas M, Navani S, Ponten F, Meijer GA, Fijneman RJ (2012) Cell surface proteomics identifies glucose transporter type 1 and prion protein as candidate biomarkers for colorectal adenoma-to-carcinoma progression. *Gut* 61:855-864.
- Delorenzo RJ, Sun DA, Deshpande LS (2005) Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: the calcium hypothesis of the induction and maintenance of epilepsy. *Pharmacology & therapeutics* 105:229-266.
- Dent EW, Gupton SL, Gertler FB (2011) The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3.
- Detwiler LA (1992) Scrapie. *Rev Sci Tech* 11:491-537.

- Devanathan V, Jakovcevski I, Santuccione A, Li S, Lee HJ, Peles E, Leshchyns'ka I, Sytnyk V, Schachner M (2010) Cellular form of prion protein inhibits Reelin-mediated shedding of Caspr from the neuronal cell surface to potentiate Caspr-mediated inhibition of neurite outgrowth. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:9292-9305.
- Dhanasekaran DN, Reddy EP (2008) JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 27:6245-6251.
- Diarra-Mehrpour M, Arrabal S, Jalil A, Pinson X, Gaudin C, Pietu G, Pitaval A, Ripoche H, Eloit M, Dormont D, Chouaib S (2004) Prion protein prevents human breast carcinoma cell line from tumor necrosis factor alpha-induced cell death. *Cancer research* 64:719-727.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological reviews* 51:7-61.
- Doherty J, Dingledine R (2002) The roles of metabotropic glutamate receptors in seizures and epilepsy. *Current drug targets CNS and neurological disorders* 1:251-260.
- Dong XX, Wang Y, Qin ZH (2009) Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta pharmacologica Sinica* 30:379-387.
- Du J, Pan Y, Shi Y, Guo C, Jin X, Sun L, Liu N, Qiao T, Fan D (2005) Overexpression and significance of prion protein in gastric cancer and multidrug-resistant gastric carcinoma cell line SGC7901/ADR. *International journal of cancer Journal international du cancer* 113:213-220.
- Du L, Rao G, Wang H, Li B, Tian W, Cui J, He L, Laffin B, Tian X, Hao C, Liu H, Sun X, Zhu Y, Tang DG, Mehrpour M, Lu Y, Chen Q (2013) CD44-positive cancer stem cells expressing cellular prion protein contribute to metastatic capacity in colorectal cancer. *Cancer research* 73:2682-2694.
- Eisenberg D, Jucker M (2012) The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell* 148:1188-1203.
- Engel J, Jr. (1996) Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy research* 26:141-150.
- Erlich RB, Kahn SA, Lima FR, Muras AG, Martins RA, Linden R, Chiarini LB, Martins VR, Moura Neto V (2007) ST11 promotes glioma proliferation through MAPK and PI3K pathways. *Glia* 55:1690-1698.
- Ettaiche M, Pichot R, Vincent JP, Chabry J (2000) In vivo cytotoxicity of the prion protein fragment 106-126. *The Journal of biological chemistry* 275:36487-36490.
- Falsig J, Sonati T, Herrmann US, Saban D, Li B, Arroyo K, Ballmer B, Liberski PP, Aguzzi A (2012) Prion pathogenesis is faithfully reproduced in cerebellar organotypic slice cultures. *PLoS pathogens* 8:e1002985.
- Fantl V, Stamp G, Andrews A, Rosewell I, Dickson C (1995) Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development. *Genes & development* 9:2364-2372.
- Favre-Krey L, Theodoridou M, Boukouvala E, Panagiotidis CH, Papadopoulos AI, Sklaviadis T, Krey G (2007) Molecular characterization of a cDNA from the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) encoding a fish prion protein. *Comparative biochemistry and physiology Part B, Biochemistry & molecular biology* 147:566-573.
- Ferguson KM, Berger MB, Mendrola JM, Cho HS, Leahy DJ, Lemmon MA (2003) EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Molecular cell* 11:507-517.
- Ferrer I, Blanco R, Carmona M, Puig B, Dominguez I, Vinals F (2002) Active, phosphorylation-dependent MAP kinases, MAPK/ERK, SAPK/JNK and p38, and specific transcription factor substrates are differentially expressed following systemic administration of kainic acid to the adult rat. *Acta neuropathologica* 103:391-407.
- Ferrer I, Rivera R, Blanco R, Marti E (1999) Expression of proteins linked to exocytosis and neurotransmission in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiology of disease* 6:92-100.

- Finkbeiner S, Greenberg ME (1996) Ca<sup>2+</sup>-dependent routes to Ras: mechanisms for neuronal survival, differentiation, and plasticity? *Neuron* 16:233-236.
- Fioriti L, Dossena S, Stewart LR, Stewart RS, Harris DA, Forloni G, Chiesa R (2005) Cytosolic prion protein (PrP) is not toxic in N2a cells and primary neurons expressing pathogenic PrP mutations. *The Journal of biological chemistry* 280:11320-11328.
- Flechsigs E, Hegyi I, Leimeroth R, Zuniga A, Rossi D, Cozzio A, Schwarz P, Rulicke T, Gotz J, Aguzzi A, Weissmann C (2003) Expression of truncated PrP targeted to Purkinje cells of PrP knockout mice causes Purkinje cell death and ataxia. *The EMBO journal* 22:3095-3101.
- Flechsigs E, Shmerling D, Hegyi I, Raeber AJ, Fischer M, Cozzio A, von Mering C, Aguzzi A, Weissmann C (2000) Prion protein devoid of the octapeptide repeat region restores susceptibility to scrapie in PrP knockout mice. *Neuron* 27:399-408.
- Fleisch VC, Leighton PL, Wang H, Pillay LM, Ritzel RG, Bhinder G, Roy B, Tierney KB, Ali DW, Waskiewicz AJ, Allison WT (2013) Targeted mutation of the gene encoding prion protein in zebrafish reveals a conserved role in neuron excitability. *Neurobiology of disease* 55:11-25.
- Fletcher DA, Mullins RD (2010) Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 463:485-492.
- Forloni G, Angeretti N, Chiesa R, Monzani E, Salmona M, Bugiani O, Tagliavini F (1993) Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 362:543-546.
- Forster E, Zhao S, Frotscher M (2006) Laminating the hippocampus. *Nature reviews Neuroscience* 7:259-267.
- Fournier JG (2008) Cellular prion protein electron microscopy: attempts/limits and clues to a synaptic trait. Implications in neurodegeneration process. *Cell and tissue research* 332:1-11.
- Fournier JG, Escaig-Haye F, Billette de Villemeur T, Robain O (1995) Ultrastructural localization of cellular prion protein (PrP<sub>c</sub>) in synaptic boutons of normal hamster hippocampus. *Comptes rendus de l'Academie des sciences Serie III, Sciences de la vie* 318:339-344.
- Fournier JG, Escaig-Haye F, Grigoriev V (2000) Ultrastructural localization of prion proteins: physiological and pathological implications. *Microscopy research and technique* 50:76-88.
- Freitas RM, Sousa FC, Vasconcelos SM, Viana GS, Fonteles MM (2004) Pilocarpine-induced status epilepticus in rats: lipid peroxidation level, nitrite formation, GABAergic and glutamatergic receptor alterations in the hippocampus, striatum and frontal cortex. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 78:327-332.
- Freitas RM, Vasconcelos SM, Souza FC, Viana GS, Fonteles MM (2005) Oxidative stress in the hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus in Wistar rats. *The FEBS journal* 272:1307-1312.
- Friedman LK, Veliskova J (1998) GluR2 hippocampal knockdown reveals developmental regulation of epileptogenicity and neurodegeneration. *Brain research Molecular brain research* 61:224-231.
- Frost B, Diamond MI (2010) Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nature reviews Neuroscience* 11:155-159.
- Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, Shen J, Takio K, Iwatsubo T (2002) alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nature cell biology* 4:160-164.
- Gabriel JM, Oesch B, Kretzschmar H, Scott M, Prusiner SB (1992) Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:9097-9101.
- Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433-1438.
- Gajdusek DC (1977) Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science* 197:943-960.

- Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M (1966) Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 209:794-796.
- Gambetti P, Kong Q, Zou W, Parchi P, Chen SG (2003) Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. *British medical bulletin* 66:213-239.
- Garcia Garcia ME, Garcia Morales I, Matias Guiu J (2010) [Experimental models in epilepsy]. *Neurologia* 25:181-188.
- Garvalov BK, Flynn KC, Neukirchen D, Meyn L, Teusch N, Wu X, Brakebusch C, Bamberg JR, Bradke F (2007) Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:13117-13129.
- Gauczynski S, Peyrin JM, Haik S, Leucht C, Hundt C, Rieger R, Krasemann S, Deslys JP, Dormont D, Lasmezas CI, Weiss S (2001) The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *The EMBO journal* 20:5863-5875.
- Gavin R, Braun N, Nicolas O, Parra B, Urena JM, Mingorance A, Soriano E, Torres JM, Aguzzi A, del Rio JA (2005) PrP(106-126) activates neuronal intracellular kinases and Egr1 synthesis through activation of NADPH-oxidase independently of PrPc. *FEBS letters* 579:4099-4106.
- Gavin R, Ferrer I, del Rio JA (2010) Involvement of Dab1 in APP processing and beta-amyloid deposition in sporadic Creutzfeldt-Jakob patients. *Neurobiology of disease* 37:324-329.
- Gavin R, Urena J, Rangel A, Pastrana MA, Requena JR, Soriano E, Aguzzi A, Del Rio JA (2008) Fibrillar prion peptide PrP(106-126) treatment induces Dab1 phosphorylation and impairs APP processing and Abeta production in cortical neurons. *Neurobiology of disease* 30:243-254.
- Georgieva D, Koker M, Redecke L, Perbandt M, Clos J, Bredehorst R, Genov N, Betzel C (2004) Oligomerization of the proteolytic products is an intrinsic property of prion proteins. *Biochemical and biophysical research communications* 323:1278-1286.
- Gerlai R (1996) Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype? *Trends in neurosciences* 19:177-181.
- Giardina SF, Beart PM (2002) Kainate receptor-mediated apoptosis in primary cultures of cerebellar granule cells is attenuated by mitogen-activated protein and cyclin-dependent kinase inhibitors. *British journal of pharmacology* 135:1733-1742.
- Giardina SF, Cheung NS, Reid MT, Beart PM (1998) Kainate-induced apoptosis in cultured murine cerebellar granule cells elevates expression of the cell cycle gene cyclin D1. *Journal of neurochemistry* 71:1325-1328.
- Gibbs CJ, Jr., Gajdusek DC, Asher DM, Alpers MP, Beck E, Daniel PM, Matthews WB (1968) Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* 161:388-389.
- Goslin K, Banker G (1989) Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *The Journal of cell biology* 108:1507-1516.
- Gotz M, Huttner WB (2005) The cell biology of neurogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology* 6:777-788.
- Gouaux E (2004) Structure and function of AMPA receptors. *The Journal of physiology* 554:249-253.
- Gough KC, Maddison BC (2010) Prion transmission: prion excretion and occurrence in the environment. *Prion* 4:275-282.
- Gould E, Cameron HA, McEwen BS (1994) Blockade of NMDA receptors increases cell death and birth in the developing rat dentate gyrus. *The Journal of comparative neurology* 340:551-565.
- Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Forlenza OV, Cabral AL, Veiga SS, Juliano MA, Roesler R, Walz R, Minetti A, Izquierdo I, Martins VR, Brentani RR (2000a) Cellular prion protein

- binds laminin and mediates neuritogenesis. *Brain research Molecular brain research* 76:85-92.
- Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Martins VR, Jay DG, Brentani RR (2000b) Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. *FEBS letters* 482:257-260.
- Grassmann A, Wolf H, Hofmann J, Graham J, Vorberg I (2013) Cellular aspects of prion replication in vitro. *Viruses* 5:374-405.
- Gray F, Chretien F, Adle-Biassette H, Dorandeu A, Ereau T, Delisle MB, Kopp N, Ironside JW, Vital C (1999) Neuronal apoptosis in Creutzfeldt-Jakob disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 58:321-328.
- Gritti A, Frolichsthal-Schoeller P, Galli R, Parati EA, Cova L, Pagano SF, Bjornson CR, Vescovi AL (1999) Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:3287-3297.
- Hadlow WJ (1959) Scrapie and kuru. *Lancet* II:289-290.
- Hadlow WJ (2008) Kuru likened to scrapie: the story remembered. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 363:3644.
- Halliwel B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of neurochemistry* 97:1634-1658.
- Haraguchi T, Fisher S, Olofsson S, Endo T, Groth D, Tarentino A, Borchelt DR, Teplow D, Hood L, Burlingame A, et al. (1989) Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Archives of biochemistry and biophysics* 274:1-13.
- Harmey JH, Doyle D, Brown V, Rogers MS (1995) The cellular isoform of the prion protein, PrP<sup>c</sup>, is associated with caveolae in mouse neuroblastoma (N2a) cells. *Biochemical and biophysical research communications* 210:753-759.
- Harris DA (2003) Trafficking, turnover and membrane topology of PrP. *British medical bulletin* 66:71-85.
- Harrison CF, Lawson VA, Coleman BM, Kim YS, Masters CL, Cappai R, Barnham KJ, Hill AF (2010) Conservation of a glycine-rich region in the prion protein is required for uptake of prion infectivity. *The Journal of biological chemistry* 285:20213-20223.
- Haybaeck J, Heikenwalder M, Klevenz B, Schwarz P, Margalith I, Bridel C, Mertz K, Zirdum E, Petsch B, Fuchs TJ, Stitz L, Aguzzi A (2011) Aerosols transmit prions to immunocompetent and immunodeficient mice. *PLoS pathogens* 7:e1001257.
- Hegde RS, Mastrianni JA, Scott MR, DeFea KA, Tremblay P, Torchia M, DeArmond SJ, Prusiner SB, Lingappa VR (1998a) A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* 279:827-834.
- Hegde RS, Voigt S, Lingappa VR (1998b) Regulation of protein topology by trans-acting factors at the endoplasmic reticulum. *Molecular cell* 2:85-91.
- Herms J, Tings T, Gall S, Madlung A, Giese A, Siebert H, Schurmann P, Windl O, Brose N, Kretschmar H (1999) Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:8866-8875.
- Herms JW, Korte S, Gall S, Schneider I, Dunker S, Kretschmar HA (2000) Altered intracellular calcium homeostasis in cerebellar granule cells of prion protein-deficient mice. *Journal of neurochemistry* 75:1487-1492.
- Herms JW, Kretschmar HA, Titz S, Keller BU (1995) Patch-clamp analysis of synaptic transmission to cerebellar purkinje cells of prion protein knockout mice. *The European journal of neuroscience* 7:2508-2512.
- Herms JW, Tings T, Dunker S, Kretschmar HA (2001) Prion protein affects Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> currents in cerebellar purkinje cells. *Neurobiology of disease* 8:324-330.

- Herrup K, Busser JC (1995) The induction of multiple cell cycle events precedes target-related neuronal death. *Development* 121:2385-2395.
- Hers I, Vincent EE, Tavare JM (2011) Akt signalling in health and disease. *Cellular signalling* 23:1515-1527.
- Hetz C, Maundrell K, Soto C (2003) Is loss of function of the prion protein the cause of prion disorders? *Trends in molecular medicine* 9:237-243.
- Hikiji M, Tomita H, Ono M, Fujiwara Y, Akiyama K (1993) Increase of kainate receptor mRNA in the hippocampal CA3 of amygdala-kindled rats detected by in situ hybridization. *Life sciences* 53:857-864.
- Hitt AL, Luna EJ (1994) Membrane interactions with the actin cytoskeleton. *Current opinion in cell biology* 6:120-130.
- Hu SQ, Zhu J, Pei DS, Zong YY, Yan JZ, Hou XY, Zhang GY (2009) Overexpression of the PDZ1 domain of PSD-95 diminishes ischemic brain injury via inhibition of the GluR6.PSD-95.MLK3 pathway. *Journal of neuroscience research* 87:3626-3638.
- Hu WW, Du Y, Li C, Song YJ, Zhang GY (2008) Neuroprotection of hypothermia against neuronal death in rat hippocampus through inhibiting the increased assembly of GluR6-PSD95-MLK3 signaling module induced by cerebral ischemia/reperfusion. *Hippocampus* 18:386-397.
- Huang Z, Gabriel JM, Baldwin MA, Fletterick RJ, Prusiner SB, Cohen FE (1994) Proposed three-dimensional structure for the cellular prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:7139-7143.
- Huang Z, Prusiner SB, Cohen FE (1995) Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment. *Folding & design* 1:13-19.
- Huber R, Deboer T, Tobler I (1999) Prion protein: a role in sleep regulation? *Journal of sleep research* 8 Suppl 1:30-36.
- Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Blattler T, Aguzzi A, Freyssinet JM (2004) Modulation of signal transduction through the cellular prion protein is linked to its incorporation in lipid rafts. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 61:2998-3007.
- Humtsoe JO, Kramer RH (2010) Differential epidermal growth factor receptor signaling regulates anchorage-independent growth by modulation of the PI3K/AKT pathway. *Oncogene* 29:1214-1226.
- Hutter G, Heppner FL, Aguzzi A (2003) No superoxide dismutase activity of cellular prion protein in vivo. *Biological chemistry* 384:1279-1285.
- Iihara K, Joo DT, Henderson J, Sattler R, Taverna FA, Lourensen S, Orser BA, Roder JC, Tymianski M (2001) The influence of glutamate receptor 2 expression on excitotoxicity in Glur2 null mutant mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:2224-2239.
- Imran M, Mahmood S (2011a) An overview of animal prion diseases. *Virology journal* 8:493.
- Imran M, Mahmood S (2011b) An overview of human prion diseases. *Virology journal* 8:559.
- Irving EA, Bamford M (2002) Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 22:631-647.
- Iwamaru Y, Takenouchi T, Imamura M, Shimizu Y, Miyazawa K, Mohri S, Yokoyama T, Kitani H (2013) Prion replication elicits cytopathic changes in differentiated neurosphere cultures. *Journal of virology* 87:8745-8755.
- Johnson JW, Ascher P (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325:529-531.
- Jonas P, Burnashev N (1995) Molecular mechanisms controlling calcium entry through AMPA-type glutamate receptor channels. *Neuron* 15:987-990.

- Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW (2003) Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Experimental cell research* 284:31-53.
- Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Baeuerle PA (1995) Stimulation of ionotropic glutamate receptors activates transcription factor NF-kappa B in primary neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:9618-9622.
- Kanaani J, Prusiner SB, Diacovo J, Baekkeskov S, Legname G (2005) Recombinant prion protein induces rapid polarization and development of synapses in embryonic rat hippocampal neurons in vitro. *Journal of neurochemistry* 95:1373-1386.
- Kandel ER (2000) *Principles of Neuroscience* 4th ed. McGraw-Hill New York.
- Kater SB, Rehder V (1995) The sensory-motor role of growth cone filopodia. *Current opinion in neurobiology* 5:68-74.
- Kawasaki H, Morooka T, Shimohama S, Kimura J, Hirano T, Gotoh Y, Nishida E (1997) Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *The Journal of biological chemistry* 272:18518-18521.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997) Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:10409-10414.
- Kerkhoff E, Rapp UR (1998) Cell cycle targets of Ras/Raf signalling. *Oncogene* 17:1457-1462.
- Keshet GI, Bar-Peled O, Yaffe D, Nudel U, Gabizon R (2000) The cellular prion protein colocalizes with the dystroglycan complex in the brain. *Journal of neurochemistry* 75:1889-1897.
- Keshet Y, Seger R (2010) The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol* 661:3-38.
- Khosravani H, Zhang Y, Tsutsui S, Hameed S, Altier C, Hamid J, Chen L, Villemare M, Ali Z, Jirik FR, Zamponi GW (2008) Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. *The Journal of general physiology* 131:i5.
- Kiachopoulos S, Bracher A, Winklhofer KF, Tatzelt J (2005) Pathogenic mutations located in the hydrophobic core of the prion protein interfere with folding and attachment of the glycosylphosphatidylinositol anchor. *The Journal of biological chemistry* 280:9320-9329.
- Kim BH, Kim JI, Choi EK, Carp RI, Kim YS (2005) A neuronal cell line that does not express either prion or doppel proteins. *Neuroreport* 16:425-429.
- Kim BH, Lee HG, Choi JK, Kim JI, Choi EK, Carp RI, Kim YS (2004) The cellular prion protein (PrPC) prevents apoptotic neuronal cell death and mitochondrial dysfunction induced by serum deprivation. *Brain research Molecular brain research* 124:40-50.
- Kim E, Sheng M (2009) The postsynaptic density. *Current biology : CB* 19:R723-724.
- King KL, Cidlowski JA (1995) Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death. *Journal of cellular biochemistry* 58:175-180.
- Kitamoto T, Muramoto T, Mohri S, Doh-Ura K, Tateishi J (1991) Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *Journal of virology* 65:6292-6295.
- Klamt F, Dal-Pizzol F, Conte da Frola ML, Jr., Walz R, Andrades ME, da Silva EG, Brentani RR, Izquierdo I, Fonseca Moreira JC (2001) Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. *Free radical biology & medicine* 30:1137-1144.
- Klatzo I, Gajdusek DC, Zigas V (1959) Pathology of Kuru. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 8:799-847.
- Kohn KW (1999) Molecular interaction map of the mammalian cell cycle control and DNA repair systems. *Molecular biology of the cell* 10:2703-2734.

- Kovacs GG, Budka H (2008) Prion diseases: from protein to cell pathology. *The American journal of pathology* 172:555-565.
- Kovacs GG, Budka H (2009) Molecular pathology of human prion diseases. *International journal of molecular sciences* 10:976-999.
- Kurschner C, Morgan JI (1995) The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. *Brain research Molecular brain research* 30:165-168.
- Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T, Haraguchi K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Saeki K, Yokoyama T, Itohara S, Onodera T (1999) Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* 400:225-226.
- Lafon-Cazal M, Pietri S, Culcasi M, Bockaert J (1993) NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 364:535-537.
- Lasmezas CI (2003) Putative functions of PrP(C). *British medical bulletin* 66:61-70.
- Lauren J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW, Strittmatter SM (2009) Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* 457:1128-1132.
- Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Muller R, Pouyssegur J (1996) Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *The Journal of biological chemistry* 271:20608-20616.
- Lawson VA, Collins SJ, Masters CL, Hill AF (2005) Prion protein glycosylation. *Journal of neurochemistry* 93:793-801.
- Lax I, Bellot F, Howk R, Ullrich A, Givol D, Schlessinger J (1989) Functional analysis of the ligand binding site of EGF-receptor utilizing chimeric chicken/human receptor molecules. *The EMBO journal* 8:421-427.
- Lazarini F, Deslys JP, Dormont D (1991) Regulation of the glial fibrillary acidic protein, beta actin and prion protein mRNAs during brain development in mouse. *Brain research Molecular brain research* 10:343-346.
- Lee KS, Linden R, Prado MA, Brentani RR, Martins VR (2003) Towards cellular receptors for prions. *Reviews in medical virology* 13:399-408.
- Lee SH, Dominguez R (2010) Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. *Molecules and cells*.
- Lee YJ, Baskakov IV (2010) Treatment with normal prion protein delays differentiation and helps to maintain high proliferation activity in human embryonic stem cells. *Journal of neurochemistry* 114:362-373.
- Lehmann S, Harris DA (1997) Blockade of glycosylation promotes acquisition of scrapie-like properties by the prion protein in cultured cells. *The Journal of biological chemistry* 272:21479-21487.
- Lerma J (2003) Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nature reviews Neuroscience* 4:481-495.
- Lester RA, Clements JD, Westbrook GL, Jahr CE (1990) Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. *Nature* 346:565-567.
- Lewis V, Hooper NM (2011) The role of lipid rafts in prion protein biology. *Front Biosci (Landmark Ed)* 16:151-168.
- Li A, Christensen HM, Stewart LR, Roth KA, Chiesa R, Harris DA (2007a) Neonatal lethality in transgenic mice expressing prion protein with a deletion of residues 105-125. *The EMBO journal* 26:548-558.
- Li A, Piccardo P, Barmada SJ, Ghetti B, Harris DA (2007b) Prion protein with an octapeptide insertion has impaired neuroprotective activity in transgenic mice. *The EMBO journal* 26:2777-2785.

- Li C, Xu B, Wang WW, Yu XJ, Zhu J, Yu HM, Han D, Pei DS, Zhang GY (2010) Coactivation of GABA receptors inhibits the JNK3 apoptotic pathway via disassembly of GluR6-PSD-95-MLK3 signaling module in KA-induced seizure. *Epilepsia* 51:391-403.
- Li C, Yu S, Nakamura F, Yin S, Xu J, Petrolla AA, Singh N, Tartakoff A, Abbott DW, Xin W, Sy MS (2009) Binding of pro-prion to filamin A disrupts cytoskeleton and correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. *The Journal of clinical investigation* 119:2725-2736.
- Li J, Meyer AN, Donoghue DJ (1997) Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:502-507.
- Li S, Wilkinson M, Xia X, David M, Xu L, Purkel-Sutton A, Bhardwaj A (2005) Induction of IFN-regulated factors and antitumoral surveillance by transfected placebo plasmid DNA. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 11:112-119.
- Liang J, Pan Y, Zhang D, Guo C, Shi Y, Wang J, Chen Y, Wang X, Liu J, Guo X, Chen Z, Qiao T, Fan D (2007) Cellular prion protein promotes proliferation and G1/S transition of human gastric cancer cells SGC7901 and AGS. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21:2247-2256.
- Liang J, Pan YL, Ning XX, Sun LJ, Lan M, Hong L, Du JP, Liu N, Liu CJ, Qiao TD, Fan DM (2006) Overexpression of PrPC and its antiapoptosis function in gastric cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 27:84-91.
- Liberski PP (2012) Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *Advances in experimental medicine and biology* 724:128-137.
- Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR (2008) Physiology of the prion protein. *Physiological reviews* 88:673-728.
- Lintunen M, Sallmen T, Karlstedt K, Panula P (2005) Transient changes in the limbic histaminergic system after systemic kainic acid-induced seizures. *Neurobiology of disease* 20:155-169.
- Locht C, Chesebro B, Race R, Keith JM (1986) Molecular cloning and complete sequence of prion protein cDNA from mouse brain infected with the scrapie agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83:6372-6376.
- Lopes MH, Hajj GN, Muras AG, Mancini GL, Castro RM, Ribeiro KC, Brentani RR, Linden R, Martins VR (2005) Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neurogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:11330-11339.
- Loubet D, Dakowski C, Pietri M, Pradines E, Bernard S, Callebert J, Ardila-Osorio H, Mouillet-Richard S, Launay JM, Kellermann O, Schneider B (2012) Neurogenesis: the prion protein controls beta1 integrin signaling activity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26:678-690.
- Lowden MR, Scott K, Kothari MJ (2008) Familial Creutzfeldt-Jakob disease presenting as epilepsy partialis continua. *Epileptic disorders : international epilepsy journal with videotape* 10:271-275.
- Luo L (2000) Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nature reviews Neuroscience* 1:173-180.
- Lysek DA, Wuthrich K (2004) Prion protein interaction with the C-terminal SH3 domain of Grb2 studied using NMR and optical spectroscopy. *Biochemistry* 43:10393-10399.
- Lledo PM, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB, Nicoll RA (1996) Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:2403-2407.

