

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LARISSA MORATO LUCIANI RICHTER

CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DE STUB1/CHIP NO CONTROLE DA
ESTABILIDADE DA PROTEÍNA PRION CELULAR

CURITIBA
2015

LARISSA MORATO LUCIANI RICHTER

CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DE STUB1/CHIP NO CONTROLE DA
ESTABILIDADE DA PROTEÍNA PRION CELULAR

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia, Setor de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Frohlich
Mercadante

CURITIBA
2015

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Richter, Larissa Morato Luciani

Caracterização do papel de STUB1/CHIP no controle da estabilidade da proteína príon celular. / Larissa Morato Luciani Richter. – Curitiba, 2015. 94 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Adriana Frohlich Mercadante

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Prions 2. Ubiquitina I. Título II. Mercadante, Adriana Frohlich III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia..

CDD (20. ed.) 575.192454



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

**“CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DE STUB1/CHIP NO CONTROLE
DA ESTABILIDADE DA PROTEÍNA PRION CELULAR”**

por

LARISSA MORATO L. RICHTER

**Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos
professores:**

Adriana F. Mercadante
Prof^ª. Dr^ª. Adriana Frohlich Mercadante (presidente)

Sheila M. B. Winnischofer
Prof^ª. Dr^ª. Sheila M. B. Winnischofer

Daniele Chaves Moreira
Dr^ª. Daniele Chaves Moreira

Curitiba, 20 de março de 2015.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me iluminar e me dar forças, por estar sempre presente em
minha vida.

Ao meu marido, **Andreas**, por sempre me apoiar e estar junto em minhas
decisões, e por todo amor e paciência. Obrigada por me fazer feliz, amo você.

Aos meu pais, **Altair** e **Simone**, por todo o amor, sacrifícios, ensinamentos,
exemplos e incentivo. Tudo o que sou e todo meu amor, devo a vocês.

À minha irmã, **Rafaela**, por me fazer rir e por ser minha companheira desde
sempre e para sempre. Amo você, irmã.

À minha orientadora, professora Adriana, "**Adri**", a quem eu aprendi a admirar
como profissional e como pessoa. Muito obrigada pela amizade e pela
oportunidade de aprendizado e convivência.

Aos professores **Silvio Zanata** e **Lia Nakao**, pelas sugestões e discussões
científicas sempre bem aproveitadas.

Aos amigos do laboratório, **Zaine**, **Luiz**, **Maiara**, **Letícia**, **Carol** e **Ingrid**, por
tudo o que me ensinaram, pelas ajudas e discussões científicas, e
principalmente por fazerem meus dias muito mais divertidos.

Ao **Bruno**, por estar sempre disposto a me ajudar nos experimentos e pela
companhia no dia-a-dia.

A todos os **alunos do Laboratório de Neurobiologia**, pelas discussões científicas e pelo coleguismo.

A **CAPES** e ao **CNPq**, por financiarem esse trabalho, e ao **Programa de Microbiologia, Parasitologia e Patologia**, pela bolsa de estudos.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram com esse trabalho.

**“Se as coisas são inatingíveis...ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”**

Mário Quintana

RESUMO

A proteína prion celular, ou PrP^C, é uma glicoproteína extracelular, ancorada na membrana por uma molécula de glicofosfatidilinositol (GPI). A conversão de PrP^C para uma isoforma mal dobrada e infecciosa, PrP^{Sc}, é responsável pelo desenvolvimento das doenças espongiformes transmissíveis (TSEs), ou doenças priônicas. Apesar de extensa pesquisa e do fato de PrP^C ser conservada entre as espécies, não se chegou a um consenso sobre sua função fisiológica. Recentemente nosso grupo identificou a interação entre PrP^C e Stub1 (STIP1 *homology and U-Box containing protein 1*), também denominada CHIP (*C-terminus of HSC70-interacting protein*) - uma co-chaperona citoplasmática que apresenta atividade ubiquitina E3-ligase, através do sistema de duplo-híbrido em leveduras. Stub1/CHIP age fazendo a triagem de proteínas para o dobramento ou degradação. Entretanto, a função biológica dessa interação ainda não estava elucidada. Primeiramente, o objetivo desse trabalho foi confirmar a interação entre PrP^C e Stub1/CHIP através de técnicas de *pull-down* e co-imunoprecipitação. A interação foi confirmada tanto em ensaios com proteínas superexpressas, através da transfecção de células HEK293T com plasmídeos com capacidade de expressar PrP^C e Stub1/CHIP, quanto endógenas, a partir de amostras de cérebro e epitélio olfatório de camundongo, corroborando com os dados achados pelo sistema de duplo-híbrido. A segunda etapa desse trabalho teve como objetivo caracterizar a interação de Stub1/CHIP e PrP^C. Focou-se no envolvimento de Stub1/CHIP na estabilidade/degradação de PrP^C, supondo-se que Stub1/CHIP participaria no controle de qualidade de PrP^C. Dessa forma, ensaios de degradação e ubiquitinação foram realizados em células transfectadas com plasmídeos com capacidade de expressar PrP^C e Stub1/CHIP. Nossos resultados indicam que Stub1/CHIP está envolvida na degradação de PrP^C e sugerem que a via de degradação envolvida seja a dependente de ubiquitina-proteossomo. Esse trabalho indica um importante papel de Stub1/CHIP na estabilidade/degradação de PrP^C, sendo um possível alvo de estratégias terapêuticas no estudo das TSEs.

Palavras-chave: PrP^C. Stub1/CHIP. Ubiquitina-proteossomo. Prion. Controle de qualidade de proteínas.

ABSTRACT

The cellular prion protein (PrP^C) is a glycoprotein bound to cell membrane via a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. A conversion of PrP^C to its misfolded and infectious isoform (PrP^{Sc}) is responsible for the development of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), or prion diseases. Despite intensive research and the fact that PrP^C is conserved across different species, a consensus about its physiological function has not yet been reached. Recently, our group identified the interaction between PrP^C and Stub1 (STIP1 *homology and U-Box containing protein* 1), also called CHIP (*C-terminus of HSC70-interacting protein*) through yeast two-hybrid screen, a cytoplasmic co-chaperone which presents as ubiquitin E3-ligase activity. Stub1/CHIP acts screening proteins to their folding or degradation. Nevertheless, the biological function of this interaction was not yet elucidated. The first objective of this work was to confirm the interaction between PrP^C and Stub1/CHIP through pull-down and co-immunoprecipitation assays. This interaction was confirmed in assays from super expressed proteins, through transfection of HEK293T cells with plasmids expressing PrP^C and Stub1/CHIP, and from endogenous proteins assays, through mouse brain and olfactory epithelium sampling, corroborating the data from yeast-two-hybrid screen. The second part of this study aimed to characterize the interaction between Stub1/CHIP and PrP^C. We focused on the involvement of Stub1/CHIP in the stability/degradation of PrP^C, assuming that Stub1/CHIP would participate in PrP^C quality control. In this way, degradation and ubiquitination assays were performed in cells transfected with plasmids expressing PrP^C and Stub1/CHIP. Our results indicate that Stub1/CHIP is involved in the degradation of PrP^C. This work indicates an important role of Stub1/CHIP in the stability/degradation of PrP^C, which could become a target for therapeutic strategies in the study of the TSEs.

Keywords: PrP^C. Stub1/CHIP. Ubiquitin-proteasome. Prion. Protein quality control.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - A SEQUÊNCIA TRADUZIDA DA PROTEÍNA PRION MURINA RETRATADA DE FORMA ALONGADA.....	16
FIGURA 2 - ROTAS QUE LEVAM À FORMAÇÃO DE PrPs CITOSÓLICOS.....	20
FIGURA 3 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO COMPARANDO OS DOMÍNIOS ESTRUTURAIS DE STUB1/CHIP ENTRE VÁRIAS ESPÉCIES.....	22
FIGURA 4 – STUB1/CHIP É EXPRESSA EM EPITÉLIO OLFATÓRIO (OE) E ENCÉFALO.....	38
FIGURA 5 - INTERAÇÃO DE PRP ^C COM STUB1/CHIP EM ENSAIO DE PULL- DOWN.....	39
FIGURA 6 - INTERAÇÃO DE PRP ^C COM HSP70 EM ENSAIOS DE PULL- DOWN.....	40
FIGURA 7 - EFICIÊNCIA DA LIGAÇÃO COVALENTE EM PROTEÍNA A/G SEPHAROSE.....	41
FIGURA 8 - PRP ^C INTERAGE COM STUB1/CHIP EM ENSAIO DE CO-IP A PARTIR DE EXTRATO DE HEK293T.....	42
FIGURA 9 - PRP ^C INTERAGE COM STUB1/CHIP EM ENSAIO DE CO-IP A PARTIR DE EXTRATO DE EPITÉLIO OLFATÓRIO.....	43
FIGURA 10 - TENTATIVA DE CO-IP ENTRE PRP ^C E HSP70.....	43
FIGURA 11 - TENTATIVA DE CO-IP ENTRE PRP ^C E STI1.....	44
FIGURA 12 - STUB1/CHIP PROMOVE A DEGRADAÇÃO DE 3F4-PRP ^C	45
FIGURA 13 - STUB1/CHIP PROMOVE A DEGRADAÇÃO DE GFP-PRP ^C	46
FIGURA 14 - STUB1/CHIP NÃO PROMOVE A DEGRADAÇÃO DE peGFP.....	47
FIGURA 15 - AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE PRP ^C	49
FIGURA 16 - NÍVEIS DE PRP ^C SÃO CONTROLADOS ATRAVÉS DO SISTEMA UBIQUITINA-PROTEOSSOMO.....	51
FIGURA 17 – ENSAIO DE UBIQUITINAÇÃO.....	52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESQUEMA DE TRANSFECCÃO DE CÉLULAS HEK293T PARA ENSAIO DE DEGRADAÇÃO.....	33
TABELA 2 - ESQUEMA DE TRANSFECCÃO DE CÉLULAS HEK293T PARA ENSAIO DE UBIQUITINAÇÃO.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APP – proteína beta amiloide
A β 42 - amiloide beta 2
CHIP – *C-terminus of HSC70-interacting protein*
CHX – cicloheximida
CJD – Creutzfeldt Jacob Disease
CO-IP – co-imunoprecipitação
DAXX – death-domain associated protein
DMP – dimetil pimelimidato
DMSO – dimetilsulfóxido
DNA – deoxyribonucleic acid
ER – retículo endoplasmático
ERAD – degradação associada ao retículo endoplasmático
gp78 – human glycoprotein 78
GPI – glicofosfatidilinositol
HEK293T – células de rim embrionário humano 293T
His – histidina
Hop – Hsp70/Hsc90 organizing protein
HRP – horseradish peroxidase
HSc – heat shock cognate protein
Hsp – heat shock protein
IP – imunoprecipitação
MEM – meio mínimo essencial
OE – olfactory epithelium
PBS – tampão salina fosfato
PrP – proteína príon
PrP^C – Proteína príon celular
PrP^{Sc} – proteína príon *scrapie*
RNA – ribonucleic acid
SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – SDS polyacrilamide gel electrophoresis

SFB – soro fetal bovino

SirT6 – sirtuin6

STI1 – stress inducible phosphoprotein 1

Stub1 – STIP1 homology and U-box containing protein 1

TBST – tampão salino Tris adicionado de Tween 20

TPR – domínios repetidos de tetratricopeptídeos

TSE – transmissible spongiform diseases

WB – *Western blotting*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 PRIONS.....	16
2.2 CONTROLE DE QUALIDADE DE PRIONS	18
2.3 STUB1/CHIP	20
3 OBJETIVO GERAL	25
4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
5 MATERIAIS E MÉTODOS	26
5.1 PLASMÍDEOS E ANTICORPOS	26
5.2 DETECÇÃO DE STUB1/CHIP EM HOMOGENATOS PROTEICOS DE ENCÉFALO E EPITÉLIO OLFATÓRIO DE CAMUNDONGO	27
5.3 TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS HEK293T.....	28
5.4 CONFIRMAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE PRP ^C E STUB1/CHIP	29
5.4.1 Ensaio de <i>pull-down</i>	29
5.4.2 Co-immunoprecipitação.....	30
5.4.2.1 Preparo de resina ligada covalentemente ao anticorpo: <i>Cross-Linking</i> com DMP.....	30
5.4.2.2 Co-immunoprecipitação a partir de extrato de células HEK293T transfectadas.....	31
5.4.2.3 Co-immunoprecipitação a partir de extrato de epitélio olfatório.....	32
5.5 AVALIAÇÃO DO PAPEL DE STUB1/CHIP NA ESTABILIDADE/DEGRADAÇÃO DE PrP.....	32
5.5.1 Ensaio de Degradação de PrP ^C	32
5.5.1.1 Segundo o protocolo de Ding e Goldberg	32
5.5.1.2 Segundo o protocolo de Yang <i>et al.</i>	33
5.5.2 Ensaio para verificar a participação do sistema ubiquitina-proteossomo na degradação de PrP ^C	34
5.5.2.1 Ensaio de inibição do proteossomo	34
5.5.2.2 Ensaio de ubiquitinação.....	35
5.6 INVESTIGAÇÃO DE STI1/HOP E Hsp70 NA INTERAÇÃO ENTRE PRP ^C E STUB1/CHIP	36
5.7 ANÁLISE DE DADOS.....	36

6 RESULTADOS	37
6.1 RESULTADOS OBTIDOS QUANTO À CONFIRMAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE PrP ^C e STUB1/CHIP	37
6.1.1 Expressão de Stub1/CHIP em encéfalo e epitélio olfatório	37
6.1.2 <i>Pull-Down</i>	39
6.1.3 Co-Imunoprecipitação	40
6.1.3.1 Avaliação da eficiência do <i>Cross-linking</i>	40
6.1.3.2 Co-Imunoprecipitação de PrP ^C e Stub1/CHIP a partir de extrato de células HEK293T co-transfectadas	41
6.1.3.3 Co-Imunoprecipitação de PrP ^C e Stub1/CHIP a partir de extrato de epitélio olfatório de camundongo	42
6.1.3.4 Co-imunoprecipitação de PrP e Hsp70	43
6.1.3.5 Co-imunoprecipitação de PrP ^C e STI1	44
6.2 RESULTADOS OBTIDOS QUANTO À AVALIAÇÃO DO PAPEL DE STUB1/CHIP NA ESTABILIDADE/DEGRADAÇÃO DE PrP	44
6.2.1 Papel de Stub1/CHIP na degradação de PrP ^C	44
6.2.1.1 Experimento com 3F4- PrP ^C e myc-Stub1/CHIP	45
6.2.1.2 Experimento com GFP- PrP ^C e myc-CHIP	46
6.2.1.3 Experimento com pGFP e myc-Stub1/CHIP.....	47
6.2.2 Experimentos com Cicloheximida	48
6.2.3 Verificação do envolvimento da via ubiquitina-proteossomo na degradação de PrP ^C por Stub/CHIP.....	50
6.2.3.1 Inibição do proteossomo	50
6.2.3.2 Inibição do proteossomo e co-IP	51
7 DISCUSSÃO	53
7.1 CONFIRMAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE PRP ^C E STUB1/CHIP	53
7.2 CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE PRP ^C E STUB1/CHIP	55
7.2.1 Ensaio de degradação de PrP ^C	55
7.2.2 Ensaio de ubiquitinação de PrP ^C	58
8 CONCLUSÃO	60
9 PERSPECTIVAS	61
REFERÊNCIAS	62
APÊNDICE 1 – Carta de submissão de manuscrito	69
APÊNDICE 2 - Manuscrito	71

1 INTRODUÇÃO

A proteína prion celular, ou PrP^C, é encontrada predominantemente como uma glicoproteína extracelular, ancorada na membrana através de uma molécula de glicofosfatidilinositol (GPI). É expressa na maioria dos tecidos e abundante no sistema nervoso central (BENDHEIM *et al.*, 1992).

A conversão da proteína prion celular endógena, PrP^C, para uma isoforma mal dobrada e infecciosa PrP^{Sc} (de *prion scrapie*) é responsável pelo desenvolvimento das doenças espongiformes transmissíveis (TSEs), ou doenças priônicas. Essas desordens neurodegenerativas são fatais e incluem a Doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD) em humanos, *scrapie* em ovinos e encefalopatia espongiforme bovina no gado (BOLTON *et al.*, 1982).

Apesar de extensa pesquisa e do fato de PrP^C ser conservada entre as diferentes espécies, ainda não se chegou a um consenso sobre sua função fisiológica (LINDEN *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2010). Mesmo assim, várias funções têm sido associadas com PrP^C, dentre elas: estresse e comportamento, ciclo de sono-vigília, memória, neuritogênese, neuroproteção e adesão celular. Esses achados sugerem que PrP^C está envolvida em complexos multiproteicos, participando de variados processos celulares, não tendo assim uma única função específica, mas desempenhando funções diferentes, de acordo com a interação realizada (LINDEN *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2010).

Em trabalho realizado anteriormente no laboratório de Neurobiologia pela aluna de mestrado Ana Paula Lappas Gimenez e orientado pela Professora Doutora Adriana Frohlich Mercadante, foram obtidos dez potenciais ligantes para PrP^C. Esse projeto foi executado através do sistema de duplo-híbrido em leveduras e identificou interações entre PrP^C e outras proteínas expressas em epitélio olfatório de camundongo. Os ligantes obtidos a partir desse trabalho pertencem a diferentes classes proteicas e estão relacionados a diversos mecanismos celulares, tais como proliferação celular e apoptose, citoesqueleto, transporte de vesículas, ubiquitinação de proteínas, resposta ao estresse, entre outras (GIMENEZ, 2013).

Dentre as interações identificadas, a de PrP^C com a proteína Stub1 (*STIP1 homology and U-Box containing protein 1*) é o objeto de estudo deste projeto. Stub1 ou CHIP (*C-terminus of HSC70-interacting protein*) é uma proteína citoplasmática

membro da família das proteínas E3-ligase, e que funciona como uma co-chaperona (BALLINGER *et al.*, 1999; DICKEY *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2014). Em cooperação com proteínas de choque térmico, como Hsc70, Hsp70 e Hsp90, Stub1/CHIP tem um papel crucial no reconhecimento e na modulação da degradação de várias proteínas-substratos. Em suma, Stub1/CHIP faz o controle de qualidade dessas proteínas, por fazer a triagem entre seu dobramento ou degradação, atuando dessa forma na homeostase citoplasmática. (SUN *et al.*, 2014).

Alguns estudos mostraram o envolvimento de Stub1/CHIP em doenças neurodegenerativas relacionadas ao mau dobramento de proteínas e formação de agregados, como Parkinson e Alzheimer (DICKEY *et al.*, 2007). É fato que as doenças priônicas são caracterizadas pelo dobramento incorreto e agregação de proteínas. Portanto, é lógico supor que PrP^C seja um substrato para Stub1/CHIP. É possível que a interação identificada entre PrP^C e Stub1/CHIP possa ocorrer *in vivo* e modular a estabilidade de PrP^C. Visto que a conversão para PrP^{Sc} depende desse controle de qualidade de PrP^C, Stub1/CHIP apresenta-se como um alvo potencial para abordagens terapêuticas nas doenças priônicas.

A primeira parte desse trabalho teve como objetivo confirmar a interação entre PrP^C e Stub1/CHIP. Os ensaios envolvidos nessa parte do projeto fizeram parte de um manuscrito intitulado "*Identification of novel binding proteins for cellular prion protein*", o qual está submetido e em processo de avaliação (Apêndice 1). A segunda parte do presente estudo foi desenvolvida no intuito de caracterizar essa interação e verificar qual o papel da proteína Stub1/CHIP na estabilidade de PrP^C. O estudo do processamento e controle de qualidade de PrP^C pode ajudar, conseqüentemente, no entendimento de suas funções fisiológicas e patológicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PRIONS

A proteína prion celular (PrP^{C}) é encontrada predominantemente como uma glicoproteína extracelular de 32-35kDa, ancorada na membrana através de uma molécula de glicofosfatidilinositol (GPI). Na superfície celular, PrP^{C} pode ser encontrada nas formas não glicosilada, mono e di-glicosilada (MEYER *et al.*, 1986). É expressa na maioria dos tecidos e abundante no sistema nervoso central (BENDHEIM *et al.*, 1992). Os domínios que fazem parte de PrP^{C} estão ilustrados na Figura 1.

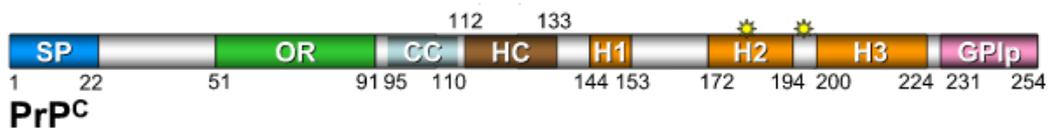


FIGURA 1 - A SEQUÊNCIA TRADUZIDA DA PROTEÍNA PRION MURINA RETRATADA DE FORMA ALONGADA - Os domínios maiores estão mostrados em diferentes cores. SP: peptídeo sinal; OR: domínio de repetição com octapeptídeo; CC: grupamento carregado; HC: núcleo hidrofóbico; H1, H2, H3: domínios helicoidais; GPIp: peptídeo sinalizador da âncora de GPI. Estrelas amarelas indicam a posição dos resíduos de glicosilação, nos aminoácidos 180 e 196.

FONTE: LINDEN *et al.*, 2008.

A molécula normal de PrP^{C} - que se apresenta predominantemente em forma de alfa-hélice, tem a capacidade de ser convertida à isoforma *scrapie*, ou PrP^{Sc} , que possui estrutura em forma de folha- β e forma agregados compactos, insolúveis e resistentes à proteinase e pode acumular no cérebro (MEYER *et al.*, 1986; revisado por LINDEN *et al.*, 2008). Essa isoforma alterada compõe quase que exclusivamente os *prions* [*proteinaceous infectious particle*], partículas infecciosas transmissíveis, responsáveis pelas encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSE). Estas são doenças neurodegenerativas fatais que afetam tanto os homens quanto os animais (BOLTON *et al.*, 1982). PrP^{Sc} acumula-se nas células e em depósitos extracelulares similares a placas, convertendo mais PrP^{C} à forma

patogênica, disparando a neurodegeneração. As doenças causadas por prions podem ocorrer na forma familiar (Doença de Creutzfeldt-Jacob – CJD, Insônia Familiar Fatal), adquirida (Encefalopatia Espongiforme Bovina, Kuru, Doença de Creutzfeldt-Jacob iatrogênica e variante – iCJD e vCJD) ou esporádica (sCJD), sendo que todas parecem ser transmissíveis sob certas circunstâncias (HEAD *et al.*, 2004).

Apesar de extensa pesquisa e do fato de PrP^C ser conservado entre as diferentes espécies, ainda não se chegou a um consenso sobre sua função fisiológica. (LINDEN *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2009). Algumas evidências apontam que a conversão de PrP^C para a forma PrP^{Sc} implica em um aumento da função tóxica. Entretanto, há também a hipótese de que a perda da função da PrP^C esteja envolvida na patogênese das doenças relacionadas (LINDEN *et al.*, 2008). Assim, o entendimento do papel biológico da proteína pode ajudar a elucidar o mecanismo molecular de doenças priônicas (STEELE *et al.*, 2007).

Estudos realizados em camundongos nocautes, nos quais o gene que codifica para PrP^C foi removido, demonstraram que esses animais são resistentes às doenças causadas por prions (BÜELER *et al.*, 1992; BÜELER *et al.*, 1993), porém desenvolvem-se normalmente, sem maiores alterações fenotípicas. Entretanto, parece pouco provável que a proteína PrP^C tenha evoluído apenas para permitir o desenvolvimento de doenças fatais. De fato, funções novas têm sido atribuídas à proteína, relativas ao estresse e comportamento, ao ciclo sono-vigília e memória, aos processos de neuritogênese e neuroproteção, de adesão celular, entre outros (revisado por LINDEN *et al.*, 2008). Muitas destas funções foram elucidadas com a descoberta de ligantes de PrP^C. Esses achados sugerem que PrP^C está envolvida em complexos multiproteicos, participando de variados processos celulares, não tendo uma única função específica, mas desempenhando funções diferentes, de acordo com a interação realizada (revisado por LINDEN *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2010).

2.2 CONTROLE DE QUALIDADE DE PRIONS

Vários estudos sobre as doenças causadas por prions têm procurado esclarecer como alterações na biossíntese e no metabolismo de PrP^C poderiam deflagrar o processo neurodegenerativo (CHAKRABARTI *et al.*, 2009). Como uma típica glicoproteína de superfície celular, durante sua tradução, PrP é translocado para o retículo endoplasmático (ER). O peptídeo sinal N-terminal é então clivado e a âncora de GPI é adicionada após remoção da sequência sinal, na região C-terminal. Ainda no ER, o polipeptídeo de PrP sofre outras modificações pós-traducionais, tais como formação de uma única ponte dissulfeto intramolecular e a adição de oligossacarídeos em dois sítios, resultando em uma mistura de moléculas mono- di- e não-glicosiladas. Ao transitar no Golgi, PrP^C recebe glicosilações adicionais e então, pela via de secreção, é inserida na camada extracelular da membrana plasmática, principalmente nos microdomínios de *rafts* de lipídeos. A forma madura, na superfície celular pode ser endocitada para compartimentos endossômicos, de onde pode ser reciclada para a superfície celular ou enviada aos lisossomos para degradação. A maior parte do PrP segue essa rota tradicional exocítica para a superfície celular e endocítica para renovação ou degradação. Numa célula típica, a biossíntese e transporte de PrP para a superfície celular leva em torno de 30 minutos, e a degradação possui uma meia-vida de 3 a 6 horas (CHAKRABARTI *et al.*, 2009).

Parte das moléculas de PrP recém-sintetizadas podem ser reconhecidas como proteínas mal dobradas pelo controle de qualidade do ER e ser direcionada à via de degradação associada ao ER (*ER associated degradation – ERAD*). O ERAD é um complexo que envolve várias moléculas e vários passos até que a proteína-alvo seja degradada. Simplificadamente há o transporte retrógrado da proteína-mal dobrada do lúmen do ER para o citosol, pois lá residem as enzimas necessárias que promovem a ubiquitinação do alvo. No citosol, acontece então a remoção dos oligossacarídeos por N-glicanases, ligação covalente de ubiquitina a resíduos de lisina das proteínas-alvo e degradação pelo proteossomo (revisado por VEMBAR & BORDSKY, 2008; RESTELLI *et al.*, 2010;). Várias evidências na literatura indicam que PrP^C sofre ubiquitinação e que é degradada via proteossomo (YEDIDIA *et al.*,

2001; MA & LINDQUIST, 2001). Estudos também demonstraram que em condições que favoreciam o dobramento aberrante de PrP, tais como mutações e/ou redução da função do proteossomo, levavam ao acúmulo de PrP citosólicos potencialmente neurotóxicos (MA *et al.*, 2002). PrP citosólicos também podem ser gerados por um mecanismo independente de ERAD. Nesse caso, uma parte de população de PrP recém-traduzida falha em ser translocada ao lúmen do ER, ficando no citosol e mantendo o peptídeo sinal N-terminal (FIORITI *et al.*, 2005; ORSI *et al.*, 2006). Alguns estudos indicam que essa forma de PrP é neurotóxica, e outros trabalhos contradizem esses achados, mostrando que PrPs citosólicos não são tóxicos (revisado por LINDEN *et al.*, 2008). Os mecanismos que levam à formação de PrPs citosólicos estão esquematizados na Figura 2.

Com relação ao mecanismo de controle de qualidade de PrP mediado por ERAD, Shao e colaboradores identificaram recentemente a primeira ubiquitina-ligase específica para PrP (SHAO *et al.*, 2014). Trata-se da gp78, uma proteína integral da membrana do ER, pertencente à família das E3-ligases. Os autores do trabalho em questão demonstraram uma interação específica entre PrP não-glicosilado e gp78, a qual resulta na ubiquitinação e degradação de PrP via proteossomo.

Nosso grupo apresenta resultados que indicam que PrP^C interage com Stub1/CHIP, uma co-chaperona com atividade E3 ligase, envolvida na degradação via ubiquitina-proteossomo de proteínas-alvo. O objetivo principal do presente trabalho foi investigar o papel dessa interação no controle de qualidade de PrP^C. É possível que além da gp78, PrP também seja regulado por Stub1/CHIP. De fato, há evidências na literatura que mostram que uma mesma proteína pode ser substrato para marcação por ubiquitina por múltiplas E3 ligases, o que seria um possível mecanismo de redundância funcional ou controle regulatório para determinados contextos celulares, ou ainda uma cooperação entre duas co-chaperonas (MORISHIMA *et al.*, 2008; PARBACUS *et al.*, 2009; LOVE *et al.*, 2012; revisado por EDKINS, 2015).

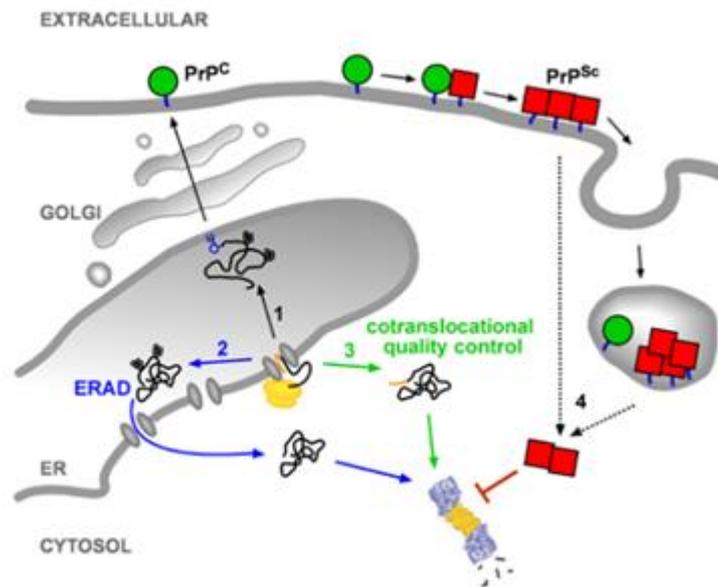


FIGURA 2 - ROTAS QUE LEVAM À FORMAÇÃO DE PrPs CITOSÓLICOS - 1: Em condições fisiológicas, PrP é translocado para o lumen do ER. Durante esse processo, a sequência sinal N-terminal é clivada e duas N-glicosilações são realizadas na molécula de PrP. No lumen do ER, o peptídeo sinal C-terminal é removido e substituído por uma âncora de GPI. Durante o trânsito secretório, PrP^C é direcionada à superfície externa da membrana plasmática. Em células infectadas com *scrapie*, PrP^C na membrana ou na rota endocítica interage com a forma infecciosa e é convertida a PrP^{Sc}. 2: ERAD envolve a retrotranslocação de formas de PrP mal dobradas presentes no ER para o citosol. Os glicanos são removidos antes da degradação proteossomal. 3: Controle de qualidade cotranslocacional - não há a translocação do polipeptídeo nascente para o ER. Ao invés disso, a proteína é diretamente direcionada à degradação pelo proteossomo. Nessa rota, as proteínas manteriam seu peptídeo sinal N-terminal. 4: Em células infectadas por PrP^{Sc}, o príon pode translocar da membrana ou de compartimentos endocíticos para o citoplasma, onde interfere na atividade proteossomal.

FONTE: MIESBAUER *et al.*, 2010.

2.3 Stub1/CHIP

Como mencionado, o presente estudo foi originado como um desdobramento do trabalho de mestrado da estudante Ana Paula L. Gimenez, orientado pela Professora Dra. Adriana Frohlich Mercadante (UFPR). Através do sistema de duplo-híbrido em leveduras, dez proteínas ligantes de PrP^C foram identificadas. Dentre elas, Stub1 (*STIP1 homology and U-Box containing protein 1*) despertou maior interesse e o presente trabalho baseou-se na caracterização dessa interação.

Stub1 ou CHIP (*C-terminus of Hsc70-interacting protein*), é uma proteína citoplasmática de 35 kDa membro da família das proteínas E3-ligase que funciona como uma co-chaperona (BALLINGER *et al.*, 1999; DICKEY *et al.*, 2007; SUN *et al.*,

2014). Em mamíferos, o gene que codifica para Stub1/CHIP está localizado no cromossomo 16 (Revisado por PAUL & GOSH, 2014). Em comparação com a sequência humana da proteína, há 97% de identidade e 98% de similaridade com a sequência de camundongo, e 53% de identidade e 60% de similaridade com a sequência de *Drosophila*, sendo assim altamente conservada entre as espécies e é expressa preferencialmente em músculo estriado adulto e cérebro (BALLINGER *et al.*, 1999). Sua região amino-terminal possui três domínios de repetições de tetratricopeptídeos (TPR), sendo esses responsáveis por interações com Hsp70/90 e outras chaperonas moleculares (BALLINGER *et al.*, 1999; HATAKEYAMA *et al.*, 2001). A região carboxi-terminal contém o domínio *U-box*, que é o sítio da sua atividade de ubiquitina E3 ligase e determina a especificidade para ubiquitinação do substrato (HATAKEYAMA *et al.*, 2001). As enzimas E-3 ligase interagem diretamente com o substrato, mediando a transferência de ubiquitina ao grupo amino de uma lisina da proteína cliente (ARAVIND & KOONIN, 2000). Além de atividade E3, Stub1/CHIP possui atividade E4-ligase, que é a capacidade de catalisar a extensão da cadeia de poliubiquitina ligada às suas proteínas clientes (revisado por EDKINS, 2015). Em cooperação com as proteínas de choque térmico, incluindo Hsc70, Hsp70 e Hsp90, Stub1/CHIP age regulando o balanço entre o dobramento e degradação de proteínas-alvo, via ubiquitina-proteossomo (CONNELL, *et al.*, 2001; HATAKEYAMA *et al.*, 2001). A estrutura de Stub1/CHIP e comparação com alguns de seus ortólogos está representada na figura 3.



FIGURA 3 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO COMPARANDO OS DOMÍNIOS ESTRUTURAIS DE Stub1/CHIP ENTRE VÁRIAS ESPÉCIES - A figura mostra claramente o centro da proteína e região C-terminal altamente conservados.

FONTE: Revisado por PAUL & GOSH, 2014.

No trabalho de Dai e colaboradores, camundongos nocaute para Stub1/CHIP mostraram-se viáveis e desenvolveram-se normalmente, indicando que o gene para essa proteína não é essencial. Porém, houve maior mortalidade perinatal de animais nocaute para Stub1/CHIP, se comparados aos animais selvagens. A mortalidade perinatal foi relacionada à maior sensibilidade à temperatura nesses camundongos, e a indução de stress provocou apoptose em múltiplos órgãos, relacionando assim Stub1/CHIP com resposta ao stress (DAI *et al.*, 2003). Em outro estudo, camundongos CHIP^{-/-} apresentaram fenótipos de envelhecimento precoce e diminuição de 60% da sobrevivência, sugerindo que Stub1/CHIP é um regulador no envelhecimento de mamíferos (MIN *et al.*, 2008).

Alguns estudos mostraram o envolvimento de Stub1/CHIP em doenças neurodegenerativas relacionadas ao dobramento incorreto de proteínas e formação de agregados, como as doenças de Parkinson e Alzheimer (DICKEY *et al.*, 2007). Kumar e colaboradores (KUMAR *et al.*, 2007) identificaram a interação entre Stub1/CHIP e a proteína beta-amilóide (APP) e mostraram que, em conjunto com as Hsps, Stub1/CHIP participa da maquinaria responsável por diminuir os níveis do

peptídeo A β 42 e promover, portanto, um papel neuroprotetor. Ainda, Al-Ramahi e colaboradores apontaram para o fato de Stub1/CHIP evitar a neurotoxicidade causada pela proteína ataxina-1, promovendo sua ubiquitinação e degradação. A proteína ataxina-1 expandida causa a ataxia cerebelar e provoca o surgimento de inclusões nucleares. Mais uma vez, é apontado o papel neuroprotetor de Stub1/CHIP (AL-RAMAHI *et al.*, 2006).

É fato que as doenças priônicas também são doenças neurodegenerativas caracterizadas pelo dobramento incorreto e agregação de proteínas. Assim, é lógico supor que PrP^C seja um substrato para Stub1/CHIP. Essa possibilidade é mencionada por Zhang e colaboradores, em um trabalho que discorre sobre a interação realizada entre Hsp70 e PrPs citosólicos mutantes. Os autores identificaram degradação de PrPs através da superexpressão de Hsp70, que exerce, assim, um papel protetor. Ao final da discussão, sugerem que essa conversão da função de Hsp70 de dobramento a um fator de degradação de proteínas possa ser mediado por Stub1/CHIP. (ZHANG *et al.*, 2012).

Se a conversão de PrP^C para sua forma infectante, PrP^{Sc}, depender desse controle de qualidade, Stub1/CHIP pode ser um alvo potencial para abordagens terapêuticas nas doenças causadas por prions.

Ainda sobre Stub1/CHIP, sabe-se que esta é homóloga à proteína STI1 (*stress-inducible protein 1*) ou Hop (*Hsp70/Hsp90 organizing protein*). STI1/Hop também é uma co-chaperona que contém domínios TPR e interage com a região C-terminal de Hsp70 e Hsp90. Inclusive, Muller e colaboradores fizeram, em 2013, um estudo de comparação estrutural entre as regiões TPR de Stub1/CHIP e STI1/Hop. Apesar da similaridade limitada na sequência de aminoácidos, o alinhamento da região TPR de Stub1/CHIP com as regiões TPR1 e TPR2 de STI1/Hop mostrou a presença de resíduos conservados especialmente nas regiões N-terminais dos domínios ligantes de Hsp70 e Hsp90. A maior diferença entre os domínios TPR de Stub1/CHIP e STI1 está na região C-terminal. (MULLER *et al.*, 2013).

Além das semelhanças na estrutura, STI1/Hop, assim como Stub1/CHIP, interage com PrP^C. (ZANATA *et al.*, 2002). Estudos indicam que STI1/Hop pode ser secretada no meio extracelular (LIMA *et al.*, 2007; HAJJ *et al.*, 2013) e que sua interação com PrP^C na superfície celular está envolvida nos processos de

neuritogênese e neuroproteção (ZANATA *et al.*, 2002;. CHIARINI *et al.*, 2002; LIMA *et al.*, 2007).

Alguns trabalhos têm demonstrado que STI1/Hop e Stub1/CHIP podem participar juntos e de forma antagônica na modulação do equilíbrio entre o dobramento e a degradação de proteínas clientes de Hsp70/90 (KUNDRAT & REGAN, 2010; DONELLY *et al.*, 2013; MULLER *et al.*, 2013;). Mais especificamente, no mesmo estudo que fez comparações estruturais entre essas duas proteínas, Muller e colaboradores mostraram que a fosforilação da região C-terminal de Hsp90 e Hsp70 impede a ligação de Stub1/CHIP e aumenta sua ligação ao STI1/Hop, permitindo o dobramento de proteínas. Do contrário, quando estas chaperonas não estão fosforiladas, elas preferencialmente se ligam em Stub1/CHIP, promovendo assim a degradação de proteínas alvo (MULLER *et al.*, 2013). Presume-se que um mecanismo semelhante esteja envolvido no controle de qualidade de PrP^C, uma vez que esta se liga tanto a STI1/Hop, quanto a Stub1/CHIP. Como será visto, esta regulação da estabilidade de PrP^C por STI1/Hop e Stub1/CHIP foi abordada no trabalho em questão.

3 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a interação entre a proteína PrP^C (Prion celular) e Stub1(*STIP1 homology and U-Box containing protein1*) e verificar seu papel no controle de qualidade de PrP^C.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar a interação entre PrP^C e Stub1/CHIP através das técnicas de *pull-down* e co-imunoprecipitação;
- Verificar a participação das proteínas STI1 (*Stress inducible protein 1*) e Hsp70 na interação entre PrP^C e Stub1/CHIP;
- Determinar o papel da proteína Stub1/CHIP na estabilidade/degradação de PrP^C;
- Determinar o envolvimento da via ubiquitina-proteossomo na degradação de PrP^C por Stub1/CHIP.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 PLASMÍDEOS E ANTICORPOS

Os seguintes anticorpos primários foram utilizados neste estudo: soro anti-PrP^C policlonal de dois lotes diferentes - um deles obtido no Laboratório de Neurobiologia e o outro cedido gentilmente pela Dra. Marilene Lopes, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB USP, ambos feitos como descrito por Zanata *et al.* (2002); anti-Stub1/CHIP monoclonal (ABCAM); anti- β -actina monoclonal (Sigma-Aldrich); soro anti-STI1 policlonal produzido no Laboratório de Neurobiologia, segundo o descrito por Souza *et al.* (2014); anti-Hsp70 (BD); anti-his tag policlonal (QIAGEN); anti-GFP, cedido gentilmente pelo Professor Dr. Stênio Perdigão Fragoso do Instituto Carlos Chagas – ICC-Fiocruz Curitiba; anti-ubiquitina monoclonal (*Cell Signaling*).

Os plasmídeos utilizados nas transfecções de células foram: pMyc-Stub1, capaz de expressar Stub1/CHIP murina, produzido no Laboratório de Neurobiologia pelo aluno de doutorado Celso Fávaro Júnior; pEGFP-PrP^C, que apresenta a sequência capaz de codificar o fragmento 23-254 do PrP^C murino no vetor pEGFP-C1, previamente descrito por Lee *et al.* (2001) e cedido gentilmente pela Dra. Vilma Regina Martins (Centro Internacional de pesquisa do Hospital A.C. Camargo, São Paulo); 3F4-PrP^C, sequência que possui o epítopo 3F4 humano inserido entre os resíduos 109 e 112 da proteína murina, clonado no vetor pcDNA (VINCENT *et al.*, 2000). O epítopo 3F4 serve, assim, como uma etiqueta molecular pequena e com anticorpo correspondente de alta afinidade; pEGFP vazio; pcDNA 3.1-Myc vazio.

5.2 DETECÇÃO DE STUB1/CHIP EM HOMOGENATOS PROTEICOS DE ENCÉFALO E EPITÉLIO OLFATÓRIO DE CAMUNDONGO

Encéfalo e epitélio olfatório de camundongo foram removidos após a eutanásia dos animais e lisados em tampão de lise gelado (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% NP-40, 0,2% deoxicolato de sódio, 1 mM PMSF e 1 mM NEM) por 30 minutos. Os extratos foram centrifugados a 19000 x g por 30 minutos a 4°C e os sobrenadantes reservados. Os precipitados obtidos da centrifugação anterior foram macerados por mais 30 minutos e centrifugados por 19000 x g por 30 minutos a 4°C. Os sobrenadantes dessa segunda centrifugação foram adicionados aos sobrenadantes reservados da primeira centrifugação, resultando nos homogenatos proteicos de encéfalo e epitélio olfatório. Neste estudo, todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (certificado número 623) e estão de acordo com o guia de ética estabelecido pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal).

Os extratos (100 µg) foram então diluídos em tampão de amostra redutor Laemmli e aquecidos por 10 minutos a 100°C. As amostras foram resolvidas por SDS-PAGE a 12% e analisadas por *Western blotting*. Nesse processo, as proteínas que foram separadas durante a corrida eletroforética são transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond-C Extra Amersham Biosciences (GE *Healthcare*) durante uma hora, sob voltagem constante de 10 V em sistema *semi-dry*. Após a transferência, a membrana foi bloqueada durante uma hora com tampão TBST (150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,4 e 0,05% Tween 20) contendo 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé). A membrana foi incubada com o anticorpo anti-Stub1/CHIP (1:2000) ou anti-β actina (1:3000) diluído em tampão de bloqueio por 16 horas a 4 °C sob agitação. Após a incubação, a membrana foi lavada com TBST três vezes durante cinco minutos e em seguida, adicionou - se o anticorpo secundário conjugado a HRP "*horseradish peroxidase*" (Sigma-Aldrich). A membrana permaneceu incubando com este anticorpo durante uma hora à temperatura ambiente, sob agitação. Um novo ciclo de lavagem foi realizado. No final do processo, a membrana foi incubada com o substrato adequado para a reação

quimioluminescente empregando-se o Kit West Pico (Pierce Co.). Filmes de autoradiograma Amersham TM ECL (GE *Healthcare*) foram expostos à membrana em diversos tempos até a visualização das bandas de interesse.