- Llorens F, Carulla P, Villa A, Torres JM, Fortes P, Ferrer I, Del Rio JA (2013a) PrP regulates epidermal growth factor receptor function and cell shape dynamics in Neuro2a cells. *Journal of neurochemistry*.
- Llorens F, Del Rio JA (2012) Unraveling the neuroprotective mechanisms of PrP (C) in excitotoxicity. *Prion* 6:245-251.
- Llorens F, Ferrer I, Del Rio JA (2013b) Gene Expression Resulting from PrP Ablation and PrP Overexpression in Murine and Cellular Models. *Molecular neurobiology*.
- Ma J, Wollmann R, Lindquist S (2002) Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science* 298:1781-1785.
- Mabbott NA, Brown KL, Bruce ME (1997) T lymphocyte activation and the cellular form of the prion protein, PrP<sup>C</sup>. *Biochemical Society transactions* 25:307S.
- Mabbott NA, MacPherson GG (2006) Prions and their lethal journey to the brain. *Nature reviews Microbiology* 4:201-211.
- Macdonald RL, Gallagher MJ, Feng HJ, Kang J (2004) GABA(A) receptor epilepsy mutations. *Biochemical pharmacology* 68:1497-1506.
- Madden DR (2002) The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nature reviews Neuroscience* 3:91-101.
- Maglio LE, Martins VR, Izquierdo I, Ramirez OA (2006) Role of cellular prion protein on LTP expression in aged mice. *Brain research* 1097:11-18.
- Maglio LE, Perez MF, Martins VR, Brentani RR, Ramirez OA (2004) Hippocampal synaptic plasticity in mice devoid of cellular prion protein. *Brain research Molecular brain research* 131:58-64.
- Magloczky Z (2010) Sprouting in human temporal lobe epilepsy: excitatory pathways and axons of interneurons. *Epilepsy research* 89:52-59.
- Maiti NR, Surewicz WK (2001) The role of disulfide bridge in the folding and stability of the recombinant human prion protein. *The Journal of biological chemistry* 276:2427-2431.
- Malaga-Trillo E, Solis GP, Schrock Y, Geiss C, Luncz L, Thomanetz V, Stuermer CA (2009) Regulation of embryonic cell adhesion by the prion protein. *PLoS biology* 7:e55.
- Malumbres M, Barbacid M (2005) Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in biochemical sciences* 30:630-641.
- Malumbres M, Barbacid M (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews Cancer* 9:153-166.
- Mallucci G, Collinge J (2005) Rational targeting for prion therapeutics. *Nature reviews Neuroscience* 6:23-34.
- Mallucci GR, Ratte S, Asante EA, Linehan J, Gowland I, Jefferys JG, Collinge J (2002) Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *The EMBO journal* 21:202-210.
- Manson J, West JD, Thomson V, McBride P, Kaufman MH, Hope J (1992) The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development* 115:117-122.
- Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J (1994) 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Molecular neurobiology* 8:121-127.
- Manson JC, Hope J, Clarke AR, Johnston A, Black C, MacLeod N (1995) PrP gene dosage and long term potentiation. *Neurodegeneration : a journal for neurodegenerative disorders, neuroprotection, and neuroregeneration* 4:113-114.
- Mao L, Tang Q, Samdani S, Liu Z, Wang JQ (2004) Regulation of MAPK/ERK phosphorylation via ionotropic glutamate receptors in cultured rat striatal neurons. *The European journal of neuroscience* 19:1207-1216.

- Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C (1998) Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain research bulletin* 46:281-309.
- Martin LJ, Blackstone CD, Levey AI, Huganir RL, Price DL (1993) AMPA glutamate receptor subunits are differentially distributed in rat brain. *Neuroscience* 53:327-358.
- Mastrianni JA (2010) The genetics of prion diseases. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 12:187-195.
- Mattila PK, Lappalainen P (2008) Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nature reviews Molecular cell biology* 9:446-454.
- McBride PA, Schulz-Schaeffer WJ, Donaldson M, Bruce M, Diring H, Kretzschmar HA, Beekes M (2001) Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. *Journal of virology* 75:9320-9327.
- McEntee WJ, Crook TH (1993) Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology* 111:391-401.
- McKinley MP, Hay B, Lingappa VR, Lieberburg I, Prusiner SB (1987) Developmental expression of prion protein gene in brain. *Developmental biology* 121:105-110.
- Mebratu Y, Tesfaigzi Y (2009) How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle* 8:1168-1175.
- Mehrpour M, Codogno P (2010) Prion protein: From physiology to cancer biology. *Cancer letters* 290:1-23.
- Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R, Sharma PL (2013) Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *European journal of pharmacology* 698:6-18.
- Meldrum BS (2000) Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *The Journal of nutrition* 130:1007S-1015S.
- Meloche S (1995) Cell cycle reentry of mammalian fibroblasts is accompanied by the sustained activation of p44mapk and p42mapk isoforms in the G1 phase and their inactivation at the G1/S transition. *Journal of cellular physiology* 163:577-588.
- Meloche S, Pouyssegur J (2007) The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 26:3227-3239.
- Meloche S, Seuwen K, Pages G, Pouyssegur J (1992) Biphasic and synergistic activation of p44mapk (ERK1) by growth factors: correlation between late phase activation and mitogenicity. *Mol Endocrinol* 6:845-854.
- Menna E, Fossati G, Scita G, Matteoli M (2011) From filopodia to synapses: the role of actin-capping and anti-capping proteins. *The European journal of neuroscience* 34:1655-1662.
- Meyer-Luehmann M, Coomaraswamy J, Bolmont T, Kaeser S, Schaefer C, Kilger E, Neuenschwander A, Abramowski D, Frey P, Jaton AL, Vigouret JM, Paganetti P, Walsh DM, Mathews PM, Ghiso J, Staufenbiel M, Walker LC, Jucker M (2006) Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science* 313:1781-1784.
- Meyer RK, McKinley MP, Bowman KA, Braunfeld MB, Barry RA, Prusiner SB (1986) Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83:2310-2314.
- Miele G, Alejo Blanco AR, Baybutt H, Horvat S, Manson J, Clinton M (2003) Embryonic activation and developmental expression of the murine prion protein gene. *Gene expression* 11:1-12.

- Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, Phung Y, Pedersen RA, Werb Z, Derynck R (1995) Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* 376:337-341.
- Miki H, Miura K, Takenawa T (1996) N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *The EMBO journal* 15:5326-5335.
- Miki H, Sasaki T, Takai Y, Takenawa T (1998) Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature* 391:93-96.
- Mikuni N, Babb TL, Wylie C, Ying Z (2000) NMDAR1 receptor proteins and mossy fibers in the fascia dentata during rat kainate hippocampal epileptogenesis. *Experimental neurology* 163:271-277.
- Monnet C, Gavard J, Mege RM, Sobel A (2004) Clustering of cellular prion protein induces ERK1/2 and stathmin phosphorylation in GT1-7 neuronal cells. *FEBS letters* 576:114-118.
- Montagna P, Gambetti P, Cortelli P, Lugaresi E (2003) Familial and sporadic fatal insomnia. *Lancet neurology* 2:167-176.
- Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256:1217-1221.
- Moore RC, Lee IY, Silverman GL, Harrison PM, Strome R, Heinrich C, Karunaratne A, Pasternak SH, Chishti MA, Liang Y, Mastrangelo P, Wang K, Smit AF, Katamine S, Carlson GA, Cohen FE, Prusiner SB, Melton DW, Tremblay P, Hood LE, Westaway D (1999) Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *Journal of molecular biology* 292:797-817.
- Morel E, Fouquet S, Strup-Perrot C, Pichol Thievend C, Petit C, Loew D, Faussat AM, Yvernault L, Pincon-Raymond M, Chambaz J, Rousset M, Thenet S, Clair C (2008) The cellular prion protein PrP(c) is involved in the proliferation of epithelial cells and in the distribution of junction-associated proteins. *PloS one* 3:e3000.
- Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, Laplanche JL, Lehmann S, Launay JM, Kellermann O (2000) Signal transduction through prion protein. *Science* 289:1925-1928.
- Moya KL, Sales N, Hassig R, Creminon C, Grassi J, Di Giamberardino L (2000) Immunolocalization of the cellular prion protein in normal brain. *Microscopy research and technique* 50:58-65.
- Mulle C, Sailer A, Perez-Otano I, Dickinson-Anson H, Castillo PE, Bureau I, Maron C, Gage FH, Mann JR, Bettler B, Heinemann SF (1998) Altered synaptic physiology and reduced susceptibility to kainate-induced seizures in GluR6-deficient mice. *Nature* 392:601-605.
- Munderloh C, Solis GP, Bodrikov V, Jaeger FA, Wiechers M, Malaga-Trillo E, Stuermer CA (2009) Reggies/flotillins regulate retinal axon regeneration in the zebrafish optic nerve and differentiation of hippocampal and N2a neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:6607-6615.
- Muramoto T, DeArmond SJ, Scott M, Telling GC, Cohen FE, Prusiner SB (1997) Heritable disorder resembling neuronal storage disease in mice expressing prion protein with deletion of an alpha-helix. *Nature medicine* 3:750-755.
- Nakanishi S (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258:597-603.
- Niciu MJ, Kelmendi B, Sanacora G (2012) Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 100:656-664.
- Nicholls DG (2004) Mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity studied in primary neuronal cultures. *Current molecular medicine* 4:149-177.

- Nieznanski K, Nieznanska H, Skowronek KJ, Osiecka KM, Stepkowski D (2005) Direct interaction between prion protein and tubulin. *Biochemical and biophysical research communications* 334:403-411.
- Nieznanski K, Podlubnaya ZA, Nieznanska H (2006) Prion protein inhibits microtubule assembly by inducing tubulin oligomerization. *Biochemical and biophysical research communications* 349:391-399.
- Norrby E (2011) Prions and protein-folding diseases. *Journal of internal medicine* 270:1-14.
- Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307:462-465.
- Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, et al. (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40:735-746.
- Ohnuma S, Harris WA (2003) Neurogenesis and the cell cycle. *Neuron* 40:199-208.
- Olney JW (1969) Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164:719-721.
- Ono T, Galanopoulou AS (2012) Epilepsy and epileptic syndrome. *Advances in experimental medicine and biology* 724:99-113.
- Owen F, Poulter M, Collinge J, Crow TJ (1990) Codon 129 changes in the prion protein gene in Caucasians. *American journal of human genetics* 46:1215-1216.
- Palop JJ, Chin J, Mucke L (2006) A network dysfunction perspective on neurodegenerative diseases. *Nature* 443:768-773.
- Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, et al. (1993) Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:10962-10966.
- Pan Y, Zhao L, Liang J, Liu J, Shi Y, Liu N, Zhang G, Jin H, Gao J, Xie H, Wang J, Liu Z, Fan D (2006) Cellular prion protein promotes invasion and metastasis of gastric cancer. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20:1886-1888.
- Pantera B, Bini C, Cirri P, Paoli P, Camici G, Manao G, Caselli A (2009) PrP<sup>C</sup> activation induces neurite outgrowth and differentiation in PC12 cells: role for caveolin-1 in the signal transduction pathway. *Journal of neurochemistry* 110:194-207.
- Pardee AB (1989) G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246:603-608.
- Parkin ET, Watt NT, Hussain I, Eckman EA, Eckman CB, Manson JC, Baybutt HN, Turner AJ, Hooper NM (2007) Cellular prion protein regulates beta-secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:11062-11067.
- Pastor J, Uzategui YG, Gal-Iglesias B, Ortega GJ, Sola RG, Menendez de la Prida L (2006) [The pathophysiological foundations of temporal-lobe epilepsy: studies in humans and animals]. *Revista de neurologia* 42:663-673.
- Pauly PC, Harris DA (1998) Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *The Journal of biological chemistry* 273:33107-33110.
- Pawson T, Scott JD (1997) Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 278:2075-2080.
- Pei DS, Guan QH, Sun YF, Zhang QX, Xu TL, Zhang GY (2005) Neuroprotective effects of GluR6 antisense oligodeoxynucleotides on transient brain ischemia/reperfusion-induced neuronal death in rat hippocampal CA1 region. *Journal of neuroscience research* 82:642-649.

- Pei DS, Wang XT, Liu Y, Sun YF, Guan QH, Wang W, Yan JZ, Zong YY, Xu TL, Zhang GY (2006) Neuroprotection against ischaemic brain injury by a GluR6-9c peptide containing the TAT protein transduction sequence. *Brain : a journal of neurology* 129:465-479.
- Pellegrin S, Mellor H (2005) The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2. *Current biology : CB* 15:129-133.
- Pene F, Claessens YE, Muller O, Viguie F, Mayeux P, Dreyfus F, Lacombe C, Bouscary D (2002) Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma. *Oncogene* 21:6587-6597.
- Pernot F, Heinrich C, Barbier L, Peinnequin A, Carpentier P, Dhote F, Baille V, Beaup C, Depaulis A, Dorandeu F (2011) Inflammatory changes during epileptogenesis and spontaneous seizures in a mouse model of mesiotemporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 52:2315-2325.
- Peters PJ, Mironov A, Jr., Peretz D, van Donselaar E, Leclerc E, Erpel S, DeArmond SJ, Burton DR, Williamson RA, Vey M, Prusiner SB (2003) Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *The Journal of cell biology* 162:703-717.
- Petrakis S, Sklaviadis T (2006) Identification of proteins with high affinity for refolded and native PrPC. *Proteomics* 6:6476-6484.
- Pin JP, Duvoisin R (1995) The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34:1-26.
- Pines G, Kostler WJ, Yarden Y (2010) Oncogenic mutant forms of EGFR: lessons in signal transduction and targets for cancer therapy. *FEBS letters* 584:2699-2706.
- Pines J (1993) Cyclins and their associated cyclin-dependent kinases in the human cell cycle. *Biochemical Society transactions* 21:921-925.
- Pitt D, Werner P, Raine CS (2000) Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nature medicine* 6:67-70.
- Platt SR (2007) The role of glutamate in central nervous system health and disease--a review. *Vet J* 173:278-286.
- Polymenidou M, Moos R, Scott M, Sigurdson C, Shi YZ, Yajima B, Hafner-Bratkovic I, Jerala R, Hornemann S, Wuthrich K, Bellon A, Vey M, Garen G, James MN, Kav N, Aguzzi A (2008) The POM monoclonals: a comprehensive set of antibodies to non-overlapping prion protein epitopes. *PLoS one* 3:e3872.
- Popovici T, Represa A, Crepel V, Barbin G, Beaudoin M, Ben-Ari Y (1990) Effects of kainic acid-induced seizures and ischemia on c-fos-like proteins in rat brain. *Brain research* 536:183-194.
- Powell AD, Toescu EC, Collinge J, Jefferys JG (2008) Alterations in Ca<sup>2+</sup>-buffering in prion-null mice: association with reduced afterhyperpolarizations in CA1 hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:3877-3886.
- Prado MA, Alves-Silva J, Magalhaes AC, Prado VF, Linden R, Martins VR, Brentani RR (2004) PrPc on the road: trafficking of the cellular prion protein. *Journal of neurochemistry* 88:769-781.
- Prestori F, Rossi P, Bearzatto B, Laine J, Necchi D, Diwakar S, Schiffmann SN, Axelrad H, D'Angelo E (2008) Altered neuron excitability and synaptic plasticity in the cerebellar granular layer of juvenile prion protein knock-out mice with impaired motor control. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:7091-7103.
- Prusiner SB (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216:136-144.
- Prusiner SB (1991) Molecular biology of prion diseases. *Science* 252:1515-1522.