Nesse experimento, o anticorpo anti β -actina foi utilizado como controle de carregamento do gel e normalizador da reação. A quantificação das intensidades das bandas geradas foi medida através do *software* ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). A intensidade do sinal gerado pela expressão proteica foi normalizada, dividindo-se seu valor pela banda de β -actina correspondente. Os experimentos foram conduzidos ao menos três vezes e os valores são expressos como média \pm erro padrão. O teste T de *Student* foi usado para análise estatística e $P < 0.05$ foi considerado significativo.

5.3 TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS HEK293T

Um dos métodos realizados para a confirmação da interação PrP^C-Stub1/CHIP foi a co-imunoprecipitação, descrita por Costa *et al.*, 2009. Em um dos ensaios de Co-IP, foram utilizados extratos de células HEK293T (linhagem celular derivada de rim embrionário humano) co-transfectadas. No método de transfecção, Células HEK 293T foram cultivadas em meio MEM (meio mínimo essencial, Cultilab) adicionado de 10% SFB (Cultilab) e 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antibiótico Gentamicina (Garamicina Mantecorp) e mantidas em incubadora úmida com tensão de 5% de CO_2 a 37°C. As células foram transfectadas 24 horas após seu repique, com o plasmídeo de interesse pelo método da co-precipitação de fosfato de cálcio. Uma alíquota 12 μg do plasmídeo de interesse foi adicionado na superfície de 750 μl de água ultrapura estéril, seguido de 250 μl de solução 1 M CaCl_2 e 1000 μl de solução BBS2x concentrada (50 mM BES, 250 mM NaCl e 1 mM Na_2HPO_4 ; pH 6,95). Após cinco minutos de incubação a temperatura ambiente, foram adicionados 8,0 mL de meio MEM acrescido de 10% de soro fetal bovino e 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina. Uma placa de poliestireno de 100 mm de diâmetro (Nest) contendo células HEK293T com aproximadamente 80% de confluência teve seu meio de cultura retirado e então, a solução de transfecção descrita acima foi gentilmente adicionada. Com essa

solução, a placa foi incubada por um período de 5 a 8 horas em estufa úmida a 37°C com 5% CO₂. Após este tempo, o meio foi retirado, a placa foi cuidadosamente lavada com 5,0 mL de PBS e adicionado novo meio MEM acrescido de 10% de SFB e 40 µg/mL de gentamicina.

5.4 CONFIRMAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE PRP^C E STUB1/CHIP

5.4.1 Ensaio de *pull-down*

O ensaio de *pull-down* foi baseado no protocolo estabelecido por Costa *et al.* (2009), com algumas modificações detalhadas a seguir. Encéfalos de camundongos foram removidos após eutanásia e lisados conforme o item 5.2. Os homogenatos foram clarificados através de incubação com 30 µL de resina de níquel-agarose, adicionados de tampão A (10 mM TRIS-HCl pH 7,4; 100 mM NaH₂PO₄; 25 mM imidazol; 1% NP-40) durante uma hora a 4°C sob agitação. Após essa incubação, as amostras foram centrifugadas por um minuto a 2400 x g o sobrenadante resultante incubado em 30 µL de resina de níquel-agarose por mais uma hora a 4°C sob agitação. Após essa etapa, as amostras foram mais uma vez centrifugadas a 2400 x g por 1 minuto e o sobrenadante resultante dividido em duas alíquotas iguais. Uma alíquota foi incubada com 90 µg de PrP^C recombinante, com cauda de histidina (His₆-PrP^C) e a outra (controle) foi incubada com o volume equivalente de tampão A. Essa incubação foi realizada a 4°C por duas horas, sob agitação. Após esse período, as amostras foram incubadas com mais 30 µL de resina de níquel agarose, por uma hora a temperatura ambiente. Após seis lavagens com tampão A e uma última lavagem com tampão A acrescido de 0,01% de SDS, os materiais que permanecem ligados à coluna foram eluídos em tampão de amostra Laemmli, submetidos à eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e analisados por *Western blotting* (conforme descrito no item 5.2), com anticorpos anti-Stub1/CHIP 1:2000 e anti-His tag 1:1000.

5.4.2 Co-imunoprecipitação

A co-imunoprecipitação foi realizada segundo o protocolo descrito por Costa *et al.* (2009), a partir de duas fontes das proteínas de interesse: células superexpressando PrP^C e Stub1/CHIP, e epitélio olfatório de camundongo, como fonte endógena de proteínas.

5.4.2.1 Preparo de resina ligada covalentemente a anticorpo: *Cross-Linking* com DMP

Uma das modificações feitas no protocolo de Costa *et al.* (2009), foi a realização de co-imunoprecipitação com *cross-linking*, isto é, a utilização de matriz contendo um anticorpo covalentemente ligado à ela, através de um agente *crosslinker*, nesse caso o dimetil pimelimidato, seguindo o proposto por Harlow & Lane (1999). A matriz usada nesse procedimento foi a sepharose proteína A/G (Sigma-Aldrich). Uma alíquota de sepharose A/G foi separada e incubada com o anticorpo de interesse (soro policlonal anti-PrP^C feito em camundongo ou soro pré-imune) durante 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação; concomitantemente e nas mesmas condições, outra alíquota foi incubada com soro pré-imune de camundongo. Após a incubação, as amostras de sepharose A/G foram centrifugadas por 30 segundos a 2400 x g. O sobrenadante foi descartado e a matriz foi coletada e lavada duas vezes com uma solução de borato de sódio 0,2 M pH 9,0. A matriz foi centrifugada por 5 minutos a 600 x g, o sobrenadante descartado, e então incubada com borato de sódio 0,2 M pH 9,0 acrescido de 20 mM de DMP (dimetil pimelimidato) por 16 horas a 4°C, sob agitação. Após essa reação, a sepharose A/G foi lavada duas vezes com borato de sódio 0,2 M pH 9,0. A partir daí, inicia-se um ciclo de lavagens da matriz: a reação de *cross-linking* foi interrompida através de três lavagens de 10 minutos com uma solução de TRIS 100 mM p H7,4. Depois, realizou-se mais três lavagens de 10 minutos com uma solução de glicina pH 3,0. Finalmente, a matriz foi lavada três vezes de 10 minutos com PBS e estocada a 50% numa solução de PBS timerosal 0,01%, para conservação.

A eficiência da ligação covalente do anticorpo à matriz foi avaliada separando-se 10 µL da resina não ligada, isto é antes do uso do DMP, e 10 µL da resina ligada, após a reação com DMP. Esses dois controles foram fervidos com tampão de amostra redutor e submetidos à SDS-PAGE 12% de acrilamida. O gel resultante foi corado com azul de Coomassie, devidamente descorado, lavado em água deionizada e analisado, quanto à presença de bandas.

5.4.2.2 Co-imunoprecipitação a partir de extrato de células HEK293T transfectadas

Após 48 horas da co-transfecção de células HEK293T (conforme o item 5.3) com 8,0 µg de GFP-PrP^C e 4,0 µg de myc-Stub1/CHIP (totalizando 12,0 µg totais de DNA), foram feitos extratos celulares. As células foram lisadas durante 30 minutos em tampão de lise gelado (50 mM de TRIS-HCl pH 7,4; 1% de NP-40; 0,2% de deoxicolato de sódio; 150 mM de NaCl; 1,0 mM PMSF; 1,0 mM NEM; 1,0 mM de CaCl₂ e 1,0 mM de MgCl₂) em banho de gelo e então centrifugadas a 18400 x g durante 15 minutos a 4°C. Os extratos celulares (aproximadamente 500 µg) foram clarificados através de incubação com 25 µL de proteína A/G sepharose (Sigma-Aldrich), por 3 horas a 4°C, sob agitação. Após o clareamento, a suspensão foi centrifugada a 18400 x g por 5 minutos a 4°C e metade do sobrenadante obtido incubado com 30 µL de proteína A/G sepharose ligada covalentemente ao soro pré-imune de camundongo. A outra metade foi incubada com 30 µL de proteína A/G sepharose ligada covalentemente a anticorpo anti-PrP^C, por 4 horas a 4°C, sob agitação. As matrizes contendo os imunocomplexos ligados foram lavadas cinco vezes com tampão de lise e o material que permaneceu ligado foi eluído com 30 µL de tampão redutor para SDS - PAGE 2,5x concentrado, fervido a 100°C durante dez minutos, submetido a SDS -PAGE 10% e analisado por *Western blotting* (conforme item 5.2) usando os anticorpos anti-PrP^C 1:3000, anti-Stub1/CHIP 1:2000, anti-ST11/Hop 1:3000 e anti-Hsp70 1:1000.

5.4.2.3 Co-imunoprecipitação a partir de extrato de epitélio olfatório

O mesmo ensaio descrito no item 5.4.2.2 foi realizado utilizando-se extrato de epitélio olfatório de camundongo. O extrato foi realizado conforme o item 5.2, e a co-imunoprecipitação procedida conforme o item 5.4.2.2.

5.5 AVALIAÇÃO DO PAPEL DE STUB1/CHIP NA ESTABILIDADE/DEGRADAÇÃO DE PrP^C

5.5.1 Ensaio de Degradação de PrP^C

5.5.1.1 Segundo o protocolo de Ding e Goldberg

Células HEK293T na quantidade de 4×10^5 células por placa foram transfectadas como descrito no item 5.3, em placas de poliestireno de 35 mm de diâmetro (Nest). Foram utilizados plasmídeos contendo PrP^C nas formas pEGFP-PrP^C ou 3F4-PrP^C; plasmídeo myc-Stub1/CHIP e o plasmídeo contendo o vetor GFP vazio (pEGFP). O protocolo do teste de degradação utilizado segue o descrito por Ding & Goldberg (2009). Seguindo este protocolo, uma quantidade fixa de GFP-PrP^C, 3F4-PrP^C ou GFP vazio foi co-transfectada com quantidades crescentes de myc-Stub1/CHIP em células HEK293T, conforme indicado na Tabela 1. A quantidade total de DNA foi normalizada com o plasmídeo pcDNA-myc. Após 48 horas de cultivo, as células foram lisadas em banho de gelo e tampão de lise gelado (50 mM TRIS-HCl pH 7,4; 0,2% deoxicolato de sódio; 1% NP-40; 0,5% Triton X-100, adicionado do coquetel de inibidores Roche) por 40 minutos. Após a lise, os extratos foram centrifugados por 10 minutos a 16000 x g e 4°C. Esses extratos foram então submetidos à SDS-PAGE e analisados por *Western blotting* (conforme item 5.2), utilizando-se os anticorpos anti-GFP (1:1000), soro anti-PrP^C 1:3000 e anti

Stub1/CHIP 1:2000. β -actina foi usada como controle de carregamento do gel de poliacrilamida.

TABELA 1 - ESQUEMA DE TRANSFECCÃO DE CÉLULAS HEK293T PARA ENSAIO DE DEGRADAÇÃO

	TRANSFECCÃO				
	1	2	3	4	5
pEGFP-PrP^C, pEGFP ou p3F4-PrP^C (μg)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
pMyc-CHIP (μg)	0,0	0,1	0,5	0,75	1,0
pMyc (μg)	1,0	0,9	0,5	0,25	0,0

A análise dos dados foi realizada por densitometria das bandas do *Western blotting*, através do software ImageJ®. A normalização das reações foi realizada com relação à intensidade das bandas de β -actina. Assim, pôde-se avaliar se há degradação de PrP^C por Stub1/CHIP, bem como o grau de degradação presente.

5.5.1.2 Segundo o protocolo de Yang *et al.*

Uma variável do teste de degradação de PrP^C foi realizado segundo o protocolo estabelecido por Yang (YANG *et al.*, 2013), e feitas algumas modificações. Células HEK293T foram cultivadas e co-transfectadas conforme o item 5.3, porém em placas de poliestireno de 60mm de diâmetro (Nest). Em cada placa, foram cultivadas 8×10^5 células HEK293T. As células foram então co-transfectadas em duas condições:

Condição 1: transfecção com 2 μ g de plasmídeo contendo PrP^C (pEGFP-PrP^C,) + 2 μ g de plasmídeo pcDNA-Myc vazio, como normalizador da quantidade total de DNA transfectada;

Condição 2: transfecção com 2 μ g de plasmídeo capaz de expressar PrP^C (pEGFP-PrP^C), + 2 μ g de plasmídeo contendo Stub1/CHIP (myc-Stub1).

Após a transfecção, as células foram cultivadas por mais 48 horas em estufa úmida a 37°C e 5% de tensão de CO₂. Após esse período, as células foram tratadas

com cicloheximida (Sigma-Aldrich), que é um inibidor de síntese proteica, na concentração 100 µg/mL. Os extratos celulares foram então obtidos nos tempos 0, 1, 2, 4 e 6 horas após o tratamento com a cicloheximida. (conforme o descrito no item 5.5.1.1). Esses tempos de coleta das placas para fazer extrato foram escolhidos levando em consideração que a meia vida para a degradação de uma molécula de PrP^C é de 3 a 6 horas (CHAKRABARTI *et al.*, 2009). As amostras foram então submetidas à SDS-PAGE e analisadas por *Western blotting* com o uso dos anticorpos anti-PrP^C 1:500, anti-Stub1/CHIP 1:2000 e anti-β-actina 1:4000, que foi utilizado como controle de carregamento do gel. Como no item anterior, a análise dos dados foi realizada por densitometria das bandas do *Western blotting*, através do software ImageJ®. A normalização das reações foi realizada com relação à intensidade das bandas de β-actina.

5.5.2 Ensaio para verificar a participação do sistema ubiquitina-proteossomo na degradação de PrP^C

5.5.2.1 Ensaio de inibição do proteossomo

Foram realizados dois protocolos, baseados no trabalho de Ding & Goldberg (2009), para investigar a extensão na qual a atividade do proteossomo é importante para a degradação de PrP^C na presença de Stub1/CHIP. No primeiro, 4x10⁵ células HEK 293T foram cultivadas em placas de 35mm (Nest), e co-transfectadas com plasmídeos capazes de expressar PrP^C (pEGFP-PrP^C) e Stub1/CHIP (myc-Stub1/CHIP), na quantidade total de 1,5 µg de plasmídeo, como indicado na Tabela 2 (transfecção realizada conforme item 5.3). Após 24 horas de expressão, as células foram tratadas com MG132 (Sigma-Aldrich), que é um inibidor de proteossomo, em concentrações que variaram de 0,1 a 5 µM (Tabela 2). As células foram então incubadas por mais 24 horas em incubadora úmida a 37°C e tensão de CO₂ de 5%. Após esse período, os extratos celulares foram obtidos através do protocolo descrito no item 5.5.1.1. Dado que o veículo do MG132 (Sigma-Aldrich) é dimetilsulfóxido

(DMSO), foi adicionado somente DMSO como controle negativos na placa 3. As amostras foram então submetidas à SDS-PAGE 12% e analisadas por *Western blotting*, através dos anticorpos anti-PrP^C 1:3000 e anti- β -actina 1:4000 (Sigma-Aldrich). Foi avaliada a abundância de PrP^C normalizada pela β actina.

TABELA 2 - ESQUEMA DE TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS HEK293T PARA ENSAIO DE UBIQUITINAÇÃO

	TRANSFEÇÃO						
	1	2	3	4	5	6	7
pGFP-PrP^C (μg)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
pMyc-CHIP(μg)	0,0	0,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
PcDNA-Myc(μg)	0,5	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MG132 (μM)	0,0	5,0	0,0	0,1	1,0	2,0	5,0

5.5.2.2 Ensaio de ubiquitinação

O segundo ensaio de ubiquitinação foi realizado da seguinte forma: células HEK293T foram cultivadas em placas de 100mm de diâmetro (Nest) e co-transfectadas com vetores capazes de expressar PrP^C (pEGFP-PrP^C) na quantidade de 6 μ g, e Stub1/CHIP (myc-Stub1/CHIP) também na quantidade de 6 μ g, seguindo o método descrito no item 5.3. Após 24 horas de expressão, as placas foram tratadas com MG132 (Sigma-Aldrich), na concentração final de 10 μ M e incubadas por mais 6 horas em estufa úmida a 37°C com tensão de CO₂ de 5%. Após esse período, os extratos celulares foram obtidos e submetidos à imunoprecipitação utilizando-se de proteína A/G sepharose ligada covalentemente à anti-PrP^C ou proteína A/G sepharose ligada covalentemente a soro pré-imune de camundongo (como descrito no item 5.4.2.2). As amostras imunoprecipitadas foram então submetidas à SDS-PAGE e a ubiquitinação de PrP^C foi avaliada em *Western blotting*, através da utilização de anticorpo anti-ubiquitina 1:1000.

5.6 INVESTIGAÇÃO DE STI1/HOP E HSP70 NA INTERAÇÃO ENTRE PRP^C E STUB1/CHIP

Para verificar o papel de STI1/Hop na interação entre PrP^C e Stub1/CHIP, foram realizados alguns dos ensaios citados acima, com a introdução de STI1/Hop. Assim, os ensaios de *pull down* e co-imunoprecipitação foram feitos conforme já descrito (itens 5.4.1 e 5.4.2.2) e tentou-se pesquisar a proteína STI1, utilizando-se de anticorpo específico anti-STI1 1:3000 e anti-Hsp70 1:1000, para verificar se esta faz parte do complexo proteico PrP^C-Stub1/CHIP.

5.7 ANÁLISE DE DADOS

Os experimentos realizados através de *Western blotting* tiveram seus resultados analisados através do padrão de bandas obtidos nos testes. Esses testes foram feitos, no mínimo, com um número amostral de 2 e, quando necessário, as bandas foram densitometradas através do *software* de imagem ImageJ® e plotadas em um gráfico para quantificação.

Quando cabível, a análise estatística mais apropriada foi realizada.

6 RESULTADOS

Como já mencionado, esse estudo teve início com um trabalho realizado anteriormente no laboratório de Neurobiologia pela aluna Ana Paula Lappas Gimenez, orientada pela Professora Doutora Adriana Frohlich Mercadante. Em seu mestrado, foram obtidos dez potenciais ligantes para PrP^C, através do sistema de duplo-híbrido em leveduras. Esses ligantes foram identificados através da varredura de uma biblioteca de cDNA de epitélio olfatório de camundongo (GIMENEZ, 2013). Dessas interações, a proteína Stub1/CHIP foi escolhida como foco do presente estudo, pela possibilidade de ter um papel crucial na degradação de PrP^C pelo sistema ubiquitina-proteossomo.

A primeira parte do presente trabalho foi dedicada à confirmação da interação entre PrP^C e Stub1/CHIP, visto que o sistema de duplo-híbrido em leveduras é um método de *screening* e, sendo assim, são recomendadas outras técnicas para corroborar com os resultados apontados por essa técnica (BRÜCKNER *et al*, 2009). Esses resultados fizeram parte do manuscrito intitulado “*Identification of novel binding proteins for cellular prion protein*”, o qual se encontra submetido (Apêndice 1).

Na segunda parte desse estudo, encontram-se os resultados relacionados à caracterização do papel da proteína Stub1/CHIP na estabilidade de PrP^C.

6.1 RESULTADOS OBTIDOS QUANTO À CONFIRMAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE PRP^C e STUB1/CHIP

6.1.1 Expressão de Stub1/CHIP em encéfalo e epitélio olfatório

Antes da realização dos ensaios de interação *in vitro* (*pull-down* e co-immunoprecipitação), foi necessário verificar a quantidade de Stub1/CHIP expressa em epitélio olfatório (OE), tecido da biblioteca usada para a varredura no sistema de duplo-híbrido (GIMENEZ, 2013) e encéfalo de camundongo, tecido que já é

conhecido por expressar Stub1/CHIP e PrP^C (BALLINGER *et al.*, 1999; Revisado por LINDEN *et al.*, 2008). A análise dessa expressão atestaria o uso de extratos proteicos desses tecidos como fonte de proteínas de interesse endógenas nos ensaios de ligação. Assim, foram realizadas análises por *Western blotting* em extratos proteicos preparados a partir desses tecidos. Como mostrado na Figura 4, há expressão de Stub1/CHIP em níveis similares em encéfalo e epitélio olfatório.

A



B

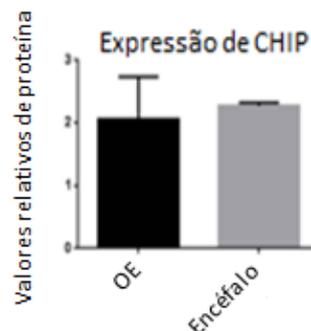


FIGURA 4 - Stub1/CHIP É EXPRESSA EM EPITÉLIO OLFATÓRIO (OE) E ENCÉFALO - (A) Extratos proteicos preparados a partir de encéfalo e epitélio olfatório de camundongo foram analisados por *Western blotting* com anticorpo anti-Stub1/CHIP (quadro superior). Anti- β -actina foi utilizado como controle de carregamento do gel (quadro inferior). (B) Valores relativos de proteína foram quantificados através do Software ImageJ® e normalizados com relação à β -actina. Os resultados são representativos de quatro experimentos independentes. A análise estatística foi conduzida através do programa GraphPad Prism (os valores são expressos como média \pm erro padrão. Teste t de Student foi utilizado para a análise estatística e $P < 0.05$ foi considerado significativo).

WB: *Western blotting*

FONTE: A AUTORA, 2014.

6.1.2 Pull-Down

Para confirmar a interação com PrP^C, realizou-se o ensaio de *pull-down*. Para tanto, His₆-PrP^C recombinante foi incubado com extrato de encéfalo de camundongo (usado como fonte de Stub1/CHIP endógena). Os complexos proteicos foram então sedimentados através da adição de resina de Ni-NTA-agarose. Análises de *Western blotting* foram realizadas e indicaram que Stub1/CHIP foi precipitado com PrP^C recombinante (Figura 5). Nenhuma reação foi observada quando o extrato foi incubado com a resina Ni-NTA-agarose sem adição de PrP^C. Este resultado, juntamente com os dados de duplo-híbrido (GIMENEZ, 1013), sugerem que a PrP^C pode interagir fisicamente com Stub1/CHIP.

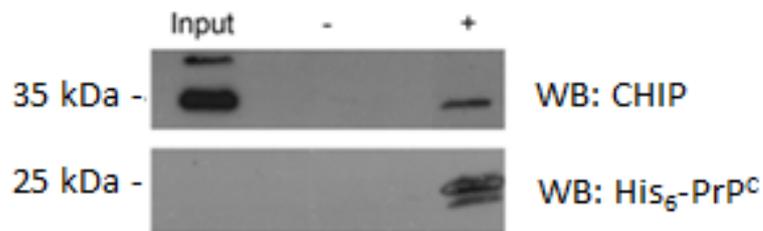


FIGURA 5 - INTERAÇÃO DE PRP^C COM STUB1/CHIP EM ENSAIO DE *PULL-DOWN* - Extrato de encéfalo de camundongo foi incubado com His₆-PrP^C e Ni-NTA-agarose (+) ou apenas com Ni-NTA-agarose (-). Análises de *Western blotting* foram feitas com anticorpo anti-Stub1/CHIP (painel superior). As membranas também foram reveladas com anticorpo anti-His-tag para confirmar a recuperação de PrP^C recombinante na resina (painel inferior).

WB: *Western blotting*

FONTE: A AUTORA, 2013.

A mesma membrana da figura 5 foi testada com anticorpo anti-Hsp70, por ser um já conhecido ligante de PrP. Embora no *Input* haja a presença da chaperona, no poço correspondente ao pull-down, não foi observada a presença de Hsp70 (Figura 6).

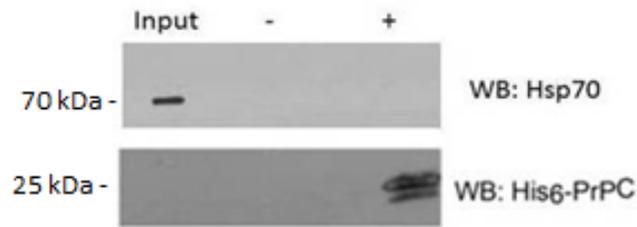


FIGURA 6 - INTERAÇÃO DE PRP^C COM HSP70 EM ENSAIOS DE *PULL-DOWN* - Encéfalo de camundongo foi incubado com his₆-prp^C e ni-nta-agarose (+) ou apenas com Ni-NTA-agarose (-). Análises de *Western blotting* foram feitas com anticorpo anti-Hsp70 (painel superior).

WB: *Western blotting*

FONTE: A AUTORA, 2014.

Ainda insistindo na mesma membrana de *pull-down*, foi feito um teste com o anticorpo anti-STI1. Porém, não foi possível obter bandas de *Western blotting* referentes à STI1 no ensaio, nem mesmo no poço referente ao *Input* (dado não mostrado).

6.1.3 Co-Imunoprecipitação

6.1.3.1 Avaliação da eficiência do *cross-linking*

Vários protocolos de imunoprecipitação foram testados para obter a co-precipitação de PrP^C e Stub1/CHIP. Após diversas tentativas, padronizou-se o método no qual é utilizado o anticorpo de interesse covalentemente ligado à proteína A/G sepharose, através de um agente *crosslinker*, DMP (ver detalhes do método no item 5.4.2.1). Para avaliar a eficiência da reação de ligação covalente do anticorpo à proteína A/G sepharose através do DMP, realizou-se um teste através da comparação da intensidade da banda dos controles não ligados com os controles ligados. Os dois primeiros poços são referentes aos controles não ligados. Em ambos, percebe-se uma banda de aproximadamente 55kDa, correspondente à cadeia pesada de imunoglobulina. Como os anticorpos não estavam ligados covalentemente à matriz, puderam ser eluídos da mesma pelo tampão de amostra e

aquecimento a 100°C. No terceiro e quarto poços, há amostras dos controles ligados, após o *cross-linking*. Não se detectam bandas, provando que os anticorpos foram covalentemente ligados à matriz, e por isso, não puderam ser eluídos pelo tampão de amostra e aquecimento a 100°C.

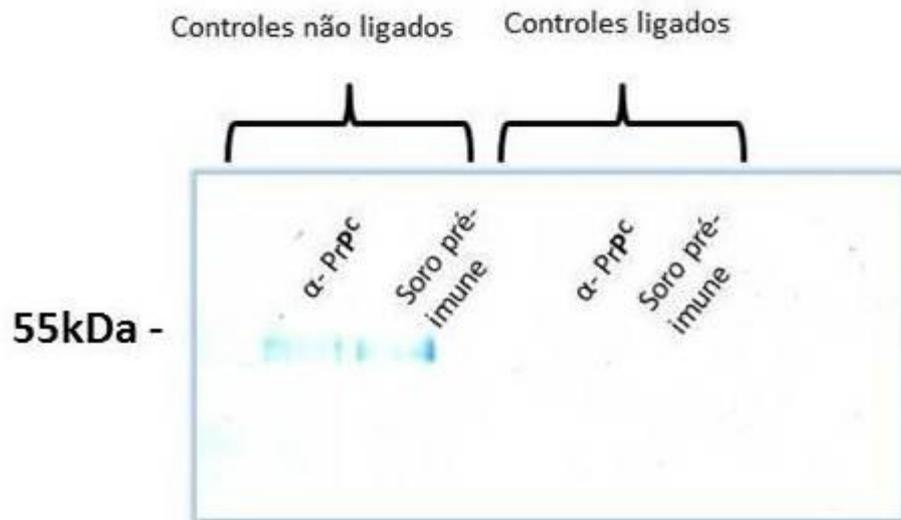


FIGURA 7 - EFICIÊNCIA DA LIGAÇÃO COVALENTE EM PROTEÍNA A/G SEPHAROSE - Controles não ligados (antes do tratamento com DMP) da proteína A/G sepharose incubada com soro pré-imune ou anticorpo anti-PrP^C e controles ligados (após o tratamento com DMP) das mesmas condições foram submetidos à SDS-PAGE e corados com azul de Coomassie.

FONTE: A AUTORA, 2014.

6.1.3.2 Co-immunoprecipitação de PrP^C e Stub1/CHIP a partir de extrato de células HEK293T co-transfectadas

O primeiro teste de co-immunoprecipitação foi realizado com extrato de células HEK293T co-transfectadas com pEGFP-PrP^C e pMyc-Stub1/CHIP. Esses extratos foram imunoprecipitados com anticorpo anti-PrP^C ou soro pré-imune de camundongo. As proteínas co-precipitadas foram analisadas utilizando-se anticorpo anti-Stub1/CHIP e anticorpo anti-PrP^C, para confirmar sua imunoprecipitação. Nenhuma reação foi observada quando os extratos foram incubados com resina ligada covalentemente ao soro pré-imune de camundongo. Os resultados mostrados

nas figuras 8 e 9, juntamente com o resultado de pull-down, indicam mais uma vez a existência da interação PrP^C-Stub1/CHIP.

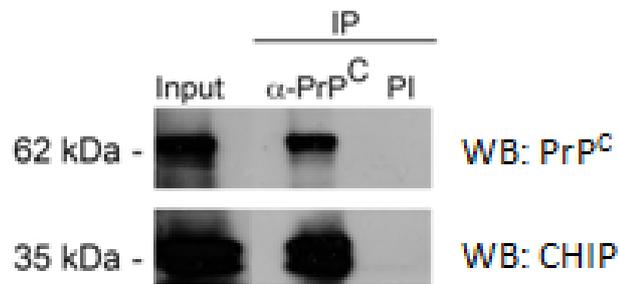


FIGURA 8 - PRP^C INTERAGE COM STUB1/CHIP EM ENSAIO DE CO-IP A PARTIR DE EXTRATO DE HEK293T - Extratos proteicos de células co-transfectadas com GFP-PrP^C e myc-Stub1/CHIP foram imunoprecipitados com anticorpo anti-PrP^C ou soro pré-imune de camundongo (PI). As proteínas co-precipitadas foram analisadas utilizando-se anticorpo anti-Stub1/CHIP (painel inferior). A mesma membrana foi retestada com anticorpo anti-PrP^C (painel superior) para confirmar que PrP^C foi precipitado na reação de IP.

WB: *Western blotting*

FONTE: A AUTORA, 2014.

6.1.3.3 Co-imunoprecipitação de PrP^C e Stub1/CHIP a partir de extrato de epitélio olfatório de camundongo

O segundo teste de co-imunoprecipitação foi realizado com extrato de epitélio olfatório de camundongo, como fonte endógena das proteínas estudadas. Observa-se na figura 9 a imunoprecipitação de PrP^C (parte superior da figura), e a co-imunoprecipitação de Stub1/CHIP (parte inferior da figura). Os resultados mostrados nas figuras 8 e 9, juntamente com o resultado de *pull-down*, indicam mais uma vez a existência da interação PrP^C-Stub1/CHIP.

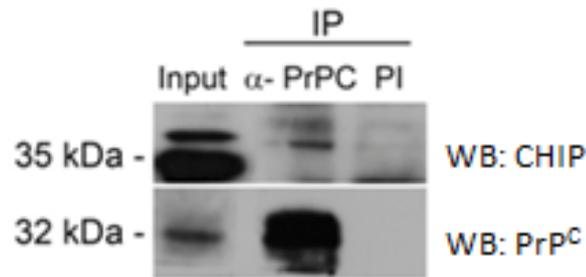


FIGURA 9 - PRP^C INTERAGE COM STUB1/CHIP EM ENSAIO DE CO-IP A PARTIR DE EXTRATO DE EPITÉLIO OLFATÓRIO - Extratos proteicos de epitélio olfatório de camundongo foram imunoprecipitados com anticorpo anti-PrP^C ou soro pré-imune de camundongo (PI). As proteínas co-precipitadas foram analisadas utilizando-se anticorpo anti-Stub1/CHIP (painel superior). A mesma membrana foi retestada com anticorpo anti-PrP^C (painel inferior) para confirmar que PrP^C foi precipitado na reação de IP.

WB: *Western blotting*

FONTE: A AUTORA, 2014.

6.1.3.4 Co-imunoprecipitação de PrP e Hsp70

As membranas que apresentaram co-imunoprecipitação de PrP^C e Stub1/CHIP foram submetidas a testes com anticorpo anti-Hsp70, na tentativa de captar essa chaperona no complexo proteico, já que esta é um ligante conhecido de PrP (ZHANG *et al.*, 2012). Como pode ser observado na figura 10, não foi possível co-imunoprecipitar Hsp70, apesar da presença da proteína no *Input* (extrato bruto).

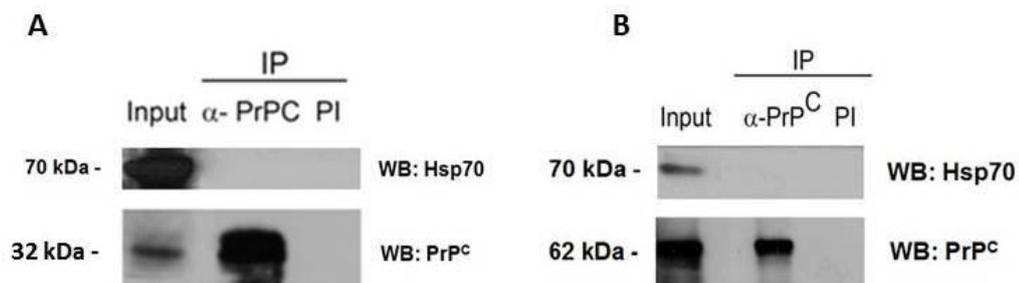


FIGURA 10 - TENTATIVA DE CO-IP ENTRE PRP^C E HSP70 - Extratos proteicos de epitélio olfatório de camundongo (A) ou de células HEK293T co-transfectadas com GFP-PrP^C e myc-Stub1/CHIP (B) foram imunoprecipitados com anticorpo anti-PrP^C ou soro pré-imune de camundongo (PI). As proteínas co-precipitadas foram analisadas utilizando-se anticorpo anti-Hsp70 (painel superior). A mesma membrana foi retestada com anticorpo anti-PrP^C (painel inferior) para confirmar que PrP^C foi precipitado na reação de IP.

WB: *Western blotting*

FONTE: A AUTORA, 2015.

6.1.3.5 Co-imunoprecipitação de PrP^C e STI1

As mesmas membranas acima também foram submetidas a testes com anticorpo anti-STI1, na tentativa de captar essa proteína no complexo proteico, já que esta é um ligante conhecido de PrP^C (ZANATA *et al.*, 2002). Nessas condições, não se conseguiu detectar a co-imunoprecipitação de PrP^C e STI1.

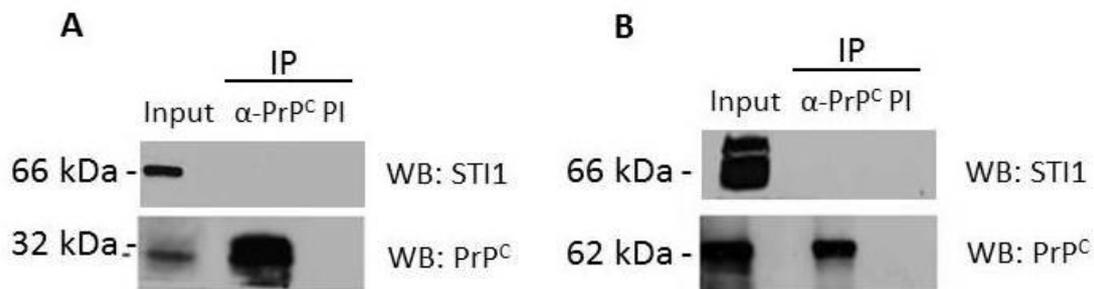


FIGURA 11 - TENTATIVA DE CO-IP ENTRE PRP^C E STI1 - Extratos proteicos de epitélio olfatório de camundongo (A) ou de células HEK293T co-transfectadas com GFP-PrP^C e myc-Stub1/CHIP (B) foram imunoprecipitados com anticorpo anti-PrP^C ou soro pré-imune de camundongo (PI). As proteínas co-precipitadas foram analisadas utilizando-se anticorpo anti-STI1 (painel superior). A mesma membrana foi retestada com anticorpo anti-PrP^C (painel inferior) para confirmar que PrP^C foi precipitado na reação de IP.

WB: *Western blotting*

FONTE: A AUTORA, 2015.

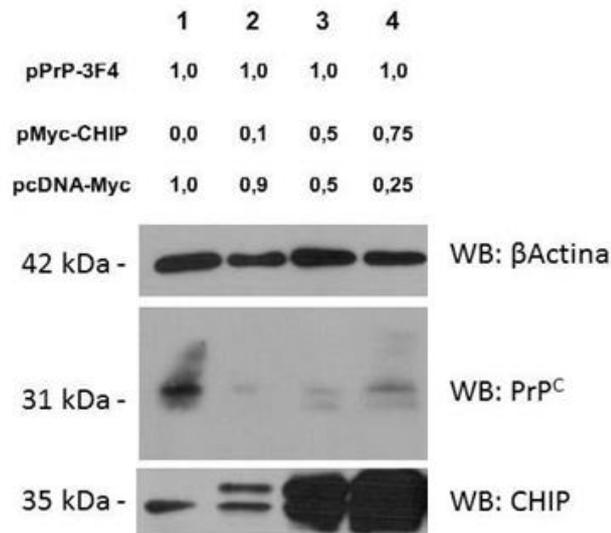
6.2 RESULTADOS OBTIDOS QUANTO À AVALIAÇÃO DO PAPEL DE STUB1/CHIP NA ESTABILIDADE/DEGRADAÇÃO DE PrP

6.2.1 Papel de Stub1/CHIP na degradação de PrP^C

Para testar a hipótese de que PrP^C poderia ser degradada por Stub1/CHIP, realizou-se um ensaio de degradação, como descrito por Ding & Goldberg (2009). Tanto a figura 12A quanto a 13A mostram que PrP^C é degradado por Stub1/CHIP em algumas concentrações, mas não de maneira totalmente dose-dependente.

6.2.1.1 Experimento com 3F4- PrP^C e myc-Stub1/CHIP

A



B

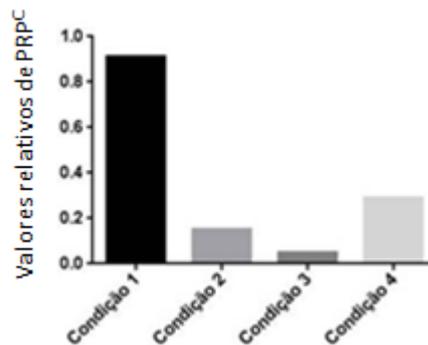


FIGURA 12 - STUB1/CHIP PROMOVE A DEGRADAÇÃO DE 3F4-PRP^C - (A) 1,0 μ g de p3F4-PrP^C foi co-transfectado com 0,0; 0,1; 0,5 e 0,75 μ g de pMyc-CHIP em placas de 35mm de diâmetro contendo 4x10⁵ células HEK293T. O vetor vazio pcDNA-Myc foi utilizado para normalizar o total de DNA em cada transfecção. As quantidades dos vetores transfectados estão indicadas para quatro condições diferentes na parte superior das figuras. Após 48 horas de incubação, quantidades iguais de lisados das células foram submetidas à SDS-PAGE e análise por *Western blotting* com os anticorpos anti-PrP^C, anti-Stub1 e Anti- β -actina. (B) Valores relativos de proteína foram quantificados através do SoftwareImageJ® e normalizados com relação à β -actina. Os resultados são representativos da média de dois experimentos independentes.

WB: Western blotting

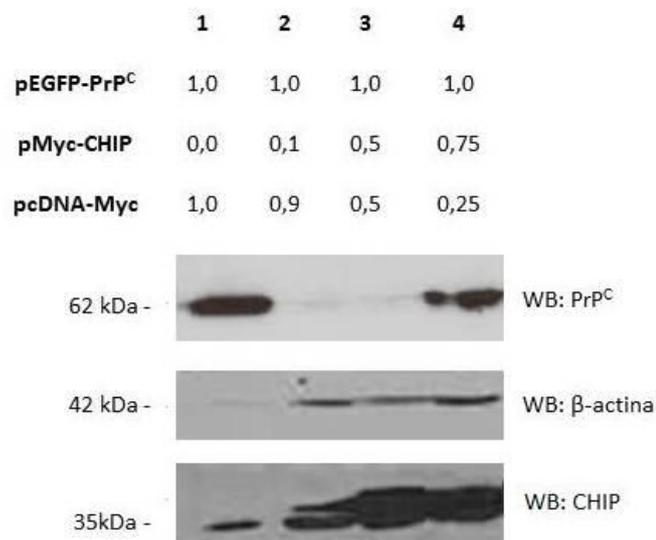
FONTE: A AUTORA, 2015.

Para 3F4-PrP^C, nas quantidades do vetor de expressão referente à Stub1/CHIP (0,1 μ g e 0,5 μ g) observou-se uma maior degradação de PrP^C. Na

concentração de 0,75 μ g, a degradação foi menos acentuada. Na figura 12A, é possível observar na parte inferior da figura tanto a expressão endógena de CHIP (35 kDa) quanto a proteína superexpressa (40 kDa), esta última em quantidades crescentes.

6.2.1.2 Experimento com GFP- PrP^C e myc-CHIP

A



B

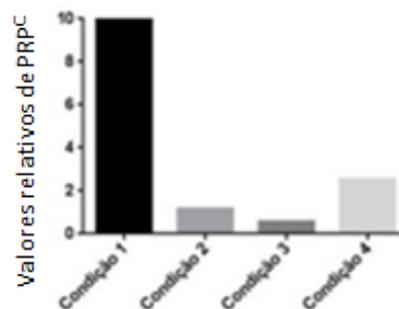


FIGURA 13 - STUB1/CHIP PROMOVE A DEGRADAÇÃO DE GFP-PRP^C (A) 1,0 μ g de pGFP-PrP^C foi co-transfectado com 0,0; 0,1; 0,5 e 0,75 μ g de pMyc-CHIP em placas de 35mm de diâmetro contendo 4x10⁵ células HEK293T. O vetor vazio pcDNA-Myc foi utilizado para normalizar o total de DNA em cada transfecção. As quantidades dos vetores transfectados estão indicadas para quatro condições diferentes na parte superior das figuras. Após 48 horas de incubação, quantidades iguais de lisados das células foram submetidas à SDS-PAGE e análise por *Western blotting* com os anticorpos anti-PrP^C, anti-Stub1 e Anti-β-actina.(B) Valores relativos de proteína foram quantificados através do SoftwareImageJ® e normalizados com relação à β-actina. Os resultados são representativos da média de dois experimentos independentes.

WB: *Western blotting*

FONTE: A AUTORA, 2014.

Para GFP- PrP^C, nas menores quantidades do vetor de expressão referente à Stub1/CHIP (0,1 e 0,5 µg) observou-se uma degradação quase total de GFP-PrP^C. Na concentração referente a 0,75 µg, a degradação foi bem menos evidente. Apesar de a banda de β-actina ter sido de intensidade consideravelmente menor na condição 1, isso favorece o indicativo da expressão real de PrP^C nessa condição ter sido ainda maior.

6.2.1.3 Experimento com pGFP e myc-Stub1/CHIP

Da mesma forma, esse ensaio foi realizado cotransfectando-se células HEK293T com uma quantidade fixa do vetor de expressão para GFP e quantidades crescentes do plasmídeo para expressão de myc-Stub1/CHIP (Figura 14). O vetor vazio correspondente (pCDNA-Myc) foi usado para normalizar as quantidades de DNA total transfetado. Conforme observado na figura, GFP não sofre nenhuma degradação na presença de Stub1/CHIP, confirmando que a reação observada para PrP^C é específica.