- Prusiner SB (1998) Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:13363-13383.
- Rajendran L, Udayar V, Goodger ZV (2012) Lipid-anchored drugs for delivery into subcellular compartments. *Trends in pharmacological sciences* 33:215-222.
- Rangel A, Burgaya F, Gavin R, Soriano E, Aguzzi A, Del Rio JA (2007) Enhanced susceptibility of Prnp-deficient mice to kainate-induced seizures, neuronal apoptosis, and death: Role of AMPA/kainate receptors. *Journal of neuroscience research* 85:2741-2755.
- Rangel A, Madronal N, Gruart A, Gavin R, Llorens F, Sumoy L, Torres JM, Delgado-Garcia JM, Del Rio JA (2009) Regulation of GABA(A) and glutamate receptor expression, synaptic facilitation and long-term potentiation in the hippocampus of prion mutant mice. *PLoS one* 4:e7592.
- Ratte S, Vreugdenhil M, Boulton JK, Patel A, Asante EA, Collinge J, Jefferys JG (2011) Threshold for epileptiform activity is elevated in prion knockout mice. *Neuroscience* 179:56-61.
- Ridley AJ (2006) Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends in cell biology* 16:522-529.
- Ringerike T, Blystad FD, Levy FO, Madhus IH, Stang E (2002) Cholesterol is important in control of EGF receptor kinase activity but EGF receptors are not concentrated in caveolae. *Journal of cell science* 115:1331-1340.
- Roberts PJ, Der CJ (2007) Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26:3291-3310.
- Roche S, Koegl M, Courtneidge SA (1994) The phosphatidylinositol 3-kinase alpha is required for DNA synthesis induced by some, but not all, growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:9185-9189.
- Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T, Takenawa T, Kirschner MW (1999) The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* 97:221-231.
- Roovers K, Assoian RK (2000) Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 22:818-826.
- Rosenmund C, Stern-Bach Y, Stevens CF (1998) The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science* 280:1596-1599.
- Roskoski R, Jr. (2012) ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 66:105-143.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675-686.
- Roucoux X, Guo Q, Zhang Y, Goodyer CG, LeBlanc AC (2003) Cytosolic prion protein is not toxic and protects against Bax-mediated cell death in human primary neurons. *The Journal of biological chemistry* 278:40877-40881.
- Rutecki PA (1992) Neuronal excitability: voltage-dependent currents and synaptic transmission. *Journal of clinical neurophysiology : official publication of the American Electroencephalographic Society* 9:195-211.
- Rybner C, Finel-Szermanski S, Felin M, Sahraoui T, Rousseau C, Fournier JG, Seve AP, Botti J (2002) The cellular prion protein: a new partner of the lectin CBP70 in the nucleus of NB4 human promyelocytic leukemia cells. *Journal of cellular biochemistry* 84:408-419.
- Sailer A, Bueler H, Fischer M, Aguzzi A, Weissmann C (1994) No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell* 77:967-968.
- Sakaguchi S, Katamine S, Nishida N, Moriuchi R, Shigematsu K, Sugimoto T, Nakatani A, Kataoka Y, Houtani T, Shirabe S, Okada H, Hasegawa S, Miyamoto T, Noda T (1996)

- Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* 380:528-531.
- Sakudo A, Lee DC, Saeki K, Nakamura Y, Inoue K, Matsumoto Y, Itohara S, Onodera T (2003) Impairment of superoxide dismutase activation by N-terminally truncated prion protein (PrP) in PrP-deficient neuronal cell line. *Biochemical and biophysical research communications* 308:660-667.
- Sales N, Hassig R, Rodolfo K, Di Giamberardino L, Traiffort E, Ruat M, Fretier P, Moya KL (2002) Developmental expression of the cellular prion protein in elongating axons. *The European journal of neuroscience* 15:1163-1177.
- Sales N, Rodolfo K, Hassig R, Faucheux B, Di Giamberardino L, Moya KL (1998) Cellular prion protein localization in rodent and primate brain. *The European journal of neuroscience* 10:2464-2471.
- Santuccione A, Sytnyk V, Leshchyn'ska I, Schachner M (2005) Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *The Journal of cell biology* 169:341-354.
- Satheeshkumar KS, Murali J, Jayakumar R (2004) Assemblages of prion fragments: novel model systems for understanding amyloid toxicity. *Journal of structural biology* 148:176-193.
- Satoh J, Kuroda Y, Katamine S (2000) Gene expression profile in prion protein-deficient fibroblasts in culture. *The American journal of pathology* 157:59-68.
- Satoh J, Yamamura T (2004) Gene expression profile following stable expression of the cellular prion protein. *Cellular and molecular neurobiology* 24:793-814.
- Savinainen A, Garcia EP, Dorow D, Marshall J, Liu YF (2001) Kainate receptor activation induces mixed lineage kinase-mediated cellular signaling cascades via post-synaptic density protein 95. *The Journal of biological chemistry* 276:11382-11386.
- Scharfman HE, Sollas AL, Berger RE, Goodman JH (2003) Electrophysiological evidence of monosynaptic excitatory transmission between granule cells after seizure-induced mossy fiber sprouting. *Journal of neurophysiology* 90:2536-2547.
- Schauwecker PE, Steward O (1997) Genetic determinants of susceptibility to excitotoxic cell death: implications for gene targeting approaches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:4103-4108.
- Schmitt-Ulms G, Legname G, Baldwin MA, Ball HL, Bradon N, Bosque PJ, Crossin KL, Edelman GM, DeArmond SJ, Cohen FE, Prusiner SB (2001) Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. *Journal of molecular biology* 314:1209-1225.
- Schrock Y, Solis GP, Stuermer CA (2009) Regulation of focal adhesion formation and filopodia extension by the cellular prion protein (PrPC). *FEBS letters* 583:389-393.
- Schwarzschild MA, Cole RL, Hyman SE (1997) Glutamate, but not dopamine, stimulates stress-activated protein kinase and AP-1-mediated transcription in striatal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:3455-3466.
- Selvaggini C, De Gioia L, Cantu L, Ghibaudi E, Diomede L, Passerini F, Forloni G, Bugiani O, Tagliavini F, Salmona M (1993) Molecular characteristics of a protease-resistant, amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106-126 of the prion protein. *Biochemical and biophysical research communications* 194:1380-1386.
- Sequist LV, Bell DW, Lynch TJ, Haber DA (2007) Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25:587-595.
- Shen L, Ji HF (2011) Conformational conversion and prion disease. *Nature reviews Molecular cell biology* 12:273; author reply 273.
- Sherr CJ (1994) G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79:551-555.

- Shi SH, Jan LY, Jan YN (2003) Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell* 112:63-75.
- Shmerling D, Hegyi I, Fischer M, Blattler T, Brandner S, Gotz J, Rulicke T, Flechsig E, Cozzio A, von Mering C, Hangartner C, Aguzzi A, Weissmann C (1998) Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell* 93:203-214.
- Shyng SL, Heuser JE, Harris DA (1994) A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *The Journal of cell biology* 125:1239-1250.
- Shyng SL, Huber MT, Harris DA (1993) A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *The Journal of biological chemistry* 268:15922-15928.
- Sibilia M, Wagner B, Hoebertz A, Elliott C, Marino S, Jochum W, Wagner EF (2003) Mice humanised for the EGF receptor display hypomorphic phenotypes in skin, bone and heart. *Development* 130:4515-4525.
- Sigurdsson B (1954) Rida, a chronic encephalitis of sheep with general remarks on infections which develop slowly and some of their special characteristics. *Br Vet J* 110:341-354.
- Sikorska B, Knight R, Ironside JW, Liberski PP (2012) Creutzfeldt-Jakob disease. *Advances in experimental medicine and biology* 724:76-90.
- Sim VL, Caughey B (2009) Recent advances in prion chemotherapeutics. *Infectious disorders drug targets* 9:81-91.
- Simonin T, Duga S, Strumbo B, Asselta R, Ceciliani F, Ronchi S (2000) cDNA cloning of turtle prion protein. *FEBS letters* 469:33-38.
- Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nature reviews Molecular cell biology* 1:31-39.
- Singleton MW, Holbert WH, 2nd, Lee AT, Bracey JM, Churn SB (2005) Modulation of CaM kinase II activity is coincident with induction of status epilepticus in the rat pilocarpine model. *Epilepsia* 46:1389-1400.
- Sloviter RS (1992) Possible functional consequences of synaptic reorganization in the dentate gyrus of kainate-treated rats. *Neuroscience letters* 137:91-96.
- Smith PG, Bradley R (2003) Bovine spongiform encephalopathy (BSE) and its epidemiology. *British medical bulletin* 66:185-198.
- Sobue K (1993) Actin-based cytoskeleton in growth cone activity. *Neuroscience research* 18:91-102.
- Solis GP, Malaga-Trillo E, Plattner H, Stuermer CA (2010) Cellular roles of the prion protein in association with reggie/flotillin microdomains. *Front Biosci (Landmark Ed)* 15:1075-1085.
- Solis GP, Schrock Y, Hulsbusch N, Wiechers M, Plattner H, Stuermer CA (2012) Reggies/flotillins regulate E-cadherin-mediated cell contact formation by affecting EGFR trafficking. *Molecular biology of the cell* 23:1812-1825.
- Sorkin A, McClure M, Huang F, Carter R (2000) Interaction of EGF receptor and grb2 in living cells visualized by fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy. *Current biology : CB* 10:1395-1398.
- Spielhauer C, Schatzl HM (2001) PrPC directly interacts with proteins involved in signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* 276:44604-44612.
- Steele AD (2008) All quiet on the neuronal front: NMDA receptor inhibition by prion protein. *The Journal of general physiology* 131:i3.
- Steele AD, Emsley JG, Ozdinler PH, Lindquist S, Macklis JD (2006) Prion protein (PrP<sup>c</sup>) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:3416-3421.