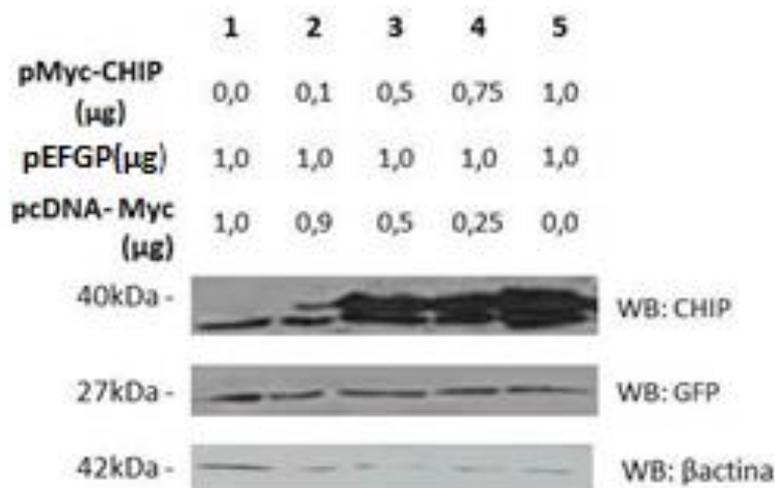


FIGURA 14 - STUB1/CHIP NÃO PROMOVE A DEGRADAÇÃO DE pEGFP 1,0µg de pEGFP foi co-transfectado com 0,0; 0,1; 0,5; 0,75 e 1,0 µg de pMyc-CHIP em placas de 35mm de diâmetro contendo 4×10^5 células HEK293T. O vetor vazio pcDNA-Myc foi utilizado para normalizar o total de DNA em cada transfecção. As quantidades dos vetores transfetados estão indicadas para cinco condições diferentes na parte superior das figuras. Após 48 horas de incubação, quantidades iguais de lisados das células foram submetidas à SDS-PAGE e análise por *Western blotting* com os anticorpos anti-GFP, anti-Stub1/CHIP e Anti-β-actina.

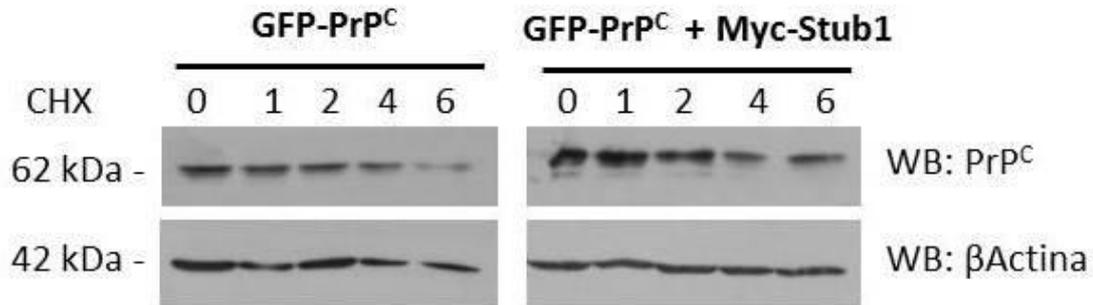
WB: *Western blotting*

FONTE: A AUTORA, 2014.

6.2.2 Experimentos com Cicloheximida

No intuito de analisar a cinética de degradação de PrP^C, foi realizado um experimento cotransfectando-se células HEK293T com pGFP-PrP^C e pMyc-Stub1/CHIP e avaliando-se a degradação de PrP^C após tratamento das células com cicloheximida (inibidor da tradução de proteínas) em diferentes tempos. Observando-se a figura 15B, no tempo 4 horas, a degradação de PrP^C foi mais acentuada na condição 2 (onde há co-transfecção de PrP^C e Stub1/CHIP), se comparada ao mesmo tempo, onde não há superexpressão de Stub1/CHIP. No tempo 6 horas, há estabilização nos níveis de proteína na condição de co-transfecção de PrP^C e Stub1/CHIP, enquanto há queda na quantidade de proteína expressa na condição de superexpressão somente de PrP^C.

A



B

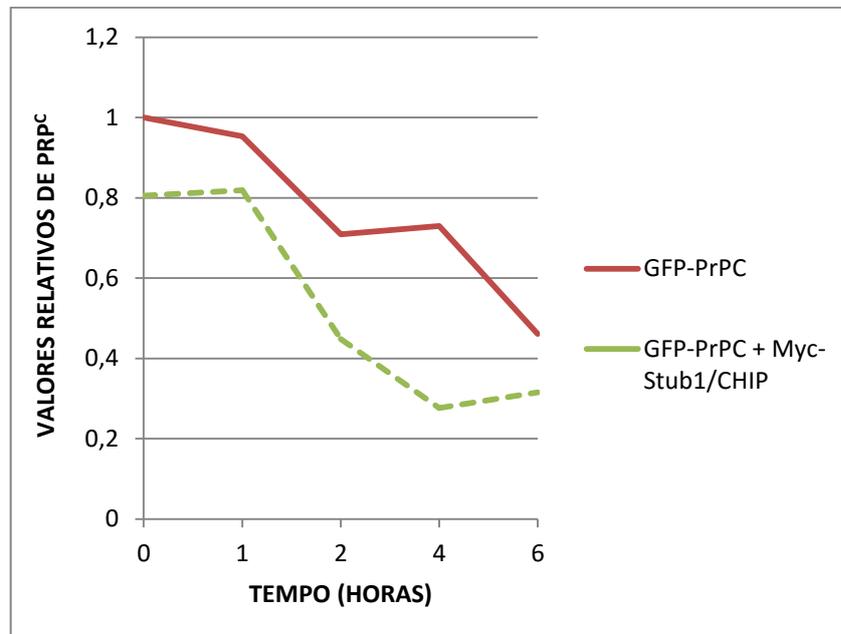


FIGURA 15 - AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE PRP^C (A) 8,0µg de pEGFP foram transfectados (GFP-PrP^C) ou co-transfectados com 4,0µg de pMyc-Stub1/CHIP em placas de 35mm de diâmetro contendo 4x10⁵ células HEK293T. O vetor vazio pcDNA-Myc foi utilizado para normalizar o total de DNA em cada transfecção. Após 48 horas de incubação, as células foram tratadas com cicloheximida (CHX) e extratos celulares foram feitos nos tempos indicados na parte superior da figura. Os lisados das células foram submetidos à SDS-PAGE e análise por *Western blotting* com os anticorpos anti- PrP^C e anti-Stub1/CHIP. β-Actina foi utilizada como controle de carregamento do gel. (B) Valores relativos de proteína foram quantificados através do Software ImageJ® e normalizados com relação à β-actina.

WB: *Western blotting*

FONTE: A AUTORA, 2014.

6.2.3 Verificação do envolvimento da via ubiquitina-proteossomo na degradação de PrP^C por Stub/CHIP

Para avaliar a participação direta de Stub1/CHIP na degradação de PrP^C, foram realizados ensaios de ubiquitinação em células HEK293T em duas condições (itens 6.2.3.1 e 6.2.3.2)

6.2.3.1 Inibição do proteossomo

Células HEK293T foram co-transfectadas com pEGFP-PrP^C e pcDNA-Myc ou com pMyc-Stub1/CHIP como indicado na figura 16, e seu comportamento frente à inibição do proteossomo através de MG132 foi avaliado. Além das bandas de superexpressão de PrP^C (62kDa), também foi possível avaliar a expressão da proteína endógena (~32kDa), nas suas três formas de glicosilação, representadas por três bandas. Com base na figura 16, podemos observar um aumento dose-dependente de MG132 (de 0,1 a 2,0 μ M) no acúmulo de PrP^C nas células do-transfectadas com GFP-PrP^C e Myc-Stub1/CHIP. O acúmulo de PrP^C no tratamento com 2,0 μ M de MG132 (coluna 6 da figura 16) quando as células foram transfectadas com Stub1/CHIP (comparar colunas 3 e 6) é maior do que o acúmulo observado na ausência de Stub1/CHIP (comparar colunas 1 e 2). Ainda, houve um aumento dose dependente de MG132 na abundância de PrP^C nas células que foram co-transfectadas com GFP-PrP^C e Myc-Stub1/CHIP (de 0,1 a 2,0 μ M). No poço 7, onde há co-transfecção de GFP-PrP^C Myc-Stub1/CHIP e tratamento das células com 5,0 μ g de MG132, o acúmulo observado referente a PrP^C é reduzido, não seguindo o padrão dose-dependente de MG132.

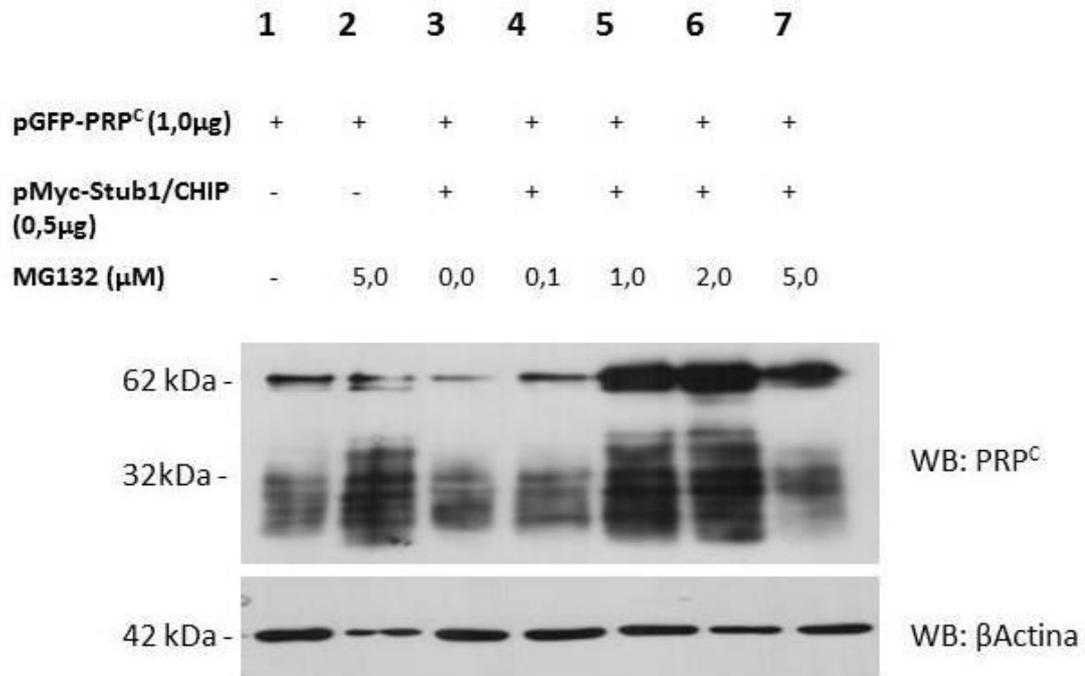


FIGURA 16 - NÍVEIS DE PRP^C SÃO CONTROLADOS ATRAVÉS DO SISTEMA UBIQUITINA-PROTEOSSOMO. 1,0µg de GFP-PrP^C FOI CO-TRANSFECTADO COM 0,5µg de Myc-CHIP ou 0,5µg pcDNA-Myc em placas de 35mm de diâmetro contendo $4 \cdot 10^5$ células HEK293T. As quantidades dos vetores transfetados e de MG132 estão indicadas para sete condições diferentes na parte superior da figura. Após 24 horas, MG132 foi adicionado na concentração indicada. Foi adicionado DMSO como controle negativo em na terceira condição. As células foram incubadas por mais 24 horas, e os extratos celulares testados com anticorpos anti-PrP^C e anti-βactina.

WB: *Western blotting*

FONTE: A AUTORA, 2015.

6.2.3.2 Inibição do proteossomo e co-IP

Células HEK293T foram co-transfectadas com pGFP-PrP^C e pcDNA-Myc ou com pMyc-Stub1/CHIP como indicado na figura 17, e co-imunoprecipitadas, para avaliar o grau de ubiquitinação de PrP^C na presença de Stub1/CHIP. Apesar de ter havido imunoprecipitação de PrP^C (parte superior da figura 17), a quantidade imunoprecipitada é diferente das duas condições de transfecção. Assim, não foi possível avaliar o padrão de ubiquitinação de PrP^C, comparando-se ausência e presença de Stub1/CHIP superexpressa.

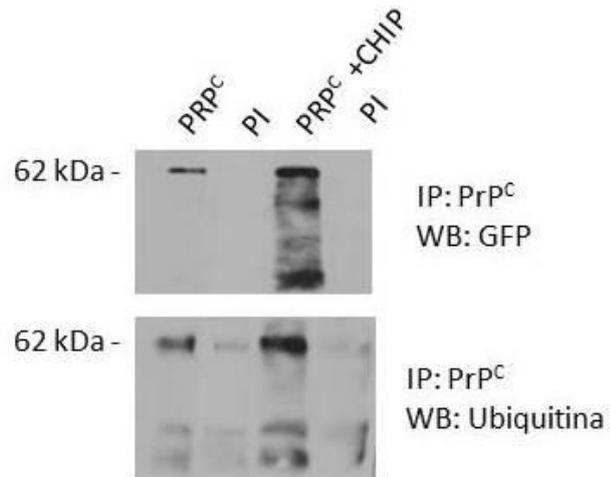


FIGURA 17 - ENSAIO DE UBIQUITINAÇÃO - Células HEK293T foram transfectadas com pEGFP-PrP^C (PrP^C) ou co-transfectadas com pEGFP-PrP^C e pMyc-CHIP (PRP^C + CHIP) e imunoprecipitadas com anticorpo anti- PrP^C ou soro pré-imune de camundongo (PI) e submetidas à análise por *Western blotting* com o anticorpo anti-ubiquitina (painel inferior). A mesma membrana também foi testada com anticorpo anti-GFP (painel superior) para confirmar que PrP^C foi precipitado na reação de IP.

WB: *Western blotting*

FONTE: A AUTORA, 2015.

7 DISCUSSÃO

7.1 CONFIRMAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE PRP^C E STUB1/CHIP

O primeiro objetivo desse estudo foi confirmar a interação entre PrP^C e Stub1/CHIP, na tentativa de reforçar os dados achados pelo sistema de duplo-híbrido em leveduras, do estudo anterior do nosso grupo. Previamente à confirmação da interação, foi feito um experimento para avaliar a expressão da proteína Stub1/CHIP em encéfalo e epitélio olfatório de camundongo. Como pode ser observado na figura 4, não há diferença significativa na expressão dessa proteína nos dois tecidos avaliados. Extratos proteicos desses tecidos puderam então ser usados como fonte de PrP^C e Stub1/CHIP endógenas nos ensaios de *pull-down* e Co-IP, métodos escolhidos para a confirmação da interação.

Como visto nas figuras 5, 8 e 9, referentes aos ensaios de *pull down* e Co-IP, a interação entre PrP^C e Stub1/CHIP foi confirmada através desses dois sistemas, tanto em extrato de encéfalo (*pull-down*), quanto em extrato de epitélio olfatório e extrato de células HEK293T co-transfectadas (co-IP), comprovando assim a ligação entre essas duas proteínas tanto em situação de superexpressão, quando endogenamente. A interação entre PrP^C e Stub1/CHIP poderia ser questionada, devido a localização celular dessas duas proteínas, sendo que PrP^C está, em sua maior parte, ancorada na membrana através de uma molécula de GPI (BENDHEIM *et al.*, 1992), e Stub1/CHIP é uma proteína citosólica (BALLINGER *et al.*, 1999; DICKEY *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2014). Porém, essa interação é consistente com a proposta que considera PrP^C como parte de um complexo multiproteico que está envolvido na modulação de várias funções celulares (Revisado por LINDEN *et al.*, 2008). Inclusive, outras proteínas citoplasmáticas foram identificadas como ligantes de PrP. Algumas delas têm função de neuroproteção, incluindo a proteína anti-apoptótica Bcl-2 (KURSCHNER *et al.*, 1995) e o homólogo de MAGE que interage com o receptor de neurotrofina (NRAGE) (BRAGASON *et al.*, 1995).

Como mencionado na revisão bibliográfica desse estudo, Restelli e colaboradores indicaram que moléculas de PrP que não foram translocadas para o retículo endoplasmático foram associadas com um aumento da resistência à

apoptose em células corticais e hipocámpais, sugerindo que essa forma de PrP citoplasmático teria uma função neuroprotetora (RESELLI *et al.*, 2010). Por outro lado, o estudo realizado por Miesbauer (MIESBAUER *et al.*, 2010) mostrou que moléculas de PrP citoplasmático poderiam adquirir um potencial neurotóxico. Efeitos citotóxicos de PrP citoplasmático foram observados em várias linhagens de células de mamíferos e outros modelos animais. Assim, as interações entre PrP^C e Stub1/CHIP no presente estudo podem ter um papel fisiológico no citosol, ou ainda participar na indução de PrP^{Sc}, sendo assim um alvo potencial no tratamento de TSEs.

De acordo com a proposta de cooperação entre as co-chaperonas CHIP e STI1 publicada por Muller *et al.* (2013) na modulação da estabilidade de proteínas clientes de Hsp70/90, procurou-se avaliar neste trabalho se esta regulação seria possível no contexto de PrP^C, já que esta é ligante de Stub1/CHIP, STI1 e Hsp70 (ZANATA *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2012). Assim, foram realizados testes com anticorpos anti-STI1 e anti Hsp70 nos ensaios de interação proteica. Tanto nos testes de *pull-down* e co-imunoprecipitação, não foi possível detectar STI1 e Hsp70 nas amostras testadas, apesar de as mesmas estarem presentes na maior parte dos extratos brutos, nas mesmas membranas (Figuras 6, 10 e 11). A não visualização das bandas correspondentes a essas proteínas nos testes de *pull-down* e imunoprecipitação pode ser devido aos protocolos utilizados para esses ensaios, pois cada proteína comporta-se de uma maneira. Foi necessário um longo tempo na padronização dos protocolos de co-imunoprecipitação, por exemplo, para que a interação entre PrP^C e Stub1/CHIP fosse bem sucedida. Portanto, no futuro, serão feitos ajustes nos ensaios, como mudança de matriz utilizada, numa tentativa de detectar essas duas proteínas no mesmo complexo proteico onde estão presentes PrP^C e Stub1/CHIP.

7.2 CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE PRP^C E STUB1/CHIP

A segunda parte desse estudo teve como maior objetivo caracterizar a interação já confirmada entre PrP^C e Stub1/CHIP, na tentativa de avaliar o papel de Stub1/CHIP na modulação de estabilidade de PrP^C.

7.2.1 Ensaio de degradação de PrP^C

Analisando-se as figuras (12A e 13A), nota-se a clara degradação de PrP^C na presença de Stub1/CHIP. Esse resultado é coerente, levando-se em consideração a natureza das duas proteínas estudadas, sendo uma passível de degradação via ubiquitina-proteossomo, e a outra sendo uma E3-ligase marcadora de degradação proteossomal. Apesar de PrP^C já ter sido identificada como substrato para a ubiquitina-ligase gp78, nada impede que outra proteína exerça a mesma função. Pode haver um mecanismo de cooperação entre gp78 e Stub1/CHIP, ou ainda, Stub1/CHIP pode ser um controle de degradação alternativo à gp78 (MORISHIMA *et al.*, 2008; ; PARBACUS *et al.*, 2009; LOVE *et al.*, 2012).

Curiosamente, a degradação observada não é dose-dependente. De alguma forma, a expressão de PrP^C é recuperada, onde há maiores concentrações de CHIP na célula. Os trabalhos realizados por Ronnebaum e colaboradores e McDonough e colaboradores (MCDONOUGH *et al.*, 2009; RONNEBAUM *et al.*, 2013) podem ajudar a explicar esse fato, já que nos estudos citados, Stub1/CHIP faz uma ubiquitinação não-canônica de suas proteínas clientes, SirT6 e Daxx, respectivamente. No trabalho de Ronnebaum, Stub1/CHIP pode ubiquitinar e estabilizar a proteína SirT6, protegendo-a de degradação proteossomal mediada por outra ubiquitina-ligase, fazendo com que SirT6 continue exercendo suas funções fisiológicas. Inclusive, os autores apontam para a hipótese de um mecanismo indireto de proteção, no qual Stub1/CHIP degrada outra E3-ligase que ubiquitinaria SirT6 na ausência de Stub1/CHIP, mostrando que a degradação proteossomal nem sempre é o desfecho provocado pela ubiquitinação por Stub1/CHIP. Da mesma

forma, a interação entre PrP^C e Stub1/CHIP poderia seguir essa mesma linha: ultrapassando-se uma concentração de Stub1/CHIP na célula onde se observa degradação, poderia haver uma mudança na função de Stub1/CHIP com relação à PrP^C. Nesse ponto, Stub1/CHIP passaria a degradar gp78, evitando a degradação de PrP^C por essa ubiquitina ligase já conhecida (SHAO *et al.*, 2014). Essa hipótese pode ser um mecanismo regulatório da célula, para evitar que proteínas que estejam exercendo sua função normal sejam indevidamente degradadas.

Utilizando-se do mesmo protocolo, células HEK293T foram co-transfectadas com pEGFP vazio e pMyc-Stub1/CHIP, para avaliar a especificidade da degradação provocada por Stub1/CHIP. Analisando-se a figura 14A, a quantidade de GFP manteve-se constante, verificado pela intensidade das bandas de GFP no *Western blotting*, mesmo com a concentração crescente de Stub1/CHIP. Portanto, a ação de Stub1/CHIP direciona-se especificamente a PrP^C neste contexto.

Ainda com relação à degradação, observa-se na figura 15 a cinética de degradação de PrP^C. Esperava-se que, com a superexpressão concomitante de PrP^C e Stub1/CHIP nas células HEK293T, houvesse uma degradação mais rápida do que quando somente PrP^C fosse superexpressa, na ausência de Stub1/CHIP. De fato, observa-se que, já no tempo inicial (0 hora), há menor quantidade PrP^C nas células que foram co-transfectadas com GFP-PrP^C Stub1/CHIP. No tempo 4 horas, observa-se uma queda acentuada na quantidade de PrP^C presente na mesma amostra, se comparadas às que superexpressaram somente GFP-PrP^C. Esse fato indica que a presença de Stub1/CHIP provoca uma degradação de PrP^C mais rápida do que numa situação onde esta esteja ausente, indicando um papel importante de Stub1/CHIP no controle de qualidade de PrP^C. No tempo 6 horas, na condição onde há co-transfecção de GFP-PrP^C e Stub1/CHIP, há um pequeno aumento aparente na quantidade de PrP^C na amostra testada. Uma possível explicação é a capacidade de Stub1/CHIP de provocar ubiquitinações não canônicas em seus substratos que não levam à degradação pelo proteossomo, como já comentado anteriormente (MCDONOUGH *et al.*, 2009; RONNEBAUM *et al.*, 2013). Por último, não se observa degradação total de PrP^C em 6 horas, possivelmente por estar se tratando de uma situação de superexpressão proteica, que pode não seguir os mesmos padrões endógenos.

Apesar de sugerir um papel de Stub1/CHIP na degradação de PrP^C, esse ensaio deveria ser combinado com o uso de RNA de interferência para Stub1/CHIP,

para uma melhor avaliação da cinética de degradação de PrP^C. Isto porque, endogenamente, as células HEK293T expressam uma quantidade considerável de Stub1/CHIP e, a proteína endógena também estaria atuando na degradação de PrP^C, atrapalhando a análise dos resultados.

Outra diferença está nas formas de PrP^C encontradas normalmente nas células (mono, di e não glicosilada). Alguns trabalhos, como o de Shao e colaboradores, conseguem isolar e usar somente uma forma de PrP^C. Neste caso, o autor consegue mostrar que a degradação da proteína príon pela ubiquitina-ligase gp78 é direcionada principalmente à forma não glicosilada da molécula (SHAO *et al.*, 2014). No nosso trabalho, não há separação das formas de PrP quanto às suas glicosilações. Assim, os resultados observados são relativos a uma mistura de PrP mono, di e não glicosilado. Se a ação de Stub1/CHIP está direcionada a somente uma das formas da proteína, esse dado é mascarado, devido a presença das três formas de PrP juntas nos ensaios.

É sabido que o número de glicosilações das moléculas de PrP está relacionado à maturidade da proteína (ERMONVAL *et al.*, 2003). Assim, enquanto moléculas mais jovens estão menos glicosiladas e presentes no citosol, moléculas mais maduras possuem maior número de glicosilações e estão presentes na membrana celular. Quando a tradução proteica na célula é interrompida pela cicloheximida, as moléculas tendem à maturação. Sendo assim, ao final das 6 horas, possivelmente há na amostra analisada moléculas de PrP^C totalmente processadas, com maior número de glicosilações e ancoradas na membrana celular. Assim, poucas moléculas de GFP-PrP^C estariam no citosol, passíveis de serem degradadas por Stub1/CHIP. Uma forma de contornar esse problema é usar no ensaio somente moléculas não glicosiladas de PrP^C, através da expressão de mutantes de PrP^C que não seriam glicosilados, por exemplo. Essa possibilidade será estudada em um futuro próximo.

Juntos, os dados apontados pelos ensaios de degradação sugerem que PrP^C seja degradada por Stub1/CHIP de uma forma não totalmente dose-dependente, e a regulação e caracterização da interação Stub1/CHIP serão estudadas com mais profundidade em nosso grupo, na continuação desse projeto.

7.2.2 Ensaios de ubiquitinação de PrP^C

O primeiro experimento realizado evidenciou a participação do sistema ubiquitina-proteossomo na degradação de PrP^C, pois em face de uma inibição do proteossomo através do tratamento de células HEK293T co-transfectadas com o reagente MG132, há estabilização de PrP^C, tanto na forma superexpressa (~62kDa) quanto na sua forma endógena (~32kDa) como o observado na figura 16. Esses dados corroboram com dados já publicados previamente (MA & LINDQUIST, 2001; YEDIDIA *et al.*, 2001). Com base nessa figura, podemos observar um aumento dose dependente de MG132 na abundância de PrP^C nas células que foram co-transfectadas com GFP-PrP^C e Myc-Stub1/CHIP (de 0,1 a 2,0 μ M). Pode-se ainda observar que o tratamento das células com 2,0 μ g de MG132 consegue bloquear grande parte da degradação de PrP^C em células co-transfectadas com GFP-PrP^C e Myc-Stub1/CHIP (indicado pela intensidade da banda na coluna 6), se comparado à condição controle (coluna 3). Além disso, esse acúmulo é maior do que quando se compara as colunas 1 e 2, onde há ausência de Stub1/CHIP), indicando um envolvimento de Stub1/CHIP na degradação de PrP^C via ubiquitina-proteossomo. Interessante é observar que no poço 7, onde há co-transfecção de GFP-PrP^C Myc-Stub1/CHIP e tratamento das células com 5,0 μ g de MG132, o acúmulo observado referente a PrP^C não segue o mesmo padrão do indicado nas colunas 3-6. Esse fato pode indicar uma saturação da reação, ou a possibilidade de PrP^C estar, nessa placa, sendo degradada por outra via, que não a proteossomal. Por último, observa-se a diferença de expressão entre as condições 1 e 2, mesmo sem a superexpressão de Stub1/CHIP nessas células. Em 2 (onde houve tratamento das células com MG132), há um aumento da intensidade da banda de PrP^C, com relação a condição 1 (que não sofreu tratamento), mesmo sem a superexpressão de Stub1/CHIP. Isso pode ser devido à expressão endógena de Stub1/CHIP pelas células HEK293T, ou pelo fato de PrP^C poder sofrer ubiquitinação e degradação por outra proteína E3-ligase, a gp78 (SHAO *et al.*, 2014), e esse fato poder estar ocorrendo nas células HEK293T, justificando o acúmulo de PrP^C frente à inibição do proteossomo, ainda que Stub1/CHIP não esteja superexpressa.

No segundo experimento que avalia a participação de Stub1/CHIP na ubiquitinação de PrP^C (Figura 17) através de imunoprecipitação, pode-se observar

uma banda de maior intensidade, quando há co-transfecção de células HEK293T com GFP-PrP^C e Myc-Stub1/CHIP, se comparada à banda correspondente quando há somente superexpressão de GFP-PrP^C (parte inferior da figura, análise com anticorpo anti-ubiquitina). Contudo, não é possível afirmar que há mais PrP^C ubiquitinada, pois na parte superior da figura, quando a membrana é testada com anti-GFP, as bandas de PrP^C apresentam-se desiguais. Somente seria possível avaliar o grau de ubiquitinação de PrP^C se as bandas testadas com anticorpo anti-GFP apresentassem a mesma intensidade. Não foi possível obter esse resultado em três experimentos realizados no laboratório. A dificuldade da visualização da ubiquitinação de PrP^C também é devido à falta, no laboratório, de um plasmídeo que expresse ubiquitina. Não ter esse reagente (HA-Ubiquitina) pode ter prejudicado a reação de ubiquitinação de PrP^C, pois os elementos necessários à ubiquitinação seriam o substrato (PrP^C), a proteína E3-ligase (Stub1/CHIP) e a ubiquitina. Os dois primeiros foram superexpressos na célula. Talvez, a falta de ubiquitina possa ter limitado a ubiquitinação da proteína cliente, por uma falta de equilíbrio da reação. Nota-se, no estudo feito por Ding e Goldberg que, quando são co-transfectados plasmídeos contendo a proteína E3-ligase, o substrato e a ubiquitina, o padrão de ubiquitinação da proteína cliente fica muito mais evidente. O mesmo não se repete quando não há superexpressão de ubiquitina na amostra (DING & GOLDBERG, 2009). Para um próximo momento, teremos no laboratório o plasmídeo de HA-ubiquitina, e a reação de ubiquitinação será repetida, cotransfectando-se o plasmídeo contendo PrP^C, o plasmídeo contendo Stub1/CHIP, e o plasmídeo contendo ubiquitina.

8 CONCLUSÃO

- Foi possível confirmar a interação entre PrP^C e Stub1/CHIP por métodos de *pull-down* e co-imunoprecipitação. A confirmação realizada tanto em proteínas superexpressas quanto endógenas sugere que esse complexo seja realmente formado *in vivo* sob determinadas circunstâncias na célula;
- Nossos dados indicam que PrP^C pode ser degradada por Stub1/CHIP, de uma maneira não totalmente dose-dependente;
- PrP^C parece ser degradada por Stub1/CHIP pela via de ubiquitina-proteossomo;
- Sugerimos que a proteína Stub1/CHIP está envolvida no processamento da molécula de PrP^C, no que se refere à sua estabilidade/degradação. Esse fato poderá ser usado no futuro no desenvolvimento de estratégias terapêuticas no que diz respeito às doenças priônicas.

9 PERSPECTIVAS

- Publicar em breve os dados relacionados à interação PrP^C-Stub1/CHIP;
- Investir em novos protocolos de co-imunoprecipitação, para detectar a presença de STI1/Hop e Hsp70 no mesmo complexo onde estão presentes PrP^C e Stub1/CHIP;
- Realizar testes com RNA de interferência para Stub1/CHIP, no intuito de melhor caracterizar a degradação de PrP^C por Stub1/CHIP;
- Determinar quais domínios específicos estão envolvidos nessa interação;
- Determinar as implicações fisiopatológicas na interação PrP^C-CHIP, através de ensaios com mutantes de PrP relacionados às doenças priônicas.

REFERÊNCIAS

AL-RAMAHI, I.; LAM, Y.C.; CHEN, H.K.; DE GOUYON, B., ZHANG, M.; PÉREZ, A.M.; BRANCO, J.; DE HARO, M.; PATTERSON, C.; ZOGHBI, H.Y.; BOTAS, J. CHIP protects from the neurotoxicity of expanded and wild-type ataxin-1 and promotes their ubiquitination and degradation. **The journal of biological chemistry**, v. 281, n. 36, p. 26714–26724, 2006.

ARAVIND, L.; KOONIN, E.V. The U box is a modified RING finger - a common domain in ubiquitination. **Curr Biol**, v.10, n. 4, p. 132-134, 2000.

BALLINGER, C.A.; CONNELL, P.; WU, Y., HU, Z.; THOMPSON, L.J.; YIN, L.Y.; PAT-TERSON, C. Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. **Molecular and cellular biology**, v. 19, n. 6, p. 4535-4545, 1999.

BENDHEIM, P.E.; BROWN, H.R.; RUDELLI, R.D.; SCALA, L.J.; GOLLER, N.L.; WEN, G.Y.; KASCSAK, R.J.; CASHMAN, N.R.; BOLTON, D.C. Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. **Neurology**, v. 42, n.1, p. 149-156, 1992.

BOLTON, D.C.; MCKINLEY, M.P.; PRUSINER S.B. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. **Science**, v. 218, n. 4579, p. 1309-1311, 1982.

BRAGASON, B.T.; PALSDOTTIR, A. Interaction of PrP with NRAGE, a protein involved in neuronal apoptosis. **Mol. Cell. Neurosci**, v. 29, n. 2, p. 232–244, 2005.

BRÜCKNER, A.; POLGE, C.; LENTZE, N.; AUERBACH, D.; SCHLATTNER, U. Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. **Int. J. Mol. Sci.**, v.10, n.6, p. 2763-2788, 2009.

BÜELER, H.; AGUZZI, A.; SAILER, A.; GREINER, R.A.; AUTENRIED, P.; AGUET, M.; WEISSMANN, C. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. **Cell**, v. 73, n. 7, p. 1339–1347, 1993.

BÜELER, H.; FISCHER, M.; LANG, Y.; BLUETHMANN, H.; LIPP, H.P.; DEARMOND, S.J.; PRUSINER, S.B.; AGUET, M.; WEISSMANN, C. Normal development and behavior of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. **Nature**, v. 356, n. 6370, p. 577-582, 1992.

CHAKRABARTI, O.; ASHOK, A.; HEGDE, R.S. Prion protein biosynthesis and its emerging role in neurodegeneration. **Trends Biochem Sci**, v. 34, n. 6, p. 287-95, 2009.

CHIARINI, L.B.; FREITAS, A.R.; ZANATA, S.M.; BRENTANI, R.R.; MARTINS, V.R.; LINDEN, R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. **EMBO J**, v. 21, n. 13, p. 3317–3326, 2002.

CONNELL, P.; BALLINGER, C.A.; JIANG, J.; WU, Y.; THOMPSON, L.J.; HÖHFELD, J.; PATTERSON, C. The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. **Nat Cell Biol**, v. 3, n. 1, p. 93-96, 2001.

COSTA, M.D.M.; PALUDO, K.S.; KLASSEN, G.; LOPES, M.H.; MERCADANTE, A.F.; MARTINS, V.R.; CAMARGO, A.A.; NAKAO, L.S.; ZANATA, S.M. Characterization of a specific interaction between ADAM23 and cellular prion protein, **Neuroscience Letters**, v.461, n. 1, p. 16-20, 2009.

DAI, Q.; ZHANG, C.; WU, Y.; MCDONOUGH, H.; WHALEY, R. A.; GODFREY, V.; PATTERSON, C. CHIP activates HSF1 and confers protection against apoptosis and cellular stress. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 20, p. 5446–5458, 2003.

DE SOUZA, L.E.; COSTA, M.D.M.; BILEK, E.S.; LOPES, M.H.; MARTINS, V.R.; PÜSCHEL, A.W.; MERCADANTE, A.F.; NAKAO, L.S.; ZANATA, S.M. ST11 antagonizes cytoskeleton collapse mediated by small GTPase Rnd1 and regulates neurite growth. **Exp Cell Res**, v. 324, n.1, p. 84-91, 2014.

DICKEY, C.A.; PATTERSON, C.; DICKSON, D.; PETRUCCELLI, L. Brain CHIP: removing the culprits in neurodegenerative disease. **Trends Mol Med**, v.13, n.1, p. 32-38, 2007.

DONNELLY, B. F.; NEEDHAM, P. G.; SNYDER, A. C.; ROY, A.; KHADEM, S., BRODSKY; J. L.; SUBRAMANYA, A. R. Hsp70 and Hsp90 Multichaperone Complexes Sequentially Regulate Thiazide-sensitive Cotransporter Endoplasmic Reticulum-associated Degradation and Biogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 18, p. 13124–13135, 2013.

DING, X.; GOLDBERG, M.S. Regulation of LRRK2 stability by the E3 ubiquitin ligase CHIP. **PLoS One**, v. 106, n. 8, p. 2897-2902, 2009.

FIORITI, L.; DOSSENA, S.; STEWART, L.R.; STEWART, R.S.; HARRIS, D.A.; CHIESA, R. Cytosolic prion protein (PrP) is not toxic in N2a cells and primary neurons expressing pathogenic PrP mutations. **J Biol Chem**, v. 280, n. 12, p. 11320–11328, 2005.

EDKINS, A.L. CHIP: A Co-chaperone for Degradation by the Proteasome. **Subcell Biochem**, v. 78, n. 1, p. 219-242, 2015.

ERMONVAL, M.; MOUILLET-RICHARD, S.; CODOGNO, P.; KELLERMANN, O.; BOTTI, J., Evolving views in prion glycosylation: functional and pathological implications, **Biochimie**, v. 85, n. 1-2, p. 33-45, 2003.

GIMENEZ, A.P.L. **Identificação e caracterização de interações realizadas pela proteína prion celular no sistema olfatório**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

HAJJ, G.N.; ARANTES, C.P.; DIAS, M.V.; ROFFÉ, M.; COSTA-SILVA, B.; LOPES, M.H.; PORTO-CARREIRO, I.; RABACHINI, T.; LIMA, F.R.; BERALDO, F.H.; PRADO, M.A.; LINDEN, R.; MARTINS, V.R. The unconventional secretion of stress-inducible protein 1 by a heterogeneous population of extracellular vesicles. **Cell Mol Life Sci**, v.70, n.17, p. 3211-3227, 2013.

HAJJ, G.N.; LOPES, M.H.; MERCADANTE, A.F.; VEIGA, S.S.; DA SILVEIRA, R.B.; SANTOS, T.G.; RIBEIRO, K.C.; JULIANO, M.A.; JACCHIERI, S.G.; ZANATA, S.M.; MARTINS, V.R. Cellular prion protein interaction with vitronectin supports axonal growth and is compensated by integrins. **J Cell Sci**, v. 120, p.1915-26, 2007.

HARLOW, E. & LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. 1 ed. Cold Spring Harbor Laboratory: USA, 1998.

HATAKEYAMA, S.; YADA, M.; MATSUMOTO, M.; ISHIDA, N.; NAKAYAMA, K.I. U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. **J BiolChem**, v. 276, n. 35, p. 33111-33120, 2001.

HEAD, M.W.; RITCHIE, D.; SMITH, N.; MCLOUGHLIN, V.; NAILON, W.; SAMAD, S.; MASSON, S.; BISHOP, M.; MCCARDLE, L.; IRONSIDE, J.W. Peripheral tissue involvement in sporadic, iatrogenic, and variant Creutzfeldt-Jakob disease. **Am J Pathol**, v.164, n.1, p. 143-153, 2004.

KURSCHNER, C.; MORGAN, J.I. The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system, **Brain Res. Mol. Brain Res**, v. 30, n. 1, p. 165–168, 1995.

KUMAR, P.; AMBASTA, R.K.; VEERESHWARAYYA, V.; ROSEN, K.M.; KOSIK, K.S.; BAND, H.; MESTRIL, R.; PATTERSON, C.; QUERFURTH, H.W. CHIP and HSPs interact with beta-APP in a proteasome-dependent manner and influence Abeta metabolism. **Hum Mol Genet**, v.16, n. 7, p. 848-864, 2007.

KUNDRAT, L.; REGAN, L. Balance between folding and degradation for Hsp90-dependent client proteins: a key role for CHIP. **Biochemistry**, v. 49, n.35, p. 7428–7438, 2010.

LEE, K.S.; MAGALHÃES, A.C.; ZANATA, S.M.; BRENTANI, R.R.; MARTINS, V.R.; PRADO, M.A.M. Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. **Journal of Neurochemistry**, v.79, n. 1, p. 79-87, 2001.

LIMA, F.R.; ARANTES, C.P.; MURAS, A.G.; NOMIZO, R.; BRENTANI, R.R.; MARTINS, V.R.; Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. **J Neurochem**, v. 103, n. 6, p. 2164-2176, 2007.

LINDEN, R.; MARTINS, V.R.; PRADO, M.A.M.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I.; BRENTANI, R.R. Physiology of the prion protein. **Physiology Reviews**, v. 88, n. 2, p. 673-728, 2008.

LOVE, I.M.; GROSSMAN, S.R. It Takes 15 to Tango: Making Sense of the Many Ubiquitin Ligases of p53. **Genes Cancer**, v.3, n. 3-4, p. 249-263, 2012.

MA, J.; LINDQUIST, S. Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation. **ProcNatlAcadSci U S A**, v. 98, n. 26, p. 14955–14960, 2001.

MA, J.; WOLLMANN, R.; LINDQUIST, S. Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. **Science**, v. 298, n. 5599, p.1781–1785, 2002.

MARTINS, V.R.; BERALDO, F.H.; HAJJ, G.N.; LOPES, M.H.; LEE, K.S.; PRADO, M.M.; LINDEN, R. Prion protein: orchestrating neurotrophic activities. **Curr Issues Mol Biol**, v. 12, n. 2, p. 63-86, 2010.

MARTINS, V.R.; GRANER, E.; GARCIA-ABREU, J.; DE SOUZA, S.J.; MERCADANTE, A.F.; VEIGA, S.S.; ZANATA, S.M.; NETO, V.M.; BRENTANI, R.R. Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. **Nat Med**, v. 3, n. 12, p. 1376-82, 1997.

MCDONOUGH, H.; CHARLES, P. C.; HILLIARD, E. G.; QIAN, S.; MIN, J.N.; PORTBURY, A.; PATTERSON, C. Stress-dependent Daxx-CHIP Interaction Suppresses the p53 Apoptotic Program. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 31, p. 20649–20659, 2009.

MEYER, R.F.; MCKINLEY, M.P.; BOWMAN, K.A.; BRAUNFELD, M.B.; BARRY, R.A.; PRUSINER, S.B. Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 83, n. 8, p. 2310-2314, 1986.

MIESBAUER, M.; RAMBOLD, A.S.; WINKHOFER, K.F.; TATZELT, J. Targeting of the prion protein to the cytosol: mechanisms and consequences. **Curr. Issues Mol. Biol.**, v. 12, n. 2, p. 109-118, 2010.

MIN, J.N.; WHALEY, R.A.; SHARPLESS, N.E.; LOCHYER, P.; PORTBURY, A.L.; PATTERSON, C. CHIP Deficiency Decreases Longevity, with Accelerated Aging Phenotypes Accompanied by Altered Protein Quality Control. **Molecular And Cellular Biology**, v. 28, n.12, p. 4018-4025, 2008.

MORISHIMA, Y.; WANG, A. M.; YU, Z.; PRATT, W. B.; OSAWA, Y.; LIEBERMAN, A.P. CHIP deletion reveals functional redundancy of E3 ligases in promoting degradation of both signaling proteins and expanded glutamine proteins. **Human Molecular Genetics**, v. 17 n. 2, p. 3942–3952, 2008.

MULLER, P.; RUCKOVA, E.; HALADA, P.; COATES, P.J.; HRSTKA, R.; LANE, D.P.; VOJTESEK, B. C-terminal phosphorylation of Hsp70 and Hsp90 regulates alternate binding to co-chaperones CHIP and HOP to determine cellular protein folding/degradation balances. **Oncogene**, v. 32, n. 25, p. 3101-3110, 2013.

PAUL, I.; GOSH, M.K. The E3 Ligase CHIP: Insights into Its Structure and Regulation. **Biomed Research International**, v. 2014, n. 918183, p. 2014:918183, 2014.

PARBACUS, M.K.; HOE, N.; SADEGHI, S.; PATTERSON, C.; WIERTZ, E.; CORREIA, M.A. CYP3A4 ubiquitination by gp78 (the tumor autocrine motility factor receptor, AMFR) and CHIP E3 ligases. **Arch Biochem Biophys**, v. 483, n. 1, p. 66-74, 2009.

ORSI, A.; FIORITI, L.; CHIESA, R.; SITIA, R. Conditions of endoplasmic reticulum stress favor the accumulation of cytosolic prion protein. **J BiolChem**, v. 281, n. 41, p. 30431–30438, 2006.

RESELLI, E.; FIORITI, L.; MANTOVANI, S.; AIRAGHI, S.; FORLONI, G.; CHIESA, R. Cell type-specific neuroprotective activity of untranslocated prion protein. **PLoS One**, v.5, n. 10, p. e13725, 2010.

RONNEBAUM, S.M.; WU, Y.; McDONOUGH, H.; PATTERSON, C. The Ubiquitin Ligase CHIP Prevents SirT6 Degradation through Noncanonical Ubiquitination. **Mol Cell Biol**, v. 33, n. 22, p. 4461–4472, 2013.

SHAO, J.; CHOE, V.; CHENG, H.; TSAI, Y.C.; WEISSMAN, A.M.; LUO, S.; RAO, H. Ubiquitin ligase gp78 targets unglycosylated prion protein PrP for ubiquitylation and degradation. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e92290, 2014.