- Steele AD, Lindquist S, Aguzzi A (2007) The prion protein knockout mouse: a phenotype under challenge. *Prion* 1:83-93.
- Steinlein OK (2004) Genetic mechanisms that underlie epilepsy. *Nature reviews Neuroscience* 5:400-408.
- Stella R, Cifani P, Peggion C, Hansson K, Lazzari C, Bendz M, Levander F, Sorgato MC, Bertoli A, James P (2012) Relative quantification of membrane proteins in wild-type and prion protein (PrP)-knockout cerebellar granule neurons. *Journal of proteome research* 11:523-536.
- Stewart RS, Piccardo P, Ghetti B, Harris DA (2005) Neurodegenerative illness in transgenic mice expressing a transmembrane form of the prion protein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:3469-3477.
- Striebel J, Race B, Chesebro B (2013a) Prion protein and susceptibility to kainate-induced seizures: Genetic pitfalls in the use of PrP knockout mice. *Prion* 7.
- Striebel JF, Race B, Pathmajeyan M, Rangel A, Chesebro B (2013b) Lack of influence of prion protein gene expression on kainate-induced seizures in mice: studies using congenic, coisogenic and transgenic strains. *Neuroscience* 238:11-18.
- Strumbo B, Ronchi S, Bolis LC, Simonic T (2001) Molecular cloning of the cDNA coding for *Xenopus laevis* prion protein. *FEBS letters* 508:170-174.
- Stuermer CA (2010) The reggie/flotillin connection to growth. *Trends in cell biology* 20:6-13.
- Sturge J, Hamelin J, Jones GE (2002) N-WASP activation by a beta1-integrin-dependent mechanism supports PI3K-independent chemotaxis stimulated by urokinase-type plasminogen activator. *Journal of cell science* 115:699-711.
- Sunyach C, Jen A, Deng J, Fitzgerald KT, Frobert Y, Grassi J, McCaffrey MW, Morris R (2003) The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *The EMBO journal* 22:3591-3601.
- Suzuki T, Kurokawa T, Hashimoto H, Sugiyama M (2002) cDNA sequence and tissue expression of *Fugu rubripes* prion protein-like: a candidate for the teleost orthologue of tetrapod PrPs. *Biochemical and biophysical research communications* 294:912-917.
- Syed M, Nourizadeh-Lillabadi R, Press CM, Alestrom P (2011) Prion protein function and the disturbance of early embryonic development in zebrafish. *Prion* 5:88-92.
- Tahirovic S, Bradke F (2009) Neuronal polarity. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1:a001644.
- Taylor DR, Hooper NM (2006) The prion protein and lipid rafts. *Molecular membrane biology* 23:89-99.
- Telfeian AE, Federoff HJ, Leone P, During MJ, Williamson A (2000) Overexpression of GluR6 in rat hippocampus produces seizures and spontaneous nonsynaptic bursting in vitro. *Neurobiology of disease* 7:362-374.
- Thais ME, Carqueja CL, Santos TG, Silva RV, Stroeh E, Machado RS, Wahlheim DO, Bianchin MM, Sakamoto AC, Brentani RR, Martins VR, Walz R, Tasca CI (2006) Synaptosomal glutamate release and uptake in mice lacking the cellular prion protein. *Brain research* 1075:13-19.
- Threadgill R, Bobb K, Ghosh A (1997) Regulation of dendritic growth and remodeling by Rho, Rac, and Cdc42. *Neuron* 19:625-634.
- Tian H, Zhang QG, Zhu GX, Pei DS, Guan QH, Zhang GY (2005) Activation of c-Jun NH2-terminal kinase 3 is mediated by the GluR6.PSD-95.MLK3 signaling module following cerebral ischemia in rat hippocampus. *Brain research* 1061:57-66.
- Tobler I, Deboer T, Fischer M (1997) Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:1869-1879.

- Tobler I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rulicke T, Moser M, Oesch B, McBride PA, Manson JC (1996) Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380:639-642.
- Tremblay P, Bouzamondo-Bernstein E, Heinrich C, Prusiner SB, DeArmond SJ (2007) Developmental expression of PrP in the post-implantation embryo. *Brain research* 1139:60-67.
- Tuite MF, Serio TR (2010) The prion hypothesis: from biological anomaly to basic regulatory mechanism. *Nature reviews Molecular cell biology* 11:823-833.
- Turnbaugh JA, Westergard L, Unterberger U, Biasini E, Harris DA (2011) The N-terminal, polybasic region is critical for prion protein neuroprotective activity. *PloS one* 6:e25675.
- Um JW, Kaufman AC, Kostylev M, Heiss JK, Stagi M, Takahashi H, Kerrisk ME, Vortmeyer A, Wisniewski T, Koleske AJ, Gunther EC, Nygaard HB, Strittmatter SM (2013) Metabotropic glutamate receptor 5 is a coreceptor for Alzheimer abeta oligomer bound to cellular prion protein. *Neuron* 79:887-902.
- van Rheede T, Smolenaars MM, Madsen O, de Jong WW (2003) Molecular evolution of the mammalian prion protein. *Molecular biology and evolution* 20:111-121.
- Vassallo N, Herms J (2003) Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. *Journal of neurochemistry* 86:538-544.
- Vassallo N, Herms J, Behrens C, Krebs B, Saeki K, Onodera T, Windl O, Kretschmar HA (2005) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by cellular prion protein and its role in cell survival. *Biochemical and biophysical research communications* 332:75-82.
- Vignes M, Collingridge GL (1997) The synaptic activation of kainate receptors. *Nature* 388:179-182.
- Vilches S, Vergara C, Nicolas O, Sanclimens G, Merino S, Varon S, Acosta GA, Albericio F, Royo M, Del Rio JA, Gavin R (2013) Neurotoxicity of prion peptides mimicking the central domain of the cellular prion protein. *PloS one* 8:e70881.
- Vincent I, Jicha G, Rosado M, Dickson DW (1997) Aberrant expression of mitotic cdc2/cyclin B1 kinase in degenerating neurons of Alzheimer's disease brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:3588-3598.
- Waetzig V, Czeloth K, Hidding U, Mielke K, Kanzow M, Brecht S, Goetz M, Lucius R, Herdegen T, Hanisch UK (2005) c-Jun N-terminal kinases (JNKs) mediate pro-inflammatory actions of microglia. *Glia* 50:235-246.
- Waggoner DJ, Drisaldi B, Bartnikas TB, Casareno RL, Prohaska JR, Gitlin JD, Harris DA (2000) Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level. *The Journal of biological chemistry* 275:7455-7458.
- Walz R, Amaral OB, Rockenbach IC, Roesler R, Izquierdo I, Cavalheiro EA, Martins VR, Brentani RR (1999) Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. *Epilepsia* 40:1679-1682.
- Walz R, Castro RM, Velasco TR, Carlotti CG, Jr., Sakamoto AC, Brentani RR, Martins VR (2002) Cellular prion protein: implications in seizures and epilepsy. *Cellular and molecular neurobiology* 22:249-257.
- Wang W, Bu B, Xie M, Zhang M, Yu Z, Tao D (2009a) Neural cell cycle dysregulation and central nervous system diseases. *Progress in neurobiology* 89:1-17.
- Wang X, Dong CF, Shi Q, Shi S, Wang GR, Lei YJ, Xu K, An R, Chen JM, Jiang HY, Tian C, Gao C, Zhao YJ, Han J, Dong XP (2009b) Cytosolic prion protein induces apoptosis in human neuronal cell SH-SY5Y via mitochondrial disruption pathway. *BMB reports* 42:444-449.
- Wang Y, Qin ZH (2010) Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 15:1382-1402.
- Wasterlain CG, Mazarati AM, Naylor D, Niquet J, Liu H, Suchomelova L, Baldwin R, Katsumori H, Shirasaka Y, Shin D, Sankar R (2002) Short-term plasticity of hippocampal