SOUZA, L.E.R.; COSTA, M.D.M.; BILEK, E.S.; LOPES, M.H.; MARTINS, V.R.; PÜSCHEL, A.W.; MERCADANTE, A.F.; NAKAO, L.S.; ZANATA, S.M. STI1 antagonizes cytoskeleton collapse mediated by small GTPase Rnd1 and regulates neurite growth. **Experimental Cell Research**, v. 324, n.1, p. 84-91, 2014.

STEELE, A.D.; LINDQUIST, S.; AGUZZI, A. The prion protein knockout mouse, a phenotype under challenge. **Prion**, v. 1, n. 2, p. 83-93, 2007.

SUN C; LI, H.L.; SHI, M.L.; QING, H.L.; BAI, J.; ZHENG, J.N. Diverse roles of C terminal Hsp70 interacting protein (CHIP) in tumorigenesis. **J Cancer Res ClinOncol**, v. 140, n. 2, p. 189-97, 2014.

SUNYACH, C.; JEN, A.; DENG, J.; FITZGERALD, K.T.; FROBERT, Y.; GRASSI, J.; MCCAFFREY, M.W.; MORRIS, R. The mechanism of internalization of

glycophosphatidylinositol-anchored prion protein. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 14, p. 3591-3601, 2003.

VEMBAR, S. S.; BRODSKY, J. L. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 12, p. 944–957, 2008.

VINCENT, B.; PAITEL, E.; FROBERT, Y.; LEHMANN, S.; GRASSI, J.; CHECLER, F. Phorbol Ester-regulated Cleavage of Normal Prion Protein in HEK293 Human Cells and Murine Neurons. **J. Biom. Chem**, v. 275, n. 45, p. 35612–35616, 2000.

YEDIDIA, Y.; HORONCHIK, L.; TZABAN, S.; YANAI, A.; TARABOULOS, A. Proteasomes and ubiquitin are involved in the turnover of the wild-type prion protein. **Embo J**, v.20, n.19, p. 5383–5391, 2001.

YANG, S.W.; OH, K.H.; PARK, E.; CHANG, H.M.; PARK, J.M.; SEONG, M.W.; KA, S.H.; SONG, W.K.; PARK, D.E.; BAAS, P.W.; JEON, W.J.; CHUNG, C.H. USP47 and C Terminus of Hsp70-Interacting Protein (CHIP) Antagonistically Regulate Katanin-p60-Mediated Axonal Growth. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 31, p. 12728–12738, 2013.

ZANATA, S.M.; LOPES, M.H.; MERCADANTE, A.F.; HAJJ, G.N.; CHIARINI, L.B.; NOMIZO, R.; FREITAS, A.R.; CABRAL, A.L.; LEE, K.S.; JULIANO, M.A.; DE OLIVEIRA, E.; JACHIERI, S.G.; BURLINGAME, A.; HUANG, L.; LINDEN, R.; BRENTANI, R.R.; MARTINS, V.R. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. **EMBO J**, v. 21, n. 13, p. 3307-16, 2002.

ZHANG, J.; WANG, K.; GUO, Y.; SHI, Q.; TIAN, C.; CHEN, C.; GAO, C.; ZHANG, B.Y.; DONG, X.P. Heat shock protein 70 selectively mediates the degradation of cytosolic PrPs and restores the cytosolic PrP-induced cytotoxicity via a molecular interaction. **Virol J**, v. 9, n. 303, p. 1-10, 2012.

APÊNDICE 1 – Carta de submissão de manuscrito

Prion

15/03/15 09:00



Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

prion

Manuscript
Home

Author
Instructions

Reviewer
Instructions

Help Tips Logout Journal Home

Manuscript #	2015PRION0017
Current Revision #	0
Submission Date	2015-03-09 10:22:16
Current Stage	Under Review
Title	Identification of novel binding proteins for cellular prion protein
Running Title/Tweet Title	New ligands for cellular prion protein
Manuscript Type	Research Paper
Special Section	N/A
Manuscript Comment	Ana Paula Lappas Gimenez and Larissa Morato L. Richter contributed equally to the work.
Corresponding Author	Adriana Mercadante (Federal University of Parana)
Contributing Authors	Ana Paula Gimenez , Larissa Richter , Mariana Atherino , Breno Beirão , Celso Jr , Michele Costa , Prof. Silvio Zanata , Bettina Malnic
Abstract	Prion diseases involve the conversion of the endogenous cellular prion protein, PrPC, into a misfolded infectious isoform, PrPSc (prion scrapie). Several functions have been attributed to PrPC and its role has also been investigated in the olfactory system. It has been reported that this protein is expressed in the olfactory bulb (OB) and olfactory epithelium (OE) and that the nasal cavity is an important route of transmission of diseases caused by prions. Moreover, Prnp ^{-/-} mice show impaired behavior in olfactory tests. Given the high PrPC expression in OE and its putative role in olfaction, we screened a mouse OE cDNA library, in attempt to identify novel PrPC binding partners. Ten different putative PrPC ligands were identified. They are involved in many functions, such as cellular proliferation, apoptosis, cytoskeleton, vesicle transport, ubiquitination, stress response and other physiological processes. The PrPC interactions with β -catenin (Ctnnb1) and STIP1 homology and U-Box containing protein 1 (Stub1) were also confirmed by <i>in vitro</i> binding assays (pull-down or co-immunoprecipitation) and are here reported for the first time. Physiological and pathological implications of both ligations are under

	Investigation. The PrPC binding proteins identified in the present study are not exclusive to the OE, suggesting that these interactions can also occur in other tissues and play general roles. These data corroborate the proposal that PrPC is part of a multiprotein complex that modulates several cellular functions. Our findings provide a platform for further studies of the physiological and pathological roles of prions.
Monitoring Editor	Assigned
Free-Form Keywords	prion, yeast two-hybrid, Stub 1, CHIP, beta-catenin, olfactory epithelium, protein interaction
Subject Areas	Molecular and cellular basis of mammalian prions
Conflict of Interest	No, there is no conflict of interest that I should disclose, having read the above statement.
Funding Body Archiving Mandates	Funding Summary

Manuscript Items

1. Author Cover Letter [PDF \(127KB\)](#) [Source File \(DOC\) 145KB](#)
2. Merged File containing manuscript text and 3 Figure files. [PDF \(1281KB\)](#)
 - a. Article File [PDF \(185KB\)](#) [Source File \(DOC\) 797KB](#)
 - b. Figure 1 [PDF \(670KB\)](#) [Source File \(JPG\) 669KB](#)
 - c. Figure 2 [PDF \(48KB\)](#) [Source File \(JPG\) 47KB](#)
 - d. Figure 3 [PDF \(380KB\)](#) [Source File \(JPG\) 379KB](#)

Manuscript Tasks

[Send Manuscript Correspondence](#)

[Check Status](#)



[Manuscript Home](#) [Author Instructions](#) [Reviewer Instructions](#) [Help](#) [Logout](#) [Journal Home](#)
 Terms of Service © Licensed under Patent: #US 7,620,535B1

Apêndice 2 - Manuscrito

TITLE: Identification of novel binding proteins for cellular prion protein

Ana Paula Lappas Gimenez^{a,#}, Larissa Morato Luciani Richter^{a,#}, Mariana Campos Atherino^a, Breno Castello Branco Beirão^a, Celso Fávaro Jr.^a, Michele Dietrich Moura Costa^b, Silvio Marques Zanata^a, Bettina Malnic^c, Adriana F. Mercadante^{a*}

^a Department of Basic Pathology, Universidade Federal do Paraná, PR, Brazil

^b Department of Structural and Molecular Biology and Genetics, Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR, Brazil

^c Department of Biochemistry, Universidade de São Paulo, SP, Brazil

*Corresponding author: Universidade Federal do Paraná - Setor de Ciências Biológicas – Centro Politécnico – Curitiba – PR- Brazil - PO Box 19031 – ZIP 81531-990 – Phone: +55-41-33611760 Fax: +55-41-32662042; E-mail: afmercadante@ufpr.br

Authors contributed equally to this work

Conflicts of Interest: The authors have declared no conflicts of interest.

ABSTRACT

Prion diseases involve the conversion of the endogenous cellular prion protein, PrP^C, into a misfolded infectious isoform, PrP^{Sc} (prion scrapie). Several functions have been attributed to PrP^C and its role has also been investigated in the olfactory system. It has been reported that this protein is expressed in the olfactory bulb (OB) and olfactory epithelium (OE) and that the nasal cavity is an important route of transmission of diseases caused by prions. Moreover, Prnp^{-/-} mice show impaired behavior in olfactory tests. Given the high PrP^C expression in OE and its putative role in olfaction, we screened a mouse OE cDNA library, in attempt to identify novel PrP^C binding partners. Ten different putative PrP^C ligands were identified. They are involved in many functions, such as cellular proliferation, apoptosis, cytoskeleton, vesicle transport, ubiquitination, stress response and other physiological processes. The PrP^C interactions with β -catenin (Ctnnb1) and STIP1 homology and U-Box containing protein 1 (Stub1) were also confirmed by *in vitro* binding assays (pull-down or co-immunoprecipitation) and are here reported for the first time. Physiological and pathological implications of both ligations are under investigation. The PrP^C binding proteins identified in the present study are not exclusive to the OE, suggesting that these interactions can also occur in other tissues and play general roles. These data corroborate the proposal that PrP^C is part of a multiprotein complex that modulates several cellular functions. Our findings provide a platform for further studies of the physiological and pathological roles of prions.

Keywords: prion; yeast two-hybrid; olfactory epithelium; beta-catenin; Stub1; protein interaction; Chip

INTRODUCTION

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), also known as prion diseases, are fatal neurodegenerative disorders that include Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) in humans, scrapie in sheep and bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle. These diseases involve the conversion of the endogenous cellular prion protein, PrP^C, into a misfolded and infectious isoform named PrP^{Sc} (from prion scrapie).^{1,2}

PrP^C is predominantly an extracellular glycosyl-phosphatidil-inositol (GPI) anchored glycoprotein expressed in most tissues and enriched in the central nervous system.³ Despite intensive research and the fact that PrP^C is conserved across different species, a consensus about its physiological function has not yet been reached.^{2,4} Several functions have been attributed to PrP^C, including stress and behavior, sleep-wake cycle, memory, neuritogenesis, neuroprotection and cellular adhesion.² Many of these roles were elucidated with the discovery of PrP-binding partners using different biophysical assays, such as conventional yeast two-hybrid screening, co-immunoprecipitation and other methods. These findings suggest that PrP^C may serve as a scaffolding protein for the assembly of signaling modules and, therefore, it must be related to a variety of cellular processes, rather than have a specific function.^{2,5}

The physiological role of PrP^C has also been investigated in the olfactory system. It has been reported that PrP^C is expressed in different areas of the olfactory system, including the olfactory epithelium (OE) and the olfactory bulb (OB), and localized in the axons of both olfactory sensory neurons (OSNs) and mitral cells.⁶ Interestingly, *Prnp*^{-/-} mice showed impaired behavior in olfactory tests and have altered electrophysiological activity in dendrodendritic synapse in the olfactory bulb. Both the behavioral and electrophysiological deficits observed in *Prnp*^{-/-} mice were rescued by transgenic neuronal-specific expression of PrP^C.⁷ It was also reported that the OE from *Prnp*^{-/-} mice had no alterations in the odorant-evoked electro-olfactogram, suggesting that the PrP^C plays an olfactory function in the OB,

rather than in the OE.⁷ However, PrP^C expression in olfactory sensory neurons, both in dendrites and cell bodies (in a lower abundance) and in axons (more abundantly) is evident^{6,8} and suggests that this protein should play a physiological role in these sensory cells. Moreover, the OE has been previously demonstrated to be a site of prion infection in humans⁹ and animals.¹⁰

In an effort to address the physiological roles of PrP^C, we performed a yeast two-hybrid screen, using PrP^C as a bait. Given the high PrP^C expression in OE and its putative role in olfaction, we screened a mouse OE cDNA library, in attempt to identify novel PrP^C binding partners. Ten different putative PrP^C binding proteins were identified which may provide insights into the physiological / pathological functions of PrP in OE and other tissues. The PrP^C interactions with β -catenin (Ctnnb1) and STIP1 homology and U-Box containing protein 1 (Stub1) were also confirmed by *in vitro* binding assays and are here reported for the first time. The PrP^C binding proteins identified in the present work are not exclusive to the olfactory epithelium, suggesting that these interactions can also occur in other tissues and play general roles.

RESULTS

Identification of PrP^C interacting proteins by yeast two-hybrid screen

To identify new interactors for the cellular prion protein, we conducted a yeast two-hybrid screening of an olfactory epithelium cDNA library, using PrP^C as bait. Fifty three isolated clones were positive for both reporter genes (LEU2 and Lac-z). These clones were sequenced and their identities are listed in Table 1. Eighteen out of the clones had their insert sequence in the correct frame. The majority of the putative ligands was found in one single positive clone, but some were found in two (Srpk2, Pcsk5, Stub1) or four (Dynlt1b) different clones.

In order to confirm these interactions, we performed cross-mating assays. As shown in Figure 1, ten of the interactions were validated, that is, the reporter gene (β -galactosidase) was only expressed when diploid yeasts contained both the target and bait vectors.

Additional information about these ten PrP^C binding proteins is shown in Table 2. Several inserts contain most of the coding region sequence, but only the clones corresponding to Dynlt1b have the entire coding sequence.

The PrP^C ligands we identified are involved in many functions, such as cellular proliferation and apoptosis, cytoskeleton and vesicle transport, ubiquitination of proteins, stress response and other physiological processes (Table 2). Interestingly, these putative PrP^C binding proteins are not exclusive to the olfactory epithelium, suggesting that these interactions may also occur in other tissues and play general biological functions.

Validation of PrP^C interactions with β -catenin (Ctnnb1) and Stub1 using *in vitro* binding assays

Out of the ten ligands, four showed stronger interactions (based on the intensity of blue color) with PrP^C: vimentin (Vim), dynein light chain Tctex-type 1B (Dynlt1b), catenin beta 1 (Ctnnb1) and STIP1 homology and U-Box containing protein 1 (Stub1) (Fig. 1). Since Ctnnb1 and Stub1 have the highest levels of transcripts in OMP+ neurons (deep-sequencing data from Magklara et al.¹¹), we decided to further investigate these two proteins. To examine protein expression of Ctnnb1 and Stub1 in the OE and in brain, we performed Western Blotting assays using protein extracts prepared from these mouse tissues. As shown in Figure 2, Ctnnb1 and Stub1 are expressed in both OE and brain, with similar expression levels in both tissues.

To further analyze the interactions of PrP^C with Ctnnb1 and with Stub1, we conducted pull-down assays. Recombinant His₆-PrP^C was incubated with protein extract prepared from mouse brain, as a source of endogenous Ctnnb1 and Stub1. Protein complexes were then

pulled down using Ni-NTA-agarose beads. Western blotting analyses showed that recombinant PrP^C was recovered from the resin, attested by the detection of a 25 kDa band when probed with anti-His tag (Fig. 3A). Both Ctnnb1 and Stub1 were pulled down together with recombinant PrP^C. No reaction was observed when the extract was incubated with Ni-NTA-agarose beads alone.

Co-immunoprecipitation assays were also performed to confirm the pull-down results. Protein extracts of HEK293T cells co-transfected with pEGFP-PrP^C and pcDNA3-Myc-Stub1 expression vectors were incubated with anti-PrP^C antibody followed by immunoprecipitation (IP). The blotting reaction of the immunoprecipitated material with anti-Stub1 antibody revealed two bands of 35-40 kDa, corresponding to the endogenous Stub1 (lower band) and the myc-tagged Stub1 (higher band) (Fig. 3B). No bands were observed when pre-immune serum was employed in the immunoprecipitation reaction (Fig. 3B, PI). The same membrane was re-probed with anti-PrP^C antibody to confirm that GFP-PrP^C was precipitated during the IP-reaction.

To demonstrate that endogenous PrP^C could bind endogenous Stub1, similar co-immunoprecipitation experiments were carried out using mouse OE extract. When PrP^C was immunoprecipitated from OE lysates and subjected to Western blot analysis, a specific band corresponding to Stub1 was detected (Fig. 3C). A weak signal of Stub1 was also obtained when beads coupled with pre-immune serum were used (negative control), suggesting a residual non-specific binding.

We were not able to detect co-immunoprecipitation of PrP^C and β -catenin (data not shown).

DISCUSSION

The aim of this study was the identification of novel PrP^C binding proteins, using the two-hybrid screening of an olfactory epithelium cDNA library. A group of ten proteins that potentially interact with PrP^C was identified and should provide clues about the enigmatic function of PrP^C. As PrP^C is a GPI-anchored protein and localized predominantly on the extracellular side of the plasma membrane, the relevance of yeast two-hybrid system to analyze interactions of PrP^C could be questioned. However, it is known that a subset of PrP^C is present in the cytosol, designated as cytosolic PrPc (cytPrP^C).¹²

Indeed, most of the putative PrP^C ligands obtained in the present study are cytoplasmic proteins. They all belong to different protein classes and are associated to distinct cellular mechanisms. These potential interactions are consistent with the proposal that PrP^C is part of a multiprotein complex that modulates several cellular functions.² Other proteins that could interact with PrP in the cytosol have been identified. Some of them mediate neuroprotection, including the anti-apoptotic protein Bcl-2¹³ and the neurotrophin receptor-interacting MAGE homologue, NRAGE.¹⁴ Restelli and colleagues found that PrP molecules that have escaped translocation into the ER was associated with an increase in the resistance of cortical and hippocampal cells to apoptosis, suggesting that this form of cytPrP has neuroprotective function.¹⁵ The putative interactions obtained that could modulate the cytPrP neuroprotection role should be investigated.

Other studies indicated that cytPrP can acquire a neurotoxic potential. Cytotoxic effects of cytPrP were observed in several mammalian cell lines and animal models.¹⁶ Thus, the interactions found in the present study may have some physiological role in the cytosol or they may participate in the induction of PrP^{Sc} and are potential targets for the treatment of TSEs.

Previous studies also used the yeast two-hybrid methodology to screen for PrP^C ligands, however the interactions obtained in these studies do not completely overlap with our findings.^{14,17-19} A number of possible explanations could account for the different results. First, most of the screens were not exhaustive and may not have reached saturation.

Second, it is well known that a significant number of false-positive interactions can be obtained in the yeast two-hybrid method. Moreover, variations in the details of the protocol, such as the vectors used, the nature of the reconstituted transcription factor and the nature of the libraries screened, have a great impact on the interactions that can be retrieved.²⁰

In addition to yeast two-hybrid experiments, the interactions with Ctnnb1 and Stub1, were also confirmed by pull-down assays. Moreover, PrP^C/Stub1 binding was also detected in co-immunoprecipitation assays. Additional studies are required in order to address the physiological implication of these interactions. As discussed below, data from the literature corroborates that these interactions can occur in a cellular context and modulate biological processes.

Catenin beta-1 or β -catenin plays a central role in the canonical Wnt signal transduction pathway, which is involved in a variety of cellular processes including development, cell proliferation, survival, migration and differentiation.²¹ In addition, β -catenin is also an essential component of the cadherin/catenin adhesion complex, which is involved in cell-cell adhesion.²² Several studies have been suggested that β -catenin may be acting both pre- and postsynaptically to regulate synapse formation and function.²³ The presence of PrP^C in both pre-²⁴ and postsynaptic structures²⁵ was also demonstrated, raising the hypothesis that the PrP^C / β -catenin interaction identified could play a role in synaptic function. Nevertheless, the participation of both proteins in a common cellular mechanism has never been reported and requires further studies.

We also confirmed the interaction between PrP^C and STIP1 homology and U-box containing protein 1 (Stub1). Stub1, also known as CHIP (C-terminus of HSC70-interacting protein), is a 35 kDa cytoplasmatic protein that functions both as a molecular co-chaperone, and as an ubiquitin E3 ligase.²⁶ The N-terminal region of Stub1/CHIP has three tetratricopeptide repeat (TPR) domains, which are responsible for protein-protein interactions with HSPs 70/90 and other molecular chaperones. The C-terminus contains a U-

box, which is the site of its ubiquitin E3 ligase activity.²⁷ In cooperation with heat shock chaperone proteins, including HSC70, HSP70 and HSP90, Stub1/CHIP plays a crucial role in recognizing and modulating the degradation of numerous chaperone-client proteins.²⁸

Stub1/CHIP is associated with several neurodegenerative disorders characterized by protein misfolding and aggregation, such as Alzheimer and Parkinson diseases.²⁹ Since prion diseases are also characterized by protein misfolding and aggregations, it would be logical to expect that PrP^C is a substrate for Stub1/CHIP. It is possible that the interaction identified between PrP^C and Stub1/CHIP can occur *in vivo* and modulate PrP^C stability, which is implicated in the PrP^{Sc} conversion. To date, there is no evidence in the literature showing that PrP^C would be a substrate for Stub1/CHIP.

Interestingly, Stub1/CHIP is homologous to stress-inducible protein 1 (STI1) or Hsp70/Hsp90 organizing protein (Hop), a well-known PrP^C ligand.³⁰ Like Stub1/CHIP, STI1/Hop is also a co-chaperone and contains TPR domains that interact with the C-terminal sequence of Hsp70 and Hsp90. Its interaction with PrP^C at the cell surface is implicated in neuritogenesis and neuroprotection.^{2,30,31} Some works have demonstrated that both STI1/Hop and Stub1/CHIP are involved together, modulating the balance between folding and degradation for Hsp70/90 client proteins.³² It is possible that a similar mechanism is involved in PrP^C quality control, since PrP^C binds both STI1/Hop and Stub1/CHIP. This regulation of PrP^C by STI1/Hop and Stub1/CHIP is currently under investigation in our group.

Since β -catenin and Stub1 are found in the cytoplasm and PrP^C is located in the extracellular side of cell membrane, the sub-localization of the identified interactions awaits further investigation. The presence of PrP^C in the cytoplasm might be a normal feature of PrP^C metabolism, either by retro-translocation or by direct transfer from the ribosomes without entering the endoplasmic reticulum (ER).³³ As mentioned above, some studies indicated that the cytoplasmic PrP^C has neurotoxic effects, but other findings suggested a neuroprotective role for these PrP molecules. Hence, the PrP^C interactions with both Ctnnb1

and Stub1 are possible to occur in the cytosol and participate in the neuroprotective or neurotoxic effects.