- neuropeptides and neuronal circuitry in experimental status epilepticus. *Epilepsia* 43 Suppl 5:20-29.
- Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K, Mishina M (1992) Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport* 3:1138-1140.
- Watanabe T, Yasutaka Y, Nishioku T, Nakashima A, Futagami K, Yamauchi A, Kataoka Y (2012) Atorvastatin stimulates neuroblastoma cells to induce neurite outgrowth by increasing cellular prion protein expression. *Neuroscience letters* 531:114-119.
- Watt NT, Taylor DR, Kerrigan TL, Griffiths HH, Rushworth JV, Whitehouse IJ, Hooper NM (2012) Prion protein facilitates uptake of zinc into neuronal cells. *Nature communications* 3:1134.
- Watts JC, Huo H, Bai Y, Ehsani S, Jeon AH, Shi T, Daude N, Lau A, Young R, Xu L, Carlson GA, Williams D, Westaway D, Schmitt-Ulms G (2009) Interactome analyses identify ties of PrP and its mammalian paralogs to oligomannosidic N-glycans and endoplasmic reticulum-derived chaperones. *PLoS pathogens* 5:e1000608.
- Watts JC, Westaway D (2007) The prion protein family: diversity, rivalry, and dysfunction. *Biochimica et biophysica acta* 1772:654-672.
- Weise J, Crome O, Sandau R, Schulz-Schaeffer W, Bahr M, Zerr I (2004) Upregulation of cellular prion protein (PrP<sup>c</sup>) after focal cerebral ischemia and influence of lesion severity. *Neuroscience letters* 372:146-150.
- Weissmann C, Aguzzi A (1999) Perspectives: neurobiology. PrP's double causes trouble. *Science* 286:914-915.
- Weissmann C, Bueler H (2004) A mouse to remember. *Cell* 116:S111-113, 112 p following S113.
- Weissmann C, Bueler H, Fischer M, Sailer A, Aguzzi A, Aguet M (1994) PrP-deficient mice are resistant to scrapie. *Annals of the New York Academy of Sciences* 724:235-240.
- Weissmann C, Flechsig E (2003) PrP knock-out and PrP transgenic mice in prion research. *British medical bulletin* 66:43-60.
- Westaway D, Daude N, Wohlgemuth S, Harrison P (2011) The PrP-like proteins Shadoo and Doppel. *Topics in current chemistry* 305:225-256.
- Westaway D, DeArmond SJ, Cayetano-Canlas J, Groth D, Foster D, Yang SL, Torchia M, Carlson GA, Prusiner SB (1994) Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins. *Cell* 76:117-129.
- Westergard L, Christensen HM, Harris DA (2007) The cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>): its physiological function and role in disease. *Biochimica et biophysica acta* 1772:629-644.
- White MD, Farmer M, Mirabile I, Brandner S, Collinge J, Mallucci GR (2008) Single treatment with RNAi against prion protein rescues early neuronal dysfunction and prolongs survival in mice with prion disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:10238-10243.
- Whittington MA, Sidle KC, Gowland I, Meads J, Hill AF, Palmer MS, Jefferys JG, Collinge J (1995) Rescue of neurophysiological phenotype seen in PrP null mice by transgene encoding human prion protein. *Nature genetics* 9:197-201.
- Witte H, Bradke F (2008) The role of the cytoskeleton during neuronal polarization. *Current opinion in neurobiology* 18:479-487.
- Wong RW, Guillaud L (2004) The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS. *Cytokine & growth factor reviews* 15:147-156.
- Woolhouse ME, Anderson RM (1997) Understanding the epidemiology of BSE. *Trends in microbiology* 5:421-424.

- Wopfner F, Weidenhofer G, Schneider R, von Brunn A, Gilch S, Schwarz TF, Werner T, Schatzl HM (1999) Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *Journal of molecular biology* 289:1163-1178.
- Xu J, Liu ZA, Pei DS, Xu TJ (2010) Calcium/calmodulin-dependent kinase II facilitated GluR6 subunit serine phosphorylation through GluR6-PSD95-CaMKII signaling module assembly in cerebral ischemia injury. *Brain research* 1366:197-203.
- Yamauchi M, Omote K, Ninomiya T (1998) Direct evidence for the role of nitric oxide on the glutamate-induced neuronal death in cultured cortical neurons. *Brain research* 780:253-259.
- Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Rincon M, Zheng TS, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA (1997) Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* 389:865-870.
- Yin S, Yu S, Li C, Wong P, Chang B, Xiao F, Kang SC, Yan H, Xiao G, Grassi J, Tien P, Sy MS (2006) Prion proteins with insertion mutations have altered N-terminal conformation and increased ligand binding activity and are more susceptible to oxidative attack. *The Journal of biological chemistry* 281:10698-10705.
- Yoshimura T, Arimura N, Kawano Y, Kawabata S, Wang S, Kaibuchi K (2006) Ras regulates neuronal polarity via the PI3-kinase/Akt/GSK-3beta/CRMP-2 pathway. *Biochemical and biophysical research communications* 340:62-68.
- Young R, Bouet S, Polyte J, Le Guillou S, Passet B, Vilotte M, Castille J, Beringue V, Le Provost F, Laude H, Vilotte JL (2011) Expression of the prion-like protein Shadoo in the developing mouse embryo. *Biochemical and biophysical research communications* 416:184-187.
- Young R, Passet B, Vilotte M, Cribiu EP, Beringue V, Le Provost F, Laude H, Vilotte JL (2009) The prion or the related Shadoo protein is required for early mouse embryogenesis. *FEBS letters* 583:3296-3300.
- Yu CZ, Li C, Pei DS, Zong YY, Shi Q, Wen XR, Guan QH, Hang D, Hou XY, Zhang GY (2009) Neuroprotection against transient focal cerebral ischemia and oxygen-glucose deprivation by interference with GluR6-PSD95 protein interaction. *Neurochemical research* 34:2008-2021.
- Yu G, Jiang L, Xu Y, Guo H, Liu H, Zhang Y, Yang H, Yuan C, Ma J (2012) Silencing prion protein in MDA-MB-435 breast cancer cells leads to pleiotropic cellular responses to cytotoxic stimuli. *PloS one* 7:e48146.
- Zafar S, von Ahsen N, Oellerich M, Zerr I, Schulz-Schaeffer WJ, Armstrong VW, Asif AR (2011) Proteomics approach to identify the interacting partners of cellular prion protein and characterization of Rab7a interaction in neuronal cells. *Journal of proteome research* 10:3123-3135.
- Zahn R, Liu A, Luhrs T, Riek R, von Schroetter C, Lopez Garcia F, Billeter M, Calzolari L, Wider G, Wuthrich K (2000) NMR solution structure of the human prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:145-150.
- Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, Hajj GN, Chiarini LB, Nomizo R, Freitas AR, Cabral AL, Lee KS, Juliano MA, de Oliveira E, Jachieri SG, Burlingame A, Huang L, Linden R, Brentani RR, Martins VR (2002) Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *The EMBO journal* 21:3307-3316.
- Zhang CC, Steele AD, Lindquist S, Lodish HF (2006) Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:2184-2189.
- Zwick E, Hackel PO, Prenzel N, Ullrich A (1999) The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems. *Trends in pharmacological sciences* 20:408-412.



# ANEXO I





## INFORME DEL FACTOR DE IMPACTO

Por la presente, hago constar el *Factor de Impacto* correspondiente a las revistas donde se han publicado los artículos científicos que conforman la Tesis Doctoral presentada por Patricia Carulla Martí.

- Journal of Neurochemistry: **3.973**
- Molecular Biology of the Cell: **4.604**

---

Director de la tesis

Dr. José Antonio del Río  
Fernández

---

Codirector de la tesis

Dr. Franc Llorens Torres



## ANEXO II





## INFORME DE PARTICIPACIÓN

El Dr. **José Antonio del Río Fernández** y el Dr. **Franc Llorens Torres**, director y codirector respectivamente de la Tesis Doctoral “**La proteína priónica celular: análisis de su función neuroprotectora y reguladora del ciclo celular**”, elaborada por **Patricia Carulla Martí**, informan que la participación de la doctoranda en los artículos científicos que conforman dicha tesis ha sido la siguiente:

En el artículo titulado “**PrP<sup>C</sup> regulates epidermal growth factor receptor function and cell shape dynamics in Neuro2a cells**”, publicado en la revista *Journal of Neurochemistry*, la doctoranda ha participado en el diseño de los experimentos y es la principal responsable del desarrollo de los mismos.

En el artículo titulado “**Neuroprotective role of PrP<sup>C</sup> against kainate-induced epileptic seizures and cell death depends on the modulation of JNK3 activation by GluR6/7–PSD-95 binding**” publicado en la revista *Molecular Biology of the Cell*, la doctoranda ha participado en el diseño de los experimentos y es la principal responsable del desarrollo de los mismos.

Por último, hago constar que ninguno de estos artículos ha sido utilizado en la elaboración de otras Tesis doctorales.

---

Director de la tesis

Dr. José Antonio del Río  
Fernández

---

Codirector de la tesis

Dr. Franc Llorens Torres