The characterization of novel PrP^C ligands should contribute to the understanding of both the physiological and pathological roles played by PrP^C. The functional implications of PrP^C interactions with β -catenin and Stub1 in olfaction and other biological processes should be further investigated.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies and plasmids

The following antibodies were used in this study: rabbit polyclonal anti-Ctnnb1 (ABCAM, #ab6302), rabbit monoclonal anti-Stub1 (ABCAM, #134064) and mouse monoclonal anti- β -actin (Sigma Aldrich, #A5441). Polyclonal anti-PrP^C antibodies were raised in PrP^C-null mice and the specificity of this antiserum has already been described.^{30,34}

Plasmids used for the cells transfections were: pCDNA 3.1-Myc-Stub1, which harbor full-length mouse Stub1 cDNA insert; pEGFP-PrP^C previously described³⁵ was kindly provided by Dr. Vilma Regina Martins (International Research Center, A.C. Camargo Hospital, São Paulo, Brazil). The yeast two-hybrid vectors are described below.

Production of the yeast bait strain

The sequence encoding the mature mouse PrP^C (residues 23-231) was amplified by PCR using the recombinant plasmid pEGFP-PrP^C as template and subcloned into the *EcoRI* / *BamHI* restrictions sites of the yeast bait expression vector pGILDA (Clontech, USA). The construct was then transformed into the yeast strain RFY206 together with pSH18-34, a Lac-Z reporter vector.

Yeast two-hybrid screening

The pre-transformed OE cDNA library was already described elsewhere.^{36,37} Yeast two-hybrid screening was carried out by using a DupLex-A - Yeast Two-Hybrid System (OriGene Technologies, Rockville, MD) and was performed as previously described [36] using mating assay. Cross-mating test was conducted as described in Von Dannecker et al.³⁶

Detection of Ctnnb1 and Stub1 in mouse brain and OE protein homogenates

Mouse brain and OE tissues were removed and lysed in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% NP-40, 0.2% sodium deoxicolate, 1 mM PMSF and 1 mM NEM). The extracts were centrifuged at 19,000 x g for 30 min at 4° C and the supernatants were saved. All animal procedures undertaken in this study were approved by the Animal Care and Use Committee (Federal University of Paraná) and are in accordance to ethic guidelines established by CONCEA (National Council of Animal Experiment Control, Brazil).

Protein homogenates (100 µg) were separated in SDS-PAGE, and analyzed by Western blotting using antibodies anti-Ctnnb1 (1:2,000), anti-Stub1 (1:2,000) and anti-β actin (1:3,000). The reaction was developed using a chemiluminescent substrate (WestPico, Pierce Co.).

Quantification of band intensity was performed using the Image J Software (NIH, Bethesda, MD, USA). The signal intensity of each protein was normalized with the corresponding β-actin signal. Experiments were conducted at least 3 times and values were expressed as mean ± standard error. Student's t test was used for statistical analysis and P<0.05 was considered significant.

Pull-Down assays

Mouse brain homogenate diluted in buffer A (10mM Tris, pH 7.4; 100mM NaH₂PO₄; 25mM imidazol; 1% NP-40) was pre-cleared twice in 30 µl of Ni-NTA-agarose. The resulting supernatant (input; 250 µg) was incubated with 45 µg of mouse recombinant His₆-PrP^C (kindly provided by Dr. Vilma Regina Martins, International Research Center, A.C. Camargo Hospital, São Paulo, Brazil) for 2 hours, at 4° C. The same amount of input (without recombinant protein) was used as a negative control. After that, 30 µl of Ni-NTA-agarose was added to each sample and incubated for 1 hour, at room temperature. The resins were washed seven times in buffer A (with 50 mM imidazol) and the last wash was in buffer A with 0.01% SDS. Pulled down material was eluted with Laemmli sample buffer, resolved by a 12% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using antibodies anti-Ctnnb1 and anti-Stub1 as described above, and monoclonal anti-penta His antibodies (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Immunoprecipitation assays

HEK 293T cells were co-transfected as previously described³⁴ with pEGFP-PrP and pcDNA3-Myc-Stub1. After 48h, cells were lysed in 50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM de MgCl₂, 1% NP40 and 0.2% sodium deoxycholate plus complete protease inhibitor cocktail and centrifuged 20,000 x g, for 15 minutes at 4°C. Protein extracts (800µg of protein, 0.4 µg/ µL) were pre-cleared using protein A/G-Sepharose (Sigma-Aldrich), for 3 hours, at 4°C. The pre-cleared extract was aliquoted into two samples containing 400 µg of protein each. Both samples were incubated for 4 h at 4 °C under gentle agitation, one of them was added with 30 µl of protein A/G-Sepharose cross-linked to anti-PrP^C polyclonal antibodies, the other one (negative control) was added with an equal volume of protein A/G-Sepharose cross-linked to pre-immune mice serum. Beads were washed five times in lysis buffer and bound proteins were eluted with 1X Laemmli buffer at 100°C. Recovered proteins were separated using 10% SDS-PAGE followed by Western blot analysis using anti-PrP^C (1:1,000) or anti-Stub1 (1:2,000).

The same assay described above was performed using protein lysates from mouse olfactory epithelium (500 µg, 0.5 µg/ µL).

Acknowledgements

We thank Evelyn Castillo Lima and Fernanda Miwa Yamasaka (UFPR) for technical assistance. This investigation was supported by grants from National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq, Brazil) (476849/2011-0), Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES, Brazil) fellowships to APLG, LMLR, BCBB and CFJ. MCA was supported by CNPq-PiBIC fellowship.

REFERENCES

1. Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1998; 95: 13363–83.
2. Linden R, Martins VR, Prado MAM, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR. Physiology of the prion protein. *Physiol Rev* 2008; 88: 673-728.
3. Stahl N, Prusiner SB. Prions and prion proteins, *FASEB J* 1991; 5: 2799–2807.
4. Martins VR, Beraldo FH, Hajj GN, Lopes MH, Lee KS, Prado MM, Linden R. Prion protein: orchestrating neurotrophic activities. *Curr Issues Mol Biol* 2010; 12: 63-86.
5. Linden R, Mariante RM, Nóbrega A, Martins RA, Areal RB, Bellio M. Neuroimmunoendocrine regulation of the prion protein in neutrophils. *J Biol Chem* 2012; 287: 35506–15.
6. Le Pichon CE, Firestein S. Expression and localization of the prion protein PrP(C) in the olfactory system of the mouse. *J Comp Neurol* 2008; 508: 487-99.
7. Le Pichon CE, Valley MT, Polymenidou M, Chesler AT, Sagdullaev BT, Aguzzi A, Firestein S. Olfactory behavior and physiology are disrupted in prion protein knockout mice. *Nat Neurosci* 2009; 12: 60-9.
8. Dibattista M, Massimino ML, Maurya DK, Menini A, Bertoli A, Sorgato MC. The cellular prion protein is expressed in olfactory sensory neurons of adult mice but does not affect the early events of the olfactory transduction pathway. *Chem Senses* 2011; 36: 791-7
9. Orrú CD, Bongianni M, Tonoli G, Ferrari S, Hughson AG, Groveman BR, Fiorini M, Pocchiari M, Monaco S, Caughey B, Zanusso G. A test for Creutzfeldt–Jakob disease using nasal brushings. *N Engl J Med* 2014; 371: 519-29.
10. Bessen RA, Shearin H, Martinka S, Boharski R, Lowe D, Wilham JM, Caughey B, Wiley JA. Prion shedding from olfactory neurons into nasal secretions. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1000837.

11. Magklara A, Yen A, Colquitt BM, Clowney EJ, Allen W, Markenscoff-Papadimitriou E, Evans ZA, Kheradpour P, Mountoufaris G, Carey C, Barnea G, Kellis M, Lomvardas S. An epigenetic signature for monoallelic olfactory receptor expression. *Cell* 2011; 145: 555-70.
12. Mironov A Jr, Latawiec D, Wille H, Bouzamondo-Bernstein E, Legname G, Williamson RA, Burton D, DeArmond SJ, Prusiner SB, Peters PJ. Cytosolic prion protein in neurons. *J Neurosci* 2003; 23: 7183–93.
13. Kurschner C, Morgan JI. The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. *Brain Res Mol Brain Res* 1995; 30: 165–8.
14. Bragason BT, Palsdottir A. Interaction of PrP with NRAGE, a protein involved in neuronal apoptosis. *Mol Cell Neurosci* 2005; 29: 232–44.
15. Restelli E, Fioriti L, Mantovani S, Airaghi S, Forloni G, Chiesa R. Cell type-specific neuroprotective activity of untranslocated prion protein. *PLoS One* 2010; 5:e13725.
16. Miesbauer M, Rambold AS, Winklhofer KF, Tatzelt J. Targeting of the prion protein to the cytosol: mechanisms and consequences. *Curr Issues Mol Biol* 2010; 12: 109-18.
17. Spielhauer C, Schätzl HM. PrPC directly interacts with proteins involved in signaling pathways. *J Biol Chem* 2001; 276: 44604–12.
18. Xu F, Karnaukhova E, Vostal JG. Human cellular prion protein interacts directly with clusterin protein. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1782: 615–20.
19. Huang T, Xu J, Xiang J, Lu Y, Chen R, Huang L, Xiao G, Sun G. PrPC interacts with potassium channel tetramerization domain containing 1 (KCTD1) protein through the PrP (51-136) region containing octapeptide repeats. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 417: 182–6.
20. Koegl M, Uetz P. Improving yeast two-hybrid screening systems. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2007; 6:302–12.

21. Inestrosa NC, Arenas E. Emerging roles of Wnts in the adult nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2010; 11: 77-86.
22. Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 1996; 84: 345–57.
23. Maguschak KA, Ressler KJ. The dynamic role of beta-catenin in synaptic plasticity. *Neuropharmacology* 2012; 62: 78-88.
24. Herms J, Tings T, Gall S, Madlung A, Giese A, Siebert H, Schurmann P, Windl O, Brose N, Kretschmar H. Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J Neurosci* 1999; 19: 8866–75.
25. Haeberle AM, Ribaut-Barassin C, Bombarde G, Mariani J, Hunsmann G, Grassi J, Bailly Y. Synaptic prion protein immunoreactivity in the rodent cerebellum. *Microsc Res Tech* 2000; 50: 66–75.
26. Ballinger CA, Connell P, Wu Y, Hu Z, Thompson LJ, Yin LY, Patterson C Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 4535-45.
27. Hatakeyama S, Yada M, Matsumoto M, Ishida N, Nakayama KI. U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J Biol Chem* 2001; 276: 33111-20.
28. Connell P, Ballinger CA, Jiang J, Wu Y, Thompson LJ, Höhfeld J, Patterson C. The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 93-6.
29. Dickey CA, Patterson C, Dickson D, Petrucelli L. Brain CHIP: removing the culprits in neurodegenerative diseases. *Trend Mol Med* 2006; 13: 32-8.
30. Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, Hajj, GNM, Chiarini LB, Nomizo R, Freitas ARO, Cabral ALB, Lee KS, Juliano MA, Oliveira E, Jachieri, SG, Burlingame A, Huang L,

- Linden R, Brentani RR, Martins VR. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J* 2002; 21: 3307–16.
31. Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J* 2002; 21: 3317–26.
32. Muller P, Ruckova E, Halada P, Coates PJ, Hrstka R, Lane DP, Vojtesek B. C-terminal phosphorylation of Hsp70 and Hsp90 regulates alternate binding to co-chaperones CHIP and HOP to determine cellular protein folding/degradation balances *Oncogene* 2013; 32: 3101-10.
33. Chakrabarti O, Ashok A, Hegde RS. Prion protein biosynthesis and its emerging role in neurodegeneration. *Trends Biochem Sci* 2009; 34: 287–95.
34. Costa MDM, Paludo KS, Klassen G, Lopes MH, Mercadante AF, Martins VR, Camargo AA, Nakao LS, Zanata SM. Characterization of a specific interaction between ADAM23 and cellular prion protein. *Neurosci Lett* 2009; 461:16–20.
35. Lee KS, Magalhaes AC, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Prado MA. Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. *J Neurochem* 2001; 79: 79-87.
36. Von Dannecker LE, Mercadante AF, Malnic B. Ric-8B, an olfactory putative GTP exchange factor, amplifies signal transduction through the olfactory-specific G-protein G α olf. *J Neurosci* 2005; 25:3793-800.
37. Kerr DS, Von Dannecker LE, Davalos M, Michaloski JS, Malnic B. Ric-8B interacts with G α olf and G γ 13 and co-localizes with G α olf, G β 1 and G γ 13 in the cilia of olfactory sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* 2008; 38: 341-8.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 PrP^C interacts with ten different ligands in cross-mating assay. Bait strain expressing PrP^C and the Lac-Z reporter gene were mated with target strains expressing the putative PrP^C interactors. X-gal was used to score positive interactions (blue color development). pBait and pTarget were used as a positive control for interaction, since they express known interaction partners. The empty bait vector (pGilda), which expresses only Lex A domain, was used as negative control

Fig. 2 Ctnnb1 and Stub1 are expressed in both olfactory epithelium (OE) and brain. (a) Protein extracts prepared from mouse brain and OE were analyzed by Western Blotting with anti-Ctnnb1 (upper panel) and anti-Stub1 (middle panel) antibodies. Anti- β -actin was used as loading control (lower panel). (b) Protein relative values were quantified using ImageJ Software® and normalized to β -actin. The results are representative of four independent experiments. Statistical analysis was conducted with GraphPad Prism (values were expressed as mean \pm SE. Student's t test was used for statistical analysis and $P < 0.05$ was considered significant).

Fig. 3 PrP^C interacts with Ctnnb1 and Stub1. (a) A pull-down assay was performed using mouse brain extract incubated with His6-PrP^C bound to Ni-NTA-agarose beads (+) or Ni-NTA-agarose alone (-). Pulled-down proteins were analyzed by Western blotting (WB) employing anti-Ctnnb1 antibody (upper panel) or anti-Stub1 antibody (middle panel). The same membranes subjected to pull-down assay were re-probed with anti-his-tag antibody to attest that recombinant PrPC was recovered from the beads (lower panel). HEK293T cells protein extracts overexpressing GFP-PrP^C and Myc-Stub1 (b) or olfactory epithelium extracts (c) were immunoprecipitated with anti-PrP^C or pre-immune serum (PI). Co-precipitated proteins were analyzed using an anti-Stub1 antibody (middle panels). The same membranes

were re-probed with anti-PrP^C (lower panels) to confirm that PrP^C was precipitated during IP-reaction.

Table 1: Genes identities obtained from yeast two-hybrid screening

Gene Description	Symbol	Accession#	Gene ID	# of clones obtained
Dynein light chain Tctex type 1 D	Dynlt1b	NM_009342.2	42476289	4
NEDD4 binding protein1	N4bp1	NM_030563.2	242117940	1
Catenin (cadherin associated protein) beta 1	Ctnnb1	NM_001165902.1	260166641	1
Collagen type3 alpha 1	Col3a1	NM_009930.2	226423932	1
Collagen type1 alpha 2	Col1a2	NM_007743.2	111120328	1
Ribosomal protein AS	Rpsa	NM_011029.4	224994259	1
Charged multivesicular body protein 2A	Chmp2a	NM_026885.3	254826731	1
Vimentin	Vim	NM_011701.4	227430362	1
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Hnrnpk	NM_025279.2	142350515	1
Serine/Arginine - rich protein specific kinase 2	Srpk2	NM_009274.2	47059479	2
DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3 x-linked	Ddx3x	NM_010028.3	164607180	1
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 5	Pcsk5	NM_001163144.1	253314508	2
Transforming growth factor beta regulated gene 1	Tgfb1	NM_025289.3	224967131	1
Glutathione S transferase	Gstm1	NM_010358.5	239937552	1
Pyruvate kinase	Pkm2	NM_001253883.1	359807366	1

Basic transcription factor3	Btf3	NM_001170540.1	281485610	1
STIP1 homology and U-Box containing protein 1	Stub1	NM_019719.3	118130581	2
S100 calcium binding protein A5	S100a5	NM_011312.2	113930759	1
Not in frame*	-	-	-	35

*inserts sequences were not in frame with the B42 transcription activation domain in the library vector

Table 2: Ten putative PrP^C ligands

Name/Symbol	Protein region contained in the target clone ^a	Function
Vimentin (Vim)	 1 152 439 467	Class-III intermediate filaments found in various non-epithelial cells.
Serine/arginine-rich protein specific kinase 2 (Srpk2)	 1 248 683	Protein involved in the phosphorylation of SR splicing factors and the regulation of splicing. Promotes neuronal apoptosis by up-regulating cyclin-D1 (CCND1) expression.
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 5 (Pcsk5)	 1 582 841 916	Likely to represent a widespread endoprotease activity within the constitutive and regulated secretory pathway.
Transforming growth factor beta-1 (Tgfb1)	 1 297 417	Multifunctional protein that controls proliferation, differentiation and other functions in many cell types. Many cells synthesize TGFB1 and have specific receptors for it.
Glutathione S-Transferase Mu 1 (Gstm1)	 1 20 219	Conjugation of reduced glutathione to a wide number of exogenous and endogenous hydrophobic electrophiles.
Dynein light chain Tctex type 1 D 1 (Dyn1t1b)	 1 114	Acts as one of several non-catalytic accessory components of the cytoplasmic dynein 1 complex that are thought to be involved in linking dynein to cargos and to adapter proteins that regulate dynein function. Cytoplasmic dynein 1 acts as a motor for the intracellular retrograde motility of vesicles and organelles along microtubules.
NEDD4 binding protein 1 (N4bp1)	 1 85 513 894	Inhibitor of the E3 ubiquitin-protein ligase ITCH.
Catenin (cadherin-associated protein) beta 1 (Ctnnb1)	 1 661 782	Downstream component of the canonical Wnt signaling pathway. Component of an E-cadherin/ catenin adhesion complex located to adherens junctions.
Charged multivesicular body protein 2a (Chmp2a)	 1 35 223	Core component of the endosomal sorting required for transport complex III (ESCRT-III) which is involved in multivesicular bodies (MVBs) formation and sorting of endosomal cargo proteins into MVBs.
STIP1 homology and U-Box containing protein 1 (Stub1)	 1 46 235	E3 ubiquitin-protein ligase which targets misfolded chaperone substrates towards proteasomal degradation.

^a Grey color indicates the region found in the target clone

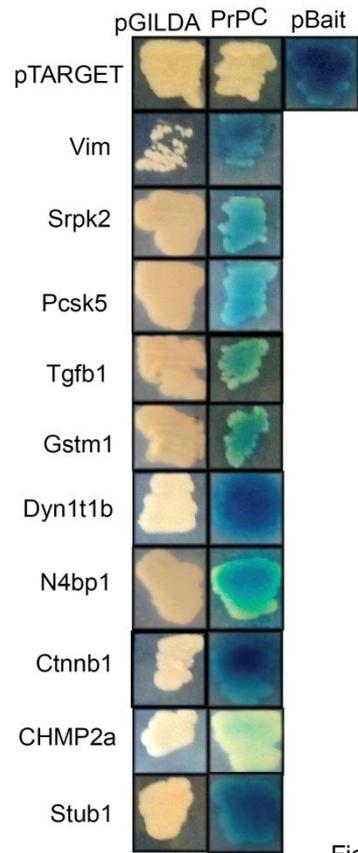
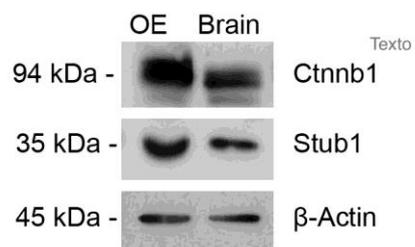


Fig 1

a



b

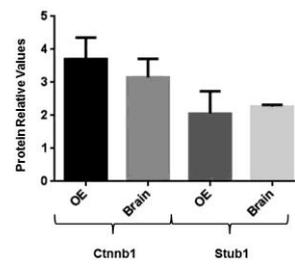


Fig 2

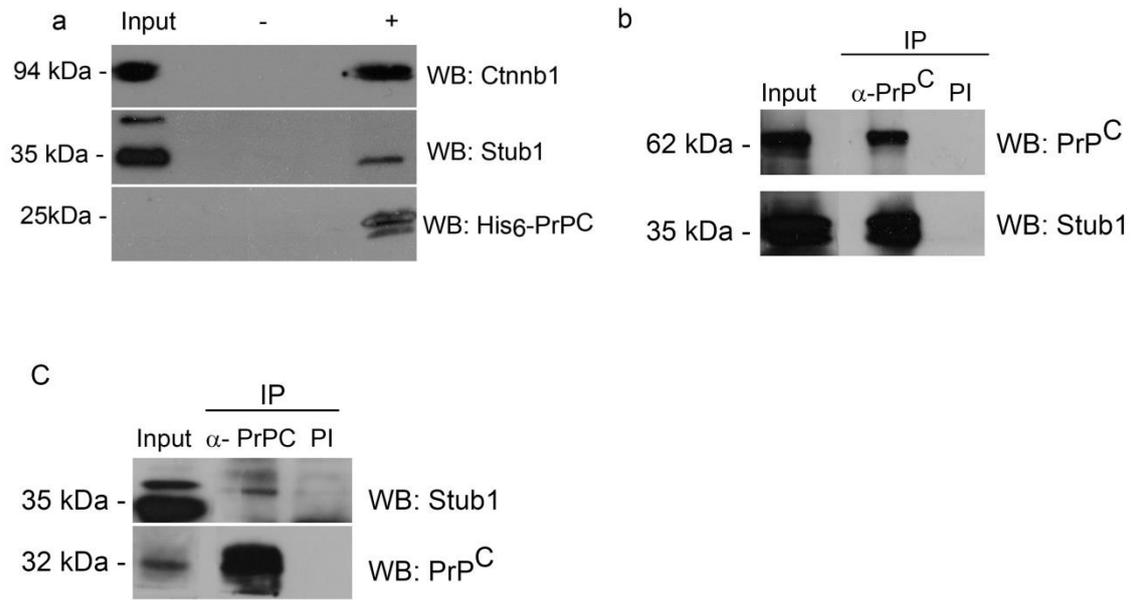


Fig 3